

# FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

VINICIUS AUGUSTO TRAMONTINA

*Cirurgião -Dentista*

## EFEITO DO SUBGALATO DE BISMUTO NO PROCESSO DE REPARAÇÃO DE FERIDAS EM DORSO DE RATO.

*Estudo Experimental Histológico, Histométrico e Fotográfico.*

*este exemplar  
foi devidamente  
revisado e aprovado  
em 17/09/97  
@ PG/036/83*

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Clínica Odontológica, área de Periodontia.

PIRACICABA

- 1997 -

T684e  
31868/BC

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

**FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA  
-UNICAMP-**

**VINICIUS AUGUSTO TRAMONTINA**

***Cirurgião -Dentista***

**EFEITO DO SUBGALATO DE BISMUTO NO PROCESSO DE  
REPARAÇÃO DE FERIDAS EM DORSO DE RATO.**

***Estudo Experimental Histológico, Histométrico e Fotográfico.***

**ORIENTADOR: PROF.DR. SÉRGIO DE TOLEDO**

**Tese apresentada à  
Faculdade de Odontologia  
de Piracicaba - UNICAMP,  
como parte dos requisitos  
para obtenção do título de  
Mestre em Clínica  
Odontológica, área de  
Periodontia.**

**PIRACICABA**

**- 1997 -**

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	
T/Unicamp	
T684e	
V.	Ex.
TOMBO BC/	31868
PROC.	281/af
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	18/10/97
N.º GPD	

CM-00102077-1

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Biblioteca da FOP/UNICAMP**

T684e	<p>Tramontina, Vinicius Augusto.</p> <p>Efeito do subgalato de bismuto no processo de reparação de feridas em dorso de ratos. Estudo experimental histológico, histométrico e fotográfico / Vinicius Augusto Tramontina. - Piracicaba : [s.n.], 1997.</p> <p>116f. : il.</p> <p>Orientador : Sérgio de Toledo.</p> <p>Tese (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.</p> <p>1. Feridas - Cicatrização. 2. Hemostásia. 3. Rato como animal de laboratório: I. Toledo, Sérgio de. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">19.CDD - 617.1 - 619.93</p>
-------	---

**Índices para o Catálogo Sistemático**

- |                                    |        |
|------------------------------------|--------|
| 1. Feridas - Cicatrização          | 617.1  |
| 2. Rato como animal de laboratório | 619.93 |



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de **Mestrado**, em sessão pública realizada em 11/09/97, considerou o candidato aprovado.

1. Sérgio de Toledo \_\_\_\_\_

2. Enílson Antonio Sallum \_\_\_\_\_

3. Rosemary Adriana C. Marcantonio \_\_\_\_\_

# **AGRADECIMENTOS**

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho, à **DEUS** pela sua presença marcante e viva nos momentos de felicidade e por sua ajuda incondicional nas horas de dificuldade.

- À meus pais **ALBINO e SILVANA** por suas lições de vida e dedicação ao filhos e por terem acreditado e apoiado todos os meus atos.

- Aos meus irmãos **CASSIUS e ADRIANA** pela convivência harmoniosa e feliz que sempre tivemos.

- À minha sobrinha **MARIA EDUARDA** pelo novo brilho e encantamento proporcionados à todos nós.

- À meus avós paternos ( **CELESTE e FRANCISCA** *em memória* ) e meus avós maternos ( **MÁRIO e ERMELINDA** ) por terem concebido meus pais e pela simplicidade e carinho demonstrados.

- Aos meus cunhados **ADRIANO e GIOVANA** por terem ocupado um importante espaço em minha família.

- À **MAURA** pela pessoa maravilhosa que é e pela companheira que sempre foi, compreendendo e apoiando minha vontade de vencer.

- Ao meu grande amigo, que agora posso chamar de irmão, **GETÚLIO**, por sua amizade incondicional, seu desprendimento e pelo seu dom de cativar amigos.

- Ao prof. e amigo **SUNG** ( sem a ajuda do qual esse trabalho não teria se iniciado ), sua esposa **MÔNICA** e seus filhos **ANDRÉ e LUCA** pelo incentivo, ensinamentos e amizade sempre marcantes.

Ao Professor

**DR. SÉRGIO DE TOLEDO**

por seu grande carinho, dedicação e incentivo, durante a  
orientação segura deste trabalho.

## AGRADECIMENTOS

À **FAPESP** pelo apoio científico e financeiro deste trabalho (processo n° **95 / 1623-1** ) através da qual as dificuldades foram amenizadas.

- À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, na pessoa de seu diretor, Prof. Dr. **JOSÉ RANALI** e diretor associado, Prof. Dr. **OSLEI PAES de ALMEIDA**.

- Ao Prof. Dr. **MÁRIO GÓES**, coordenador geral dos cursos de pós-graduação da FOP-UNICAMP.
- À Prof. Dra. **ALTAIR A. DEL BEL CURY**, coordenadora do curso de pós-graduação em Clínica Odontológica da FOP-UNICAMP.
- Aos professores da Área de Periodontia da FOP/ UNICAMP: **ANTÔNIO WILSON SALLUM, SÉRGIO de TOLEDO, ANTÔNIO FERNANDO MARTORELLI de LIMA, ENÍLSON ANTÔNIO SALLUM e FRANCISCO HUMBERTO NOCITI Jr.**
- Ao Prof. Dr. **MÁRIO ROBERTO VIZIOLI**, pela sua ajuda inestimável na avaliação histológica deste trabalho e por sua prontidão em ensinar seus conhecimentos de patologia.
- Ao Prof. Dr. **EDUARDO DIAS ANDRADE**, pelos ensinamentos demonstrados com tanta propriedade na área de Farmacologia.
- Ao Prof. Dr. **SIMONIDES CONSANI** por permitir a utilização do laboratório de Materiais Dentários da FOP/UNICAMP para execução das medidas digitalizadas da avaliação fotográfica deste trabalho.
- Aos Profs. Drs. **HÉLCIO MARCANTONIO JÚNIOR E ROSEMARY ADRIANA C. MARCANTONIO** da Faculdade de Odontologia de Araraquara / UNESP, pela concessão do uso dos equipamentos de informática para a realização da avaliação histométrica deste trabalho e por sua boa vontade e amizade sempre presentes e marcantes.
- Aos meus companheiros de casa e grandes amigos **ANDRÉ, JOÃO e FÁBIO** por terem sempre demonstrado solidariedade e amizade, acima de tudo.
- Ao amigo e conterrâneo, **ANDRÉ**, pelos longos diálogos nas estradas da vida e pelo apoio profissional.

- Ao amigo **SÉRGIO** por seu exemplo de dedicação, trabalho, humildade e amizade.
  
- Ao amigo **FERNANDINHO**, exemplo a ser seguido pela sua sabedoria e humildade.
  
- À amiga **MARILENE** por ter sempre demonstrado como encarar a vida e pelo seu exemplo de dedicação à família.
  
- Aos amigos **DANELON e VIVIANE** por todos os bons momentos e pela prestatividade característica de ambos.
  
- Aos amigos do curso de Pós - Graduação **JÚNIOR, NASCIMENTO e WERTHER**, pela agradável convivência desses anos.
  
- Aos grandes amigos do Curso de Clínica Odontológica ( turma 95 ) pela batalha que juntos passamos e agora vencemos.
  
- Aos novos amigos do Curso de Clínica Odontológica / Periodontia pelo início de uma nova jornada e de uma nova amizade.
  
- A todas as pessoas que de alguma forma colaboraram e incentivaram esse trabalho.

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULOS</b>	<b>p.g.</b>
<b>LISTAS</b>	<b>01</b>
<b>I. SIGLAS</b>	<b>02</b>
<b>II. TABELAS</b>	<b>02</b>
<b>III. GRÁFICOS</b>	<b>02</b>
<b>IV. FIGURAS</b>	<b>03</b>
<b>RESUMO</b>	<b>05</b>
<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>07</b>
<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>11</b>
<b>1. HEMOSTASIA</b>	<b>12</b>
1.1. COAGULAÇÃO	12
<b>2. AGENTES HEMOSTÁTICOS LOCAIS</b>	<b>14</b>
2.1. SUBGALATO DE BISMUTO	16
2.1.1. FARMACOLOGIA	16
2.1.2. APLICAÇÃO CLÍNICA	18
<b>3. PROCESSO DE REPARAÇÃO TECIDUAL</b>	<b>26</b>
3.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS	26
3.2. PROCESSO DE REPARAÇÃO COM UTILIZAÇÃO DE HEMOSTÁTICOS	34
<b>PROPOSIÇÃO</b>	<b>40</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>42</b>
1. SELEÇÃO DA AMOSTRA	42
2. PREPARO DOS ANIMAIS	42
3. DIVISÃO DOS GRUPOS	47
3.1. GRUPO HISTOLÓGICO	

<b>3.2 GRUPO FOTOGRÁFICO</b>	<b>47</b>
<b>4.SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS DO GRUPO HISTOLÓGICO E OBTENÇÃO DAS NECRÓPSIAS</b>	<b>47</b>
<b>5. AVALIAÇÃO DO GRUPO FOTOGRÁFICO ( GRUPO II )</b>	<b>53</b>
<b>6. PARÂMETROS PARA AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA QUALITATIVA</b>	<b>56</b>
<b>7. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS</b>	<b>56</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>57</b>
<b>I. RESULTADOS FOTOGRÁFICOS</b>	<b>58</b>
<b>II. RESULTADOS HISTOLÓGICOS ( H.E.)</b>	<b>63</b>
<b>III. RESULTADOS HISTOLÓGICOS / LUZ POLARIZADA /BIRREFRINGÊNCIA</b>	<b>75</b>
<b>IV. AVALIAÇÃO HISTOMÉTRICA</b>	<b>83</b>
<b>DISCUSSÃO</b>	<b>88</b>
<b>CONCLUSÃO</b>	<b>99</b>
<b>APÊNDICE</b>	<b>101</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>107</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>109</b>

**LISTAS**

## LISTAS

### I- SIGLAS

SIGLA	SIGNIFICADO	SIGLA	SIGNIFICADO
<b>SGB</b>	Subgalato de bismuto	<b>fig.</b>	figura
<b>seg.</b>	segundos	<b>P.A.</b>	pró-análise
<b>M.E.</b>	microscopia eletrônica	<b>H.E.</b>	hematoxilina-eosina
<b>PMN</b>	polimorfonuclear	<b>MHz</b>	megahertz
<b>Mm</b>	milímetros	<b>MB</b>	megabites
<b>MI</b>	mililitros	<b>µg</b>	micrograma
<b>G</b>	grama	<b>kg</b>	kilograma
<b>Mg</b>	miligrama	<b>Å</b>	ângstrom
<b>Cm</b>	centímetros	<b>Gy</b>	Gray
<b>®</b>	marca registrada	<b>et al.</b>	e colaboradores
<b>Tab.</b>	tabela	<b>graf.</b>	gráfico

### II- TABELAS

NÚMERO	ASSUNTO	PÁGINA
1-	Médias do perímetro das feridas ( DIA 01,04,07,11,18 )	59
2-	Análise de variância do fechamento lateral da ferida	60
3-	Análise de variância da área de ferida ulcerada	83
4-	Análise de variância da distância das bordas epiteliais	84
5-	Análise de variância da área de tecido de granulação	84
6-	Médias da área de tecido de granulação	85

### III- GRÁFICOS

NÚMERO	ASSUNTO	PÁGINA
1-	Médias do perímetro das feridas ( DIA 01,04,07,11,18 )	59
2-	Regressão linear do perímetro da ferida	61
3-	Médias da área de ferida ulcerada	86
4-	Médias da distância das bordas epiteliais	86
5-	Médias da área de tecido de granulação	87

#### IV- FIGURAS

<b>NÚMERO</b>	<b>ASSUNTO</b>	<b>PÁGINA</b>
1-	Estrutura química do subgalato de bismuto	20
2-	Padronização do bisturi circular	44
3-	Confecção da ferida cirúrgica ( Incisão 1 )	45
4-	Excisão do tecido na sua base ( Incisão 2 )	45
5-	Manipulação do subgalato de bismuto	46
6-	Desenho do corte das peças no maior diâmetro	48
7-	Desenho das dimensões do corte das peças	49
8-	Fotografia do microscópio ótico e monitor	51
9-	Fotografia do programa digitalizador de imagens	51
10-	Fotografia do tecido de granulação no monitor	52
11-	Fotografia da imagem digitalizada	52
12-	Desenho da padronização fotográfica	54
13-	Prancha da avaliação fotográfica	62
14-	Area da ferida no lado CONTROLE no DIA 01	69
15-	Area da ferida no lado TESTE no DIA 01	69
16-	Reparação tecidual no lado CONTROLE no DIA 04	70
17-	Reparação tecidual no lado TESTE no DIA 04	70
18-	Reparação tecidual no lado CONTROLE no DIA 07	71
19-	Reparação tecidual no lado TESTE no DIA 07	71
20-	Reparação tecidual no lado CONTROLE no DIA 11	72
21-	Reparação tecidual no lado TESTE no DIA 11	72
22-	Reparação tecidual no lado CONTROLE no DIA 18	73
23-	Reparação tecidual no lado TESTE no DIA 18	74
24-	Birrefringência no lado CONTROLE no DIA 01	77
25-	Birrefringência no lado TESTE no DIA 01	77
26-	Birrefringência no lado CONTROLE no DIA 04	78

EFEITO DO SUBGALATO DE BISMUTO NO PROCESSO DE REPARAÇÃO DE FERIDAS EM DORSO DE RATOS

LISTAS

<b>27-</b>	<b>Birrefringência no lado TESTE no DIA 04</b>	<b>79</b>
<b>28-</b>	<b>Birrefringência no lado CONTROLE no DIA 07</b>	<b>80</b>
<b>29-</b>	<b>Birrefringência no lado TESTE no DIA 07</b>	<b>80</b>
<b>30-</b>	<b>Birrefringência no lado CONTROLE no DIA 11</b>	<b>81</b>
<b>31-</b>	<b>Birrefringência no lado TESTE no DIA 11</b>	<b>81</b>
<b>32-</b>	<b>Birrefringência no lado CONTROLE no DIA 18</b>	<b>82</b>
<b>33-</b>	<b>Birrefringência no lado TESTE no DIA 18</b>	<b>82</b>



**RESUMO**

## RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito do subgalato de bismuto no processo de reparação tecidual. Foram utilizados 55 ratos Wistar no dorso dos quais realizou-se feridas padronizadas pelo uso de um bisturi circular (3,5 mm X 2,0 mm). No lado direito a ferida foi tratada com subgalato de bismuto e no esquerdo, com solução fisiológica 0,9%. Os períodos avaliados foram de 01, 04, 07, 11 e 18 dias. Utilizou-se microscopia ótica comum para avaliação histológica qualitativa ( H.E. ) e microscopia de polarização para avaliação da birrefringência de fibras colágenas; foi realizada ainda avaliação histométrica através das imagens histológicas digitalizadas e também avaliação macroscópica através de fotografias padronizadas. Os resultados mostraram que histologicamente não houve diferenças relevantes entre teste e controle, com síntese de colágeno discretamente maior para grupo controle; macroscopicamente não houve diferença significativa (ANOVA) no padrão de contração lateral das feridas e histometricamente, os parâmetros avaliados mostraram números significativamente maiores para as feridas tratadas com subgalato de bismuto. (ANOVA dias 01 e 04; teste  $t$ ,  $p < 0,05$  nos dias 07, 11 e 18). **Conclui-se que o subgalato de bismuto não interferiu na qualidade do processo de reparação, sendo biocompatível aos tecidos, apresentando uma área maior de tecido de granulação pela presença física do material, podendo ser indicado como hemostático, sem efeito inibor significado sobre o processo de reparação.**

**PALAVRAS CHAVE:** Subgalato de bismuto, processo de reparação.

# INTRODUÇÃO

## INTRODUÇÃO

A hemostasia é um princípio fundamental dentro das técnicas cirúrgicas, porém existem situações em que nos deparamos com dificuldade na contenção da sangramento trans e pós-operatório. Em alguns procedimentos cirúrgicos periodontais esta hemostasia pode ser dificultada devido a estes procedimentos resultarem em superfícies onde não é possível a coaptação das bordas da ferida, resultando em tecido conjuntivo exposto e cicatrização por segunda intenção.

Nos casos de gengivectomia / gengivoplastia e enxerto gengival livre, por exemplo, a hemorragia pode ser um fato que prejudica o andamento da cirurgia, aumenta o tempo operatório, diminui o conforto do paciente e prejudica a tranqüilidade do operador; nas gengivectomias, a hemostasia normalmente pode ser facilitada pelo uso de compressas de gaze e colocação de cimento cirúrgico. Na região doadora de enxerto esta condição fica mais difícil pois a área de palato apresenta um maior risco de lesão de vasos de maior calibre e, conseqüentemente, uma maior predisposição à hemorragias mais severas, tendo-se ainda como mais um agravante a dificuldade de colocação de cimento cirúrgico para proteção desta área.

Segundo **SAROFF et al.**<sup>41</sup> (1982), muitos pesquisadores têm se atido à indicações, princípios cirúrgicos e reparação de áreas doadoras de enxerto, porém muito pouca atenção tem sido dada aos cuidados relativos a essas áreas, que usualmente é a mucosa mastigatória do palato.

Muitos artifícios têm sido utilizados para se conseguir hemostasia, por exemplo, emprego de sutura na região, uso de esponjas de colágeno, colágeno microcristalino, celulose oxidada, fibrina e alginato de cálcio, entre outros. Neste

sentido, alguns autores ( **KIM E GREIN**<sup>26</sup>, 1991; **KIM et al.**<sup>27</sup>, 1997 ) buscaram na medicina e mais especificamente em otorrinolaringologia, um composto hemostático chamado subgalato de bismuto, que vem sendo utilizado topicamente como emoliente, adstringente e antiséptico. Sistemicamente suas indicações são variadas, como por exemplo nas amebíases, dispepsias, diarreia e úlceras gástricas e intestinais.

O subgalato de bismuto ( SGB ) é um composto insolúvel que apresenta um metal pesado em sua constituição e que tem sido utilizado para o tratamento de feridas abertas, em casos de gengivite necrosante aguda, sífilis e outras doenças; bem como no controle do mal odor em pacientes que sofreram colostomia ( **THORISDOTTIR et al.**<sup>49</sup>, 1988 ). A utilização específica do SGB como hemostático em otorrinolaringologia foi relatado por **MANIGLIA et al.**<sup>32</sup> ( 1989 ) num estudo retrospectivo de 12 anos de sua experiência de uso desse produto em tonsilectomias e adenotonsilectomias onde o mesmo era utilizado em forma de pasta consistente, obtida pela agregação do pó do SGB à solução fisiológica e adrenalina 1:1000, sendo essa pasta levada à área de fossa tonsilar após excisão cirúrgica das tonsilas palatinas, objetivando-se assim a hemostasia. Com esse procedimento conseguiu uma incidência muito baixa de hemorragia pós-operatória ( 0,28% com uso do SGB contra 1,2% encontrado por **PRATT & GALLAGER**<sup>37</sup> em 1979, que utilizaram outros métodos de hemostasia). Vários trabalhos têm relatado o sucesso do SGB na obtenção da

hemostasia nos casos de tonsilectomia e adenotonsilectomia ( **FENTON**<sup>13</sup>, 1995; **CALLANAN**<sup>06</sup>, 1995; **WORMALD & SELLARS**<sup>43</sup>, 1994 ), onde este composto químico tem demonstrado ótimo desempenho na contenção do sangramento, diminuição no tempo de cirurgia, segurança pós-operatória ( baixa incidência de

hemorragia pós-operatória ) e liberação antecipada do paciente do ambiente hospitalar, podendo, segundo **MANIGLIA et al.**<sup>32</sup> ( 1989 ), a tonsilectomia e a adenotonsilectomia serem executadas em nível ambulatorial, ao contrário do procedimento tradicional que necessita de internamento e cuidados pós-operatórios especiais e com um maior risco pós-cirúrgico de hemorragia. Segundo **THORISDOTTIR et al.**<sup>49</sup> ( 1988 ), o SGB atua sobre o fator XII ( ou de Hageman ) ativando a cascata da coagulação e proporcionando um menor tempo para formação do coágulo. Observando os efeitos benéficos do SGB em otorrinolaringologia, **KIM e GREIN**<sup>26</sup> ( 1991 ) extrapolaram esses resultados para a odontologia e iniciaram seu uso clínico como hemostático em cirurgias periodontais que resultam em áreas de tecido conjuntivo exposto ( p. ex. área doadora de enxerto, gengivectomia/gengivoplastia ), obtendo resultados clinicamente favoráveis, propiciando maior segurança pós-operatória com relação à hemostasia. Apesar de muitos trabalhos terem aprovado o SGB como hemostático, praticamente não se tem relato de seus efeitos sobre os tecidos e na reparação tecidual. O objetivo deste trabalho foi testar o efeito do subgalato de bismuto no processo de reparação em feridas no dorso de ratos.

## **REVISÃO DA LITERATURA**

## REVISÃO DA LITERATURA

### 1) HEMOSTASIA

#### 1.1. Coagulação

O termo hemostasia significa prevenção da perda de sangue. Uma vez que um vaso é danificado ou rompido, a hemostasia é conseguida por vários mecanismos, incluindo (1) espasmo vascular, (2) formação de um tampão de plaquetas, (3) formação de um coágulo de sangue como resultado da coagulação sangüínea e (4) crescimento eventual de tecido fibroso no coágulo sangüíneo para fechar o espaço (abertura) do vaso permanentemente. ( GUYTON & HALL<sup>18</sup>, 9<sup>a</sup>. ed. 1994)

A coagulação sangüínea é um mecanismo de defesa que, juntamente com o processo inflamatório e o de reparação, assegura a manutenção da integridade do sistema circulatório fechado e de alta pressão dos mamíferos, após a injúria dos vasos sangüíneos<sup>18,20</sup>. Esse sistema de coagulação é, normalmente, quiescente, mas se torna ativo em poucos segundos após a injúria. Células ( leucócitos, células endoteliais, plaquetas ) e proteínas plasmáticas da coagulação são críticas para essa reação, onde a resposta às injúrias vasculares culminam na formação de um tampão plaquetário, a geração de um coágulo de fibrina, deposição de células brancas na área de tecido traumatizado e a iniciação da inflamação e conseqüente reparo.<sup>18</sup>

Quando do início do processo de coagulação, a ativação de certas pró-enzimas do plasma em suas formas ativas, ocorre pela via intrínseca ou pela via

extrínseca da coagulação. Essas glicoproteínas plasmáticas, incluindo o fator XII, fator XI, fator IX, fator X, fator VII e protrombina, são zimogênios de proteases séricas ( fatores de coagulação inativos ) que são convertidas em uma forma ativa através da proteólise de um ou dois peptídeos. Os íons cálcio apresentam um papel crítico nas reações da coagulação, sendo cálcio dependente ou requerendo este íon para interação de proteínas com a superfície de membranas. A formação do coágulo ocorre quando o fibrinogênio é convertido, pela trombina, em fibrina, que é a proteína estrutural do polímero de fibrina. O coágulo formado após a injúria do tecido, é composto de plaquetas ativadas e fibrina, que impedem mecanicamente a saída de sangue dos vasos injuriados, minimizando a perda sangüínea na ferida. Uma vez que um coágulo estável é formado, o processo de reparação se inicia e o coágulo então é lentamente dissolvido por enzimas do sistema fibrinolítico.

Segundo **ESMON**<sup>9</sup> (1993), a forma como a coagulação se inicia tem sido um dos maiores objetos de estudo desde o início das pesquisas bioquímicas sobre o processo de hemostasia, onde sabe-se que dois eventos podem disparar esse processo. Um desses eventos envolve a exposição do sangue à superfícies estranhas, o que inicia a ativação do fator XII. Uma vez que pacientes com deficiência nesse fator não possuem complicações com relação ao sangramento, têm-se aceitado que essa via não seria um mecanismo crítico para iniciação da coagulação, e a via alternativa, mais aceita, é iniciada por um fator tissular ( encontrado nas superfícies celulares extravascularmente ), que se une ao fator VII ou VIIa e inicia a seqüência de eventos da coagulação, a qual pode ser iniciada por uma via intrínseca, onde todos os componentes estão presentes no

sangue; ou por uma via extrínseca, onde os fatores teciduais ( proteínas ) da membrana celular exercem papel fundamental.

## 2) AGENTES HEMOSTÁTICOS LOCAIS

Desde os tempos mais antigos a hemostasia local tem um importante papel no controle do sangramento após trauma ou procedimentos cirúrgicos<sup>10,41,46,51</sup>. Conseqüentemente, uma variedade de técnicas, bem como agentes, têm sido desenvolvidos com propósito de promover hemostasia<sup>10</sup>..:

- 1) Compressão;
- 2) Agentes mecânicos -ligaduras, suturas;
- 3) Temperatura - frio;
- 4) Cauterização - eletrocoagulação;
- 5) Agentes químicos - vasoconstritores ( epinefrina ), cáusticos ( nitrato de prata), adstringentes ( compostos de alumínio );
- 6) Adesivos plásticos;
- 7) Agentes biológicos - tromboplastina tecidual, veneno de cobra, Trombina, *TOPICAL*®;
- 8) Materiais hemostáticos absorvíveis
  - ação intrínseca: *GELFOAM*®, *AVITENE*®
  - ação extrínseca: *OXYGEL*®; *SURGICEL*®

A ligadura é um procedimento que data da antigüidade e que foi redescoberta no século XVI na França e , hoje em dia, a ligadura e sutura constituem a técnica padrão para o controle da hemorragia cirúrgica. ( *SCHACHTER*<sup>43</sup>, 1966 ). O sangramento durante as cirurgias bucais, bem

como durante o período de recuperação pós-operatória, deve ser monitorado pelo profissional, mesmo quando se trata de pacientes sem alterações na hemostasia. Hemorragias intensas são mais comumente encontradas em tratamentos cirúrgicos executados em pacientes portadores de distúrbios sistêmicos. Os hemostáticos locais colaboram com a formação do coágulo e têm sido empregados rotineiramente como coadjuvante no controle de vários tipos de sangramento em feridas na boca e, particularmente, em áreas onde o acesso na cavidade bucal é limitado.

Segundo **SILVERSTEIN & CHVAPIL**<sup>46</sup> (1981) o hemostático tópico ideal segue as seguintes características:

- Elevada ação hemostática;
- Não ser antigênico;
- Fácil esterilização;
- Simular estrutura tecidual como: pequenos interstícios e espessura uniforme;
- Poder ser recortado conforme a necessidade
- Reação tecidual mínima;
- Bioabsorvível "in vivo";
- Baixo custo;

Segundo **EVANS**<sup>10</sup> (1977), a cirurgia bucal pode ser executada com segurança, utilizando-se medidas locais para pacientes onde haja um funcionamento impróprio em um desses três elementos que afetam a hemostasia: 1) Integridade dos vasos sanguíneos; 2) Função plaquetária; 3) Fatores de coagulação que interagem para converter *fibrinogênio* em *fibrina* formando um coágulo estável. Segundo o autor, essas recomendações são sujeitas à algumas restrições e limitações, mas as vantagens de medidas locais

favorecem a hemostasia enquanto limita os riscos aos quais o paciente está exposto. No caso de pacientes com coagulopatias ( desordens hereditárias como hemofilia; desordens induzidas por drogas anti-coagulantes - cumarina - em pacientes com tendências à trombo-embolismo e coagulopatias idiopáticas), nesses casos o uso de hemostáticos fica muito limitado, devendo-se procurar auxílio médico para avaliação sistêmica antes do tratamento cirúrgico.

Existem vários agentes hemostáticos absorvíveis que podem auxiliar na formação do coágulo. Segundo o mesmo **EVANS**<sup>10</sup> (1977), duas considerações fundamentais devem ser feitas quando da utilização desses agentes hemostáticos, primeiro que esses produtos não devem retardar o processo de reparação e segundo, não deve aumentar o risco de infecção da ferida.

## **2.1. Subgalato de Bismuto**

### **2.1.1. Farmacologia**

Como descrito na **FARMACOPÉIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL**<sup>11</sup> (1959), o “galato de bismuto” tem como sinônimos: subgalato de bismuto, dihidroxigalato de bismuto e dermatol. Seu peso molecular é de 412.13 sendo sua fórmula química  $C_7H_7O_7Bi$ . Tem como características ser um pó com coloração amarelo citrino, amorfo, inodoro, quase insípido, inalterável ao ar; sendo insolúvel em água, álcool e éter, descolora na presença de luz solar, dissolve-se em soluções de hidróxido de álcalis e decompõe-se em ácidos clorídrico, nítrico e sulfúrico quentes.

Segundo **MERCK INDEX**<sup>36</sup> ( 1976 ) , o SGB é preparado se dissolvendo o subnitrato de bismuto em ácido acético diluído e precipitando-se o produto em composto com ácido gálico.

No compêndio **MARTINDALE**<sup>40</sup> (1989), é descrito que o subgalato de bismuto ( SGB ) tem sido empregado como pó para ser “polvilhado” em desordens da pele e como supositório para utilização em hemorróidas. Tem sido usado normalmente no tratamento da diarréia, disenteria e colite ulcerativa devido ao seu efeito adstringente, que, por definição, precipita proteínas e quando aplicadas à membranas mucosas ou à pele injuriadas formam uma camada protetora, não sendo usualmente absorvidos, tendo uma pequena penetrabilidade, afetando apenas camadas superficiais de células (**GOODMAN & GILMAN**<sup>16</sup>, 1983) Os adstringentes são utilizados para proteger a pele e mucosas e diminuir secreções exudativas, bem como a hemorragia em úlceras bucais, hiperhidroses e hemorróidas.

Alguns efeitos adversos foram relatados na literatura, quando alguns sais de bismuto eram ingeridos por pacientes em que se executou colostomia e/ou ileostomia, ou por pacientes que utilizavam o composto para tratamento de colites ulcerativas, diarréia ou outro distúrbio gastrointestinal. Entre os efeitos adversos pode-se incluir distúrbios gastrointestinais, reações na pele e descoloração de membranas mucosas, podendo aparecer uma linha azulada na gengiva; além de ocorrer danos aos rins e fígado. Presença de encefalopatia reversível tem sido relatado, principalmente na França e Austrália, não sendo necessariamente associada ao uso prolongado dos sais de bismuto; alterações ósseas e articulares também são relatadas. Todos esses efeitos tem levado à

restrições do uso dos sais de bismuto, por via oral durante períodos prolongados<sup>40</sup>.

**LOWE**<sup>32</sup> (1974), relata que, após um longo tempo de ingestão do pó de subgalato de bismuto, alguns pacientes desenvolvem, inicialmente, lassidão e perda de energia, com sensações peculiares nos dedos e unhas; após alguns anos há deterioração da habilidade mental, particularmente perda de memória e da capacidade de concentração. Segundo o autor os sinais e sintomas desapareciam após a supressão do uso do subgalato de bismuto.

### 2.1.2. Aplicação Clínica

Segundo **GORBACH**<sup>17</sup> (1990), os compostos de bismuto são drogas que vêm sendo empregadas há quase três séculos em medicina, tendo indicações de uso tópico: como emolientes, adstringentes e antissépticos; de uso parenteral: como anti-sifilítico; e por via oral: no tratamento de amebíases, dispepsias e diarréias. Os metais pesados, como o bismuto, se caracterizam por possuir atividade antimicrobiana comprovada, onde estudos ultraestruturais de biópsias endoscópicas de pacientes tratados com sais de bismuto demonstraram alterações na estrutura bacteriana com presença de vacuolização de seus componentes e deposição de material eletrodense (aparentando complexos de bismuto) observados na superfície externa e logo abaixo da parede celular dos microorganismos; parecendo que os compostos de bismuto apresentam "ação direta sobre as bactérias, bem como, habilidade em interferir sobre a aderência do microorganismo ao epitélio" ( **MARSHALL et al.**<sup>34</sup>, 1987 ).

Vários sais inorgânicos de bismuto podem ser utilizados ( **LAMBERT**<sup>30</sup>, 1991), como por exemplo o subnitrito, o subsalicilato, o *subgalato*, o tartarato e o

subcarbonato. Alguns desses sais ( subcitrato de bismuto e subsalicilato de bismuto ) têm eficiência comprovada no tratamento da úlcera gástrica e duodenal, agindo similarmente aos antagonistas histamínicos  $H_2$ , bem como à capacidade desses compostos em erradicar o *Helicobacter (Campylobacter) pylori* <sup>17,30,55</sup>, microorganismo associado à gastroduodenite e citado como participante no desenvolvimento de úlceras gástricas e intestinais <sup>22,37</sup>.

**JARRET** <sup>22</sup> (1992) indica o uso de alguns sais de bismuto no tratamento de verruga comum ( *Verruca Vulgaris* ), utilizando-se tabletes de triglicolomato sódico de bismuto, tomados 4 vezes ao dia, demonstrando resolução ( desaparecimento ) das verrugas num período de 1 à 15 dias de tratamento, na maioria dos pacientes.

Segundo **THORISDOTHIR et al.** <sup>50</sup> (1988), o subgalato de bismuto é um composto insolúvel que foi extensamente utilizado no início deste século para as mais variadas funções, como pó protetor em feridas abertas, tratamento da Angina de Vincent ( G.U.N.) e na sífilis, bem como no controle do odor em pacientes que sofreram colostomia/ileostomia. Mais recentemente tem sido utilizado empiricamente, na forma de pasta, contendo epinefrina, como agente hemostático durante adenotonsilectomias. <sup>6,13,33,37,48,50,54</sup>

O subgalato de bismuto tem sido amplamente utilizado como agente hemostático em otorrinolaringologia, principalmente em cirurgias que exijam a remoção das amígdalas e/ou das adenóides. **NASSIF e PATROCÍNIO** <sup>37</sup> (1978) relatam os problemas hemorrágicos comuns nesses tipos de cirurgia, tanto no período trans-operatório quanto no pós-operatório, sendo nessa segunda etapa onde se encontram os maiores problemas hemorrágicos. Os autores comentam

que em nenhum dos casos onde se utilizou o subgalato de bismuto como hemostático se observou qualquer fenômeno de intolerância ou reação local com o uso do produto, constatando uma diminuição no tempo de cirurgia e redução no número de suturas necessárias para promover hemostasia, visto que o uso do subgalato de bismuto dispensa a ligadura dos vasos de pequeno calibre ou da superfície muscular sangrante.

A estrutura química do subgalato de bismuto mostra alguma semelhança com o ácido elágico<sup>50</sup>, sendo ambos derivados do ácido gálico ( fig. 1 ).

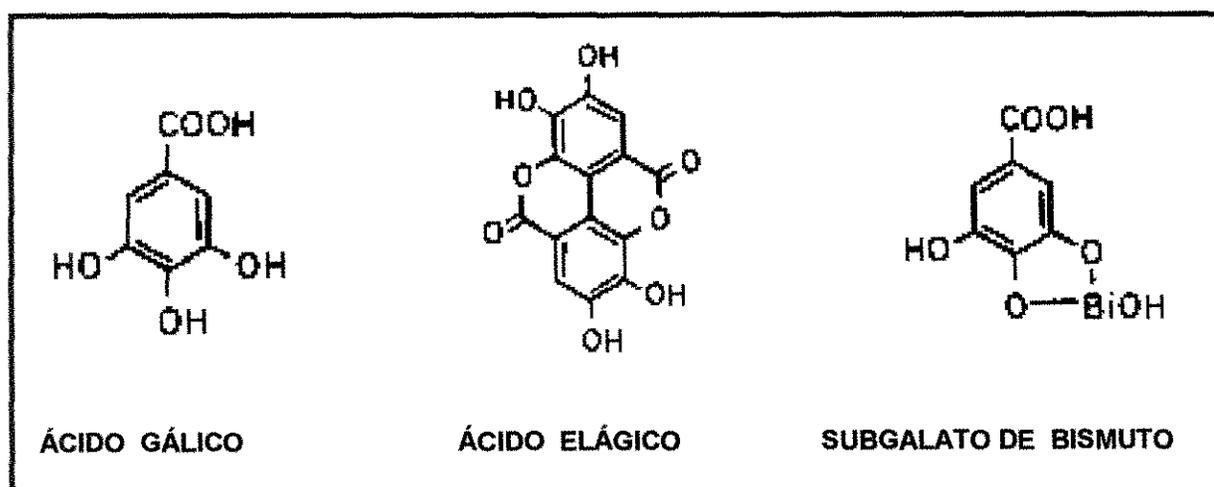


FIG.1. Estruturas químicas do ácido gálico, ácido elágico e subgalato de bismuto.

O ácido elágico é um agente promotor de coagulação que inicia a formação de trombina pela ativação da via intrínseca ( da cascata de coagulação) pela ação sobre o fator XII ( **RATNOFF E CRUM**<sup>39</sup>, 1964 ), essa capacidade do ácido elágico reside em seus grupos químicos carregados negativamente, fazendo com que o mesmo tenha capacidade de adsorver ao fator XII do plasma, transformando essa substância de uma forma inativa em uma forma ativa, acelerando a coagulação. Segundo **WILNER et al.**<sup>52</sup> (1968) o colágeno também teria um efeito de ativação do fator XII, além da sua característica de agregação de plaquetas, concluindo em seu trabalho que as

cargas negativas presentes na estrutura do colágeno é o fator crítico para a adsorção e ativação do fator XII.

Os autores **THORISDOTTIR et al.**<sup>50</sup> (1988) realizaram um experimento utilizando amostra de plasma de 24 homens ( 18 a 45 anos ) onde o mesmo foi colocado em contato com várias concentrações de subgalato de bismuto ( desde 4 µg / ml até 1 mg / ml ) e obtiveram como resultado uma drástica diminuição no tempo de formação do coágulo ( sendo maior o tempo quanto menor fosse a concentração do subgalato de bismuto estudada ). Outro resultado obtido foi que o subgalato de bismuto parece não promover coagulação de amostras de plasma deficientes em qualquer um dos fatores que participam da via intrínseca de formação de trombina. A ação do subgalato de bismuto, segundo os autores, está localizada nos primeiros momentos da via intrínseca, pois a ativação do fator XII está na dependência da presença de pares de grupos carboxila na posição orto ( semelhante ao ácido elágico, porém há a presença de grupos hidroxila ). Pode-se presumir que em meio aquoso ocorre dissociação de prótons do ácido elágico, resultando nos grupos carregados negativamente que são requeridos para a ativação do fator XII.

**TANNOUS et al.**<sup>48</sup> (1989) encontraram opacidade radiográfica na região de faringe causada pela presença do subgalato de bismuto após adenotonsilectomias em crianças, citando a importância do diagnóstico diferencial desses achados com presença de corpos estranhos ou de calcificações faringeanas, porém sem relatar maiores complicações devido a esse fato.

**COZZI et al.**<sup>8</sup> (1992) realizaram um estudo em ratos para demonstrar a aspiração do subgalato de bismuto quando do uso de traqueotubo para indução da anestesia, simulando a situação semelhante encontrada na anestesia geral em crianças que se submeterão à adenotonsilectomia. Os autores concluíram neste trabalho que o subgalato de bismuto é um excelente hemostático, com vários estudos mostrando baixa frequência de casos de hemorragia pós-operatória e que embora nenhuma seqüela pós-operatória tem sido relatada, este estudo em modelo animal demonstrou que sua aspiração pode resultar em pneumonia em um considerável número de animais, sendo que esta informação deve servir de alerta para os clínicos para os possíveis riscos do uso do subgalato de bismuto em pacientes com comprometimento pulmonar, tomando-se medidas preventivas contra a aspiração do mesmo. A natureza da resposta inflamatória ao material aspirado representa uma resposta inflamatória não específica, inicialmente mostrando infiltrado neutrofílico sendo posteriormente seguido por migração histiocitária com freqüente formação de células gigantes de corpo estranho que se encarregariam de fagocitar o material. Apesar de demonstrada neste estudo, nenhuma seqüela tem sido relatada clinicamente nos pacientes.

Alguns autores têm citado o uso do subgalato de bismuto como agente hemostático em tonsilectomias e adenotonsilectomias<sup>6,8,13,33,,37,54</sup>, ressaltando sua importância na diminuição da frequência de hemorragia pós-operatória, bem como na morbidade, podendo os pacientes serem operados e dispensados com maior rapidez e menores riscos.

**NASSIF & PATROCÍNIO**<sup>37</sup> (1978) citaram o uso clínico do subgalato de bismuto em cirurgias de amígdala relatando que o mesmo deve ser usado

“dentro de uma técnica combinada com a ligadura vascular, a fim de conseguir uma segurança ainda maior” e comentam que esta conduta veio trazer diminuição acentuada nos casos de hemorragias pós-operatórias em amigdalectomias.

**MANIGLIA et al.**<sup>33</sup> (1989) realizaram no período de 1975 à 1987 um total de **1428** casos de tonsilectomias e/ou adenoidectomias, utilizando o subgalato de bismuto como hemostático para esses casos, sendo o mesmo reaplicado localmente até obtenção total da hemostasia e o excesso do material removidos. Os pacientes foram observados durante 4 à 5 horas após o ato cirúrgico em ambiente ambulatorial, sendo então liberados após receberem orientações específicas. Não houve caso de mortalidade. Apenas 2 casos de hemorragia imediata ( 0,14 % ) aconteceram nas primeiras 24 horas e 2 casos posteriores ( 0,14% ) após 24 horas, totalizando 0,28% de ocorrência de hemorragia pós-operatória contra 1,2% encontrados por **PRATT & GALLAGHER**<sup>38</sup> (1979), que relataram em seu estudo em pacientes que retornaram ao serviço hospitalar com hemorragia severa após cirurgia onde foram empregados métodos convencionais de hemostasia ( ligadura, compressão, cauterização ).

**WORMALD & SELLARS**<sup>54</sup> (1994) citam que as cirurgias de adenotonsilectomias e tonsilectomias são um dos procedimentos cirúrgicos mais comuns nos Estados Unidos da América e que vários trabalhos têm sido realizado para avaliar a eficiência hemostática do subgalato de bismuto, bem como a redução no tempo de cirurgia. Os autores utilizaram 202 pacientes, sendo 90 no grupo teste ( uso do subgalato de bismuto ) e 112 no grupo controle; a pasta utilizada era obtida pela adição de 0,7 ml de adrenalina 1 : 1000 à 30 mg do pó de subgalato de bismuto e misturando-os à 20 a 40 ml de solução salina

para obter uma pasta com consistência de creme dental. O tempo de cirurgia foi medido ,sendo que a média do tempo gasto para obtenção da hemostasia com subgalato de bismuto foi de 9,9 minutos contra 11,5 minutos no grupo controle ( a diferença apesar de pequena foi estatisticamente significativa ). O mesmo trabalho avaliou o número de compressas e de suturas executados nos grupo teste e controle , obtendo-se valores com pouca diferença ( 3,7 contra 4,5 no número de compressas e 2,1 contra 3,4 no número de suturas ) porém estatisticamente significantes, concluindo que o subgalato de bismuto possui efeitos benéficos em adenotonsilectomias, devido à suas propriedades hemostáticas, reduzindo o tempo operatório e a quantidade de hemorragia intra-operatória, aumentando a segurança pós-operatória.

**CALLANAN et al.**<sup>6</sup> ( 1995), em seu estudo utilizaram uma mistura de 13 mg de subgalato de bismuto acrescida de 10 ml de solução salina e 0,35 ml de adrenalina 1: 1000 em 98 pacientes que foram submetidos à tonsilectomia. Os pacientes foram divididos aleatoriamente em 2 grupos, sendo o grupo onde foi utilizado o subgalato de bismuto composto por 51 pessoas e o grupo controle por 47 pessoas, não havendo diferenças estatisticamente significantes entre os grupos com relação ao peso e idade dos pacientes. O tempo médio de cirurgia foi de  $22,6 \pm 10,6$  minutos no grupo controle, contra  $16,8 \pm 8,2$  minutos no grupo com subgalato de bismuto, significando uma redução de 25,6 % no tempo operatório, o que é, segundo os autores, clinicamente importante e estatisticamente significante. Neste mesmo estudo não houve diferenças entre os grupos com relação ao total de perda de sangue durante a cirurgia e os autores discutem esse achado justificando que a maior quantidade de sangue perdida se encontra na fase inicial do ato operatório, ou seja, durante a

dissecação e excisão das tonsilas. Neste estudo houve dois casos de hemorragia pós-operatória imediata do grupo controle e nenhum do grupo com subgalato de bismuto, porém houve quatro casos de hemorragia secundária no grupo com subgalato e um caso no grupo controle. Esses casos necessitaram, segundo os autores, apenas tratamento conservador, sem necessidade de maiores cuidados ou transfusão de sangue. Os autores concluem que “qualquer redução no tempo operatório irá reduzir a pressão de atendimento encontrada nos serviços de saúde” e recomendam seu uso durante a tonsilectomia.

**FENTON et al.**<sup>13</sup> (1995) também realizaram um estudo para avaliar a relação do subgalato de bismuto com o tempo de hemostasia e sobre o número e suturas necessárias no grupo teste ( com subgalato de bismuto ) comparado ao controle ( sem uso de agente hemostático ) quando da realização de tonsilectomias. Também foi avaliada a morbidade pós-operatória através de questionário respondido pelos pais das crianças dos dois grupos. Foram utilizadas 72 crianças, sendo 39 ao grupo do subgalato de bismuto e 33 do grupo controle. Não houve diferenças significativas no tempo total de cirurgia entre os grupos, porém o tempo requerido para se conseguir hemostasia foi estatisticamente menor no grupo com subgalato de bismuto ao nível de significância de 5 %. ( tempo médio no grupo com subgalato de bismuto foi  $7,8 \pm 3,1$  contra  $9,9 \pm 2,7$  no grupo controle ). O número de suturas foi em média  $1,5 \pm 1,07$  no grupo teste, contra  $3,4 \pm 1,65$  no grupo controle, sendo esses números estatisticamente significantes ao nível de 5%. Os autores concluíram que não há diferenças marcantes na morbidade pós-operatória utilizando-se ou não o subgalato de bismuto e que o uso da pasta de subgalato de bismuto com

adrenalina com coadjuvante hemostático durante tonsilectomia reduz significativamente o tempo requerido para este procedimento.

Alguns autores<sup>27,28</sup>, observando os efeitos benéficos do subgalato de bismuto na obtenção da hemostasia relatados na Medicina, iniciaram a sua utilização em cirurgias periodontais que apresentavam como resultado pós-operatório área de tecido conjuntivo exposto (principalmente áreas doadoras de enxerto no palato). Esses autores relatam diminuição acentuada no tempo de cirurgia e como consequência aumento na segurança contra a hemorragia bem como tranquilidade para o paciente e para o operador.

### 3) PROCESSO DE REPARAÇÃO TECIDUAL

#### 3.1. Características gerais

Conforme citado por **HEUGHAN et al.**<sup>20</sup> (1975) com o aperfeiçoamento das espécies animais, a capacidade das mesmas em responder às injúrias físicas através da regeneração dos tecidos destruídos foi gradativamente sendo perdida. Os mamíferos são capazes de regenerar epitélio, tecido hepático e tecido ósseo, conseqüentemente a resposta às injúrias de outros tecidos consiste basicamente na formação de tecido conjuntivo de reparação (granulação) e re-epitelização. **LARJAVA et al.**<sup>31</sup> (1993) citam que durante o processo de reparação, a proteólise pericelular é tida como essencial para o destacamento de queratinócitos da membrana basal e para sua migração para o leito da ferida, para iniciar o processo de re-epitelização. **SALO et al.**<sup>41</sup> (1994) descrevem em seu trabalho que durante o processo de reparação das feridas, queratinócitos se destacam da membrana basal e migram para recobrir o tecido

conjuntivo exposto, onde, subseqüentemente, o coágulo da ferida é degradado gradualmente e trocado por células epiteliais e tecido de granulação.

**HARRISON**<sup>19</sup> (1991) em seu artigo de revisão cita que uma ferida é o rompimento da continuidade anatômica e/ou da função dos tecidos vivos e que resulta em lesão e morte celular. O mesmo autor comenta que “ ... periodontistas têm investigado extensivamente o processo de reparação e, como resultado, têm desenvolvido e refinado os conceitos e técnicas cirúrgicas para alcançar uma cura mais rápida, que é o objetivo de um procedimento cirúrgico”. Os mecanismos mais relevantes no processo de reparação de feridas, ainda segundo o autor, podem ser didaticamente separados em: a) coagulação e inflamação; b) cura epitelial; c) cura do tecido conjuntivo; d) maturação e remodelação da ferida.

Após obtenção de um coágulo estável, através da conversão de fibrinogênio em fibrina e da polimerização e ligação dessas moléculas formando uma rede que aprisiona frações do plasma e células, o processo inflamatório tem início, envolvendo reações vasculares, celulares e humorais na região afetada, o que prepara o sítio para a cura. A cura depende do processo inflamatório para criar um ambiente favorável ao metabolismo celular através da eliminação de microorganismos, de tecido destruído ou necrótico e de partículas estranhas. A cura epitelial é a primeira a se iniciar no processo de reparação, através da migração de queratinócitos da camada basal<sup>10,26,38,50</sup> que adquirem a capacidade de executar movimentos amebóides e potencial fagocítico, se tornando alongadas e migram através do substrato de fibrina, formando uma monocamada ( película ) de células que se dirigem ao centro da ferida até que o contato entre as células ocorra e essa migração é paralisada quando a célula está em contato

com outras células epiteliais em toda a sua dimensão ( inibição por contato ), formando um selamento epitelial da ferida. Esse selamento previne o ingresso de irritantes, inibe a perda de fluidos que funcionam como nutrientes às células do conjuntivo, mantém a hidratação da ferida e promove aumento na resistência da ferida ( prevenindo separação das bordas ).

A cura do tecido conjuntivo da ferida corresponde à fase mais complexa do processo de reparação. Ela se inicia com o selamento epitelial e progride rapidamente com a formação da barreira epitelial ( estratificação do epitélio em camadas ). A célula primária envolvida na reparação do tecido conjuntivo é o fibroblasto que sintetiza o colágeno e a substância fundamental amorfa, que são os elementos essenciais na reparação ou regeneração. Os macrófagos presentes em grande número na ferida, além de executar suas funções de limpeza e fagocitose, liberam fatores que causam a mobilização e migração de fibroblastos, que são mobilizados primariamente à partir de células mesenquimais indiferenciadas dos tecidos perivasculares que margeiam a ferida. Essas células iniciam a síntese de glicosaminoglicanas, glicoproteínas e proteínas fibrosas ( inicialmente colágeno tipo III ou reticulina ). Os fibroblastos tardios começam a produção do colágeno tipo I, que ao atingirem o ambiente extracelular, levam à liberação de fatores de angiogênese pelos macrófagos e outras fontes, estimulando a migração de cordões de células endoteliais e células da musculatura lisa à partir da microvasculatura das bordas da ferida. Essa neovasculatura se inicia nas bordas da ferida e progride para a área central, sendo, entretanto, uma neovasculatura ineficiente, com fluxo irregular e turbulento, tortuoso e com uma permeabilidade excessiva. O desenvolvimento de um sistema microvascular maduro e eficiente ( revascularização ) depende da

maturação das células endoteliais que está na dependência da contínua formação de colágeno e de matriz pelos fibroblastos. Com o progresso da ferida, a proporção de macrófagos e fibroblastos diminui, sendo o fibroblasto a célula predominante. A transição de um tecido com predominância de infiltrado inflamatório, chamado tecido granulomatoso, para um tecido com predominância de fibroblastos, chamado de tecido de granulação, demonstra o sucesso da cura no tecido conjuntivo. O tecido de granulação é, de início, pobremente organizado devido à abundância de material amorfo e fraca colageneização. Neste estágio, o coágulo de fibrina é substituído por conjuntivo jovem ( tecido de granulação ) e a organização do coágulo é considerada completa. O tecido de granulação continua a sua maturação através da agregação de colágeno pelo aumento de interligações proteína-polissacarídeos e pelo enrijecimento da substância fundamental amorfa, para o tecido conjuntivo fibroso se tornar maduro.

A maturação e remodelação se inicia quando suficiente colágeno é produzido, o número de fibroblastos diminui na ferida e existe uma diminuição concomitante no número de vasos. A maturação envolve simultaneamente a desagregação do colágeno ( despolimerização ) e reagregação ( polimerização ) o que resulta em uma alteração na arquitetura das fibras para um padrão organizado e com densidade similar às fibras normais. Com essa situação normal das fibras, o número de fibroblastos diminui gradativamente até chegar aos níveis normais dos tecidos adjacentes.

**FEJERSKOV<sup>12</sup>** (1973), analisou, através de microscopia ótica e eletrônica, as fases do processo de reparação em feridas no palato de porcos da Guinéa, observou ao microscópio eletrônico que 5 minutos após a confecção das feridas o citoplasma e a membrana celular das células da camada córnea da margem da

ferida se apresentavam cortados e sem dilatação dos espaços intercelulares, o citoplasma se apresentava preservado, mesmo as células tendo sido cortadas. Nas camadas granulosa e metade superior da espinhosa, não foi encontrado vazamento do conteúdo citoplasmático para o interior da cavidade da ferida. Ocasionalmente mudanças no núcleo e citoplasma eram encontradas, porém se restringia apenas nas células cortadas pela incisão, não sendo observado nas células imediatamente abaixo da margem da ferida. Com 6 horas após a incisão, em M.E., as células da camada córnea que foram cortadas, usualmente ainda retém o citoplasma, porém algumas células desta camada e da camada granulosa, uma fenda se forma no citoplasma na porção interna da membrana celular, o que leva ao extravasamento total ou parcial do conteúdo do citoplasma para a cavidade da ferida. Pequenas quantidades de bactéria são encontradas nos espaços intercelulares e nessas fendas citoplasmáticas citadas. Eritrócitos e leucócitos PMN são encontrados ao longo da superfície incisada, distantes em torno de 50 à 200 A° das células epiteliais expostas. Segundo **COTRAN et al.**<sup>7</sup> (1994) após 24 horas, os neutrófilos aparecem nas margens da incisão, movendo-se através do coágulo de fibrina. Existe um alargamento da epiderme ( epitélio ) devido à atividade mitótica das células basais e dentro de 24 à 48 horas, células das margens da ferida migram e se multiplicam ao longo das margens expostas da derme ( conjuntivo ). As células se fundem na porção mediana da ferida, formando uma camada epitelial contínua, porém delgada. Com 3 dias, os neutrófilos são intensamente substituídos por macrófagos. Tecido de granulação progressivamente invade o espaço da ferida. Fibras de colágeno estão presentes na margem da incisão e orientados verticalmente, a proliferação celular continua, alargando a cobertura epitelial. Em torno de 5 dias, o espaço da

incisão está preenchido com tecido de granulação, a neovascularização é máxima e as fibrilas colágenos se tornam mais abundantes e começam a se estender sobre a ferida. a epiderme ( epitélio ) retoma sua espessura normal e inicia a sua queratinização. Durante a *segunda semana* existe um contínuo acúmulo de colágeno e proliferação de fibroblastos. O infiltrado leucocitário, edema e aumento da vascularização diminuem drasticamente. No final do *primeiro mês* o resultado que se apresenta é um tecido conjuntivo celular livre de inflamação, coberto por epitélio intacto e com os anexos novamente formados. A resistência ( tensão ) da ferida aumenta, porém pode levar meses para obter sua resistência máxima.

Essa cronologia acima descrita corresponde à cicatrização por primeira intenção, que caracteriza-se por limitado dano ao tecido e fácil resolução do processo; quando existe uma perda mais extensa de células e de tecido, o processo de reparação é mais complicado, pois um abundante tecido de granulação se forma para preencher a ferida e completar a reparação, sendo esse processo conhecido como cura ou cicatrização por segunda intenção, a qual envolve grande formação de tecido de granulação, inflamação mais intensa e talvez o que mais diferencie da cura por primeira intenção seja a característica de *contração* da ferida devido à ação de miofibroblastos. A cura por segunda intenção segue aproximadamente a mesma cronologia de eventos, porém demanda mais tempo para se concretizar.

**KANHBERG & THILANDER** <sup>24</sup> (1982) num experimento realizado em palato de ratos normais, onde provocavam feridas padronizadas com bisturi circular ( "punch" ) de 3 mm de diâmetro, avaliaram achados clínicos, fotográficos ( fechamento das feridas ) e histológicos, encontrando que a cura total das

feridas se estabelecia em torno de três semanas, e, através de medidas fotográficas, uma redução de 50% no tamanho das feridas era encontrada entre 7 e 10 dias. Os mesmos autores em 1984<sup>25</sup>, realizaram outro trabalho com a mesma metodologia, acrescentando outro grupo de animais onde se utilizou eletrocauterização das feridas deixando tecido ósseo totalmente descoberto. Os autores encontraram que no grupo controle as feridas estavam totalmente epitelizadas em torno de 3 semanas, porém o grupo com eletrocauterização neste mesmo período apresentava parte das feridas com ausência de epitélio, fotograficamente encontrou-se atraso na reparação na primeira semana, mas uma aceleração era encontrada entre os dias 7 e 14, porém no 14<sup>o</sup> dia as feridas eram, em média, 60% maiores que as do controle. Histologicamente, houve uma complicação no padrão de reparação, com necrose profunda no tecido ósseo e seqüestro de fragmentos ósseos. Ainda **KANBERG & THILANDER**<sup>26</sup> (1987) dentro da mesma metodologia, observaram o efeito da radiação sobre o processo de reparação em feridas no palato de ratos, concluindo que a cura dessas feridas foi muito prejudicada com o uso de 20 Gy de radiação, com reações inflamatória e necrose moderadas, porém com grande superfície de ferida ainda aberta após três semanas, considerando ainda que, quando a dose de radiação era de 16 Gy, a cura era mais lenta que no controle, porém não tão complicada quanto ao grupo de 20 Gy, demonstrando relação direta dose-efeito.

**BODNER et al.**<sup>4</sup> (1992) trabalhando com ratos sialadenectomizados (remoção das glândulas submandibulares e sublinguais e ligadura dos ductos parotídeos), onde confeccionaram feridas com 3 mm de diâmetro no palato dos animais e observaram a evolução da ferida com 3, 7, 14, 21 e 28 dias. Os resultados demonstraram que a diminuição da ferida observada fotograficamente

foi discretamente menor no grupo de ratos sialadenectomizados do que no controle, porém não estatisticamente significativa, já a área de inflamação do grupo teste foi significativamente maior que o controle nos períodos de 3,7 e 14 dias, tornando-se não significativa aos 21 e 28 dias. A diferença no processo de reparação avaliada pela área de tecido conjuntivo neo-formado. Durante a 1ª e 2ª semanas após a produção das feridas, a área de conjuntivo novo era aproximadamente 33% menor (  $p < 0.05$  ) que o controle; 3 semanas após ( 21 dias ) grande quantidade de células inflamatórias podiam ser vistas sob o epitélio nos animais experimentais, enquanto que no controle, tecido conjuntivo organizado e osso neoformado eram vistos. Com 4 semanas ( 28 dias ) a pequena diferença entre os grupos não era estatisticamente significativa .

**BODNER et al,** <sup>5</sup> (1993) utilizando-se da mesma metodologia do trabalho anterior, porém com feridas de diâmetro diferente ( 3mm e 5 mm ), observaram que nas feridas menores ( 3 mm ) o tamanho das mesmas nos animais teste e controle não foi diferente estatisticamente, em contraste com as feridas maiores ( 5 mm ), que tiveram seu tamanho maior (  $p < 0.05-0.01$  ) nos animais xerostômicos do que nos controles, nos dias 7, 14 e 21. No dia 28, a diferença passou a ser estatisticamente não significativa. Com relação ao processo de reparação, medido neste caso pela área de tecido conjuntivo neoformado, houve menores áreas nos animais experimentais do que nos controles. Essas diferenças foram observadas entre 7 e 21 dias nas feridas pequenas ( 3 mm ) e entre os dias 14 e 28 nas feridas maiores ( 5 mm ). Esses resultados , segundo os autores, indicam que a reparação tecidual é atrasada em animais xerostômicos e que as feridas maiores são mais sensíveis à xerostomização do que as menores.

### 3.2. Processo de reparação com utilização de hemostáticos

Segundo **JEFFERY et al.**<sup>23</sup> (1982) uma característica importante mas pouco estudada nos agentes hemostáticos, é o comportamento dos mesmos após sua utilização. Especificamente, um hemostático ideal, após servir seu propósito primário, deveria sofrer biodegradação com nenhum efeito adverso hemostático, hemodinâmico, anatômico ou mudanças teciduais estruturais, não devendo promover qualquer barreira ao processo normal de reparação.

**SCHITTEK et al.**<sup>44</sup> (1976) relatam que após trauma, queimadura e excisões, o sangramento é excessivo e de difícil controle. Os mesmos autores citam o uso do colágeno microcristalino como um potente hemostático para essas situações, porém, parece importante estudar o comportamento do mesmo, incluindo outros efeitos além da hemostasia. Em seu trabalho, avaliaram o efeito do colágeno microcristalino em feridas padronizadas em dorso de ratos, medindo-as manualmente e com fotografias através do uso de planímetro, encontrando os grupos teste e controle sem diferenças estatisticamente significantes com relação ao tamanho das feridas medidas diariamente, concluindo que esse produto possui excelente capacidade hemostática, aparentando não possuir efeitos adversos sobre o processo de reparação.

**VISTNES et al.**<sup>51</sup> (1974), utilizando-se de técnicas fotométricas e de radioisótopos, encontraram uma redução de 40 à 50% no volume de sangue perdido em indivíduos em que se utilizou o colágeno microcristalino, quando comparado à um controle.

**HUNT e BENOIT**<sup>21</sup> (1976) executaram um experimento utilizando felinos para avaliar o efeito do colágeno microcristalino na reparação em alvéolos após

extração, encontrando que a resposta inflamatória normalmente se mostrava mais pronunciada nas quatro primeiras semanas de estudo nos alvéolos contendo o material testado. Porém, os autores sugerem que o colágeno microcristalino não parece retardar o processo de reparação, uma vez que tecido de granulação neo-formado e osso eram freqüentemente observados em íntimo contato com o produto em porções mais profundas do alvéolo, onde a inflamação era mínima. **BENOIT & HUNT<sup>2</sup>** (1976) também realizaram um trabalho em alvéolo de felinos, comparando o efeito hemostático e de reparação do colágeno microcristalino e do *Gelfoam*<sup>®</sup>, onde não encontraram diferenças estatisticamente significantes entre os dois com relação ao tempo de hemostasia ( *Avitene*<sup>®</sup> =  $1.23 \pm 1.04$  seg., contra  $1.42 \pm 1.33$  seg. do *Gelfoam*<sup>®</sup> ), segundo os autores, isso se deve provavelmente ao fato do alvéolo alojar ambos os materiais favorecendo o efeito mecânico dos mesmos igualmente. Com relação à avaliação histológica, segundo os autores, a seqüência de eventos e o tempo de reparação da ferida pareceu muito semelhante entre os dois materiais, porém nos períodos iniciais, os alvéolos tratados com o *Avitene*<sup>®</sup> pareceram ter uma reação inflamatória um pouco mais densa, possivelmente causada pela maior densidade desse material em comparação com o *Gelfoam*<sup>®</sup>. Os autores citam que nem no grupo do *Avitene*<sup>®</sup> e nem no do *Gelfoam*<sup>®</sup>, pareceu haver um efeito de retardo na proliferação do tecido de granulação ou de osso, pois ambos os novos tecidos com freqüência eram observados em íntimo contato com fragmentos desses materiais em áreas de pouca inflamação.

**WIRTHLIN et al.**<sup>53</sup> (1980) relataram sua experiência com utilização do colágeno microcristalino em cirurgias periodontais ( principalmente em áreas doadoras de enxerto gengival livre no palato ), onde citam que o hemostático

levou à uma rápida cessação da hemorragia, necessitando pequenas quantidades adicionais do material, principalmente nas margens das feridas, para obtenção de hemostasia completa. Ainda segundo os autores, no primeiro dia pós-operatório, os sítios se apresentavam com um coágulo estável e sem relato pelos pacientes de sangramento e/ou desconforto pós-cirúrgico. Entre o 3<sup>o</sup>. e 5<sup>o</sup>. dias era normalmente observado odor condizente com necrose, o que, conforme os autores, após um exame mais minucioso, nenhum sinal de infecção e nenhuma evidência clínica de necrose foram observados. Apesar do odor, o processo de reparação foi considerado clinicamente normal. Os autores também discutem a facilidade de utilização do colágeno microcristalino, permitindo ao cirurgião se ater mais à região receptora de um enxerto e com o próprio enxerto, deixando a área doadora protegida e sem sangramento, evitando o inconveniente de suturas, eletrocoagulação ou injeção de adrenalina, reduzindo o tempo de compressão digital para obtenção da hemostasia. **SAROFF et al.**<sup>42</sup> (1982), avaliaram clínica e fotograficamente o processo de reparação no palato de pacientes, onde utilizaram o colágeno microcristalino ( *Avitene*<sup>®</sup> ) como hemostático em áreas doadoras de enxerto. Para avaliar o processo de reparação, os autores utilizaram corante ( azul de toluidina ) na ferida e em seguida fotografaram as mesmas com 2, 7, 14 e 28 dias, até que a ferida não mais retivesse a coloração, ou seja, quando houvesse total reepitelização da ferida , segundo os autores, devido ao azul de toluidina aderir apenas à tecidos não epiteliais. Como conclusão, os autores encontraram que o colágeno microcristalino, além de excelente hemostático, não afeta clinicamente a qualidade ou o tempo de reparação, pois ambos os grupos do estudo

( experimental e controle ), demonstraram epitelização e maturação da superfície da ferida dentro de 4 semanas.

Para **KRAMER & POLLACK**<sup>29</sup> (1982) a hemorragia excessiva durante e/ou após a cirurgia periodontal não é uma problema comum, entretanto, vários graus de sangramento pós-operatório podem ocorrer, especialmente em superfícies desnudas de epitélio, ou seja, naquelas cirurgias onde o tecido conjuntivo permanece exposto até a colocação de uma proteção ( gengivectomias, enxerto gengival livre, retalho deslocado lateralmente e alguns casos de retalhos divididos e reposicionados apicalmente ). Os autores comentam que apesar dos esforços dos cirurgiões, algum sangramento pode persistir por várias horas, o que normalmente assusta o paciente, causa desconforto e pode interferir com o processo de reparação normal, principalmente naqueles casos que apresentam formação de grandes coágulos, que deslocam a proteção da ferida ( cimento cirúrgico ) com persistência do sangramento. Em seu trabalho, esses autores demonstram que o colágeno microcristalino, avaliado clinicamente e histologicamente através de biópsias retiradas do palato em áreas doadoras de enxerto, não apresenta influência na qualidade do processo de reparação nessas áreas e clinicamente, após 1 ou 2 semanas, não foi possível distinguir a superfície que foi coberta com colágeno microcristalino daquela onde não se utilizou nenhum método hemostático.

**STEIN et al.**<sup>47</sup> (1985) utilizando esponjas de colágeno ( *Collastat*<sup>®</sup> ) que são compostas principalmente de colágeno tipo I purificado à partir de tendão de Aquiles bovino e que devido à sua estrutura porosa pode absorver em torno de 60 vezes o seu próprio peso em fluido. Os autores utilizaram essas esponjas de

colágeno em 20 pacientes em áreas doadoras de enxerto no palato, obtendo ótimo efeito hemostático, sem queixas pós-operatórias no que concerne sangramento e ausência de sinais de infecção, necrose ou reação tecidual adversa, sem comprometimento no processo de reparação.

O Alginato de cálcio ( *BritCair Ltd.* ) foi primeiramente introduzido como protetor de ferida e, segundo **BLAIR et al.**<sup>3</sup>,(1990) esse produto quando em contato com o sangue ativaria a coagulação através da estimulação de plaquetas e dos fatores VII, IX e X, devido principalmente à ação dos íons cálcio e pelo alginato que se transforma num gel que não se fixa ao coágulo, não o perturbando quando da sua remoção. Os autores também citam que este produto é absorvível onde quantidades limitadas do mesmo podem ser deixadas no local sem prejuízo à reparação.

**BARNETT & VARLEY**<sup>1</sup> (1987) trabalhando com o alginato de cálcio ( *Sorbsan*<sup>®</sup> ) que é considerado um excelente hemostático tópico, prevenindo a desidratação exagerada da ferida, sendo facilmente degradado e absorvido, avaliaram, histologicamente, o efeito desse produto no processo de reparação em pele de suínos, onde produziram feridas padronizadas e coletaram biópsias com 1, 3, 5 e 14 dias, e compararam com um controle. Os autores concluíram que o alginato de cálcio, além da ação hemostática, pode ser utilizado como proteção de feridas, visto que o mesmo é bem tolerado pelos tecidos , sendo também responsável pela pouca desidratação da ferida, o que favoreceria a reparação. As feridas onde utilizou-se o alginato de cálcio apresentaram maior quantidade de infiltrado inflamatório, principalmente composto de leucócitos, o que segundo os autores, é esperado quando materiais biodegradáveis são

empregados, o que não deprecia a eficácia do alginato de cálcio. **MATTHEW et al.**<sup>35</sup> (1994) citam em seu trabalho que alguns procedimentos cirúrgicos na cavidade bucal podem resultar áreas consideráveis de mucosa desnuda ( conjuntivo exposto ) e que uma cobertura biológica é vantajosa para uma proteção física, minimizando a contaminação microbiológica, prevenindo o crescimento exagerado de tecido de granulação e minimizando a contração da ferida e formação de escaras. Os autores realizaram um estudo em bochecha de cães beagle, onde excisavam um porção circular de mucosa com 2.0 cm de diâmetro por aproximadamente 2 mm de profundidade, realizada sempre pelo mesmo operador, onde buscaram avaliar a eficácia hemostática do alginato de cálcio, bem como seu efeito no processo de reparação, quando comparado à um controle constituído apenas de compressão digital com gaze cirúrgica. Os animais foram sacrificados com 1, 4, 12 e 24 semanas e os resultados demonstraram que houve uma redução significativa no número de pontos sangrantes residuais quando da utilização do hemostático e com relação ao efeito sobre a reparação, não houve diferenças significativas entre teste e controle no que concerne ao número de capilares, células inflamatórias e fibroblastos, não parecendo, segundo os autores, acelerar o processo de reparação.

Assim sendo, em virtude de não existirem pesquisas avaliando o efeito do SGB no processo de reparação, nos propusemos a desenvolver este trabalho e compará-lo aos resultados de outros hemostáticos citados na literatura.

**PROPOSIÇÃO**

## **PROPOSIÇÃO**

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do subgalato de bismuto no processo de reparação de feridas em dorso de ratos através da análise histológica, histométrica e macroscópica.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **1) SELEÇÃO DA AMOSTRA**

Para o presente trabalho foram utilizados 55 animais ( *Rattus norvegicus albinus* ) adultos, machos e com peso variando entre 235 à 275 gramas, procedentes do biotério central da UNICAMP ; os mesmos foram mantidos por um período de 20 dias no biotério da FOP-UNICAMP para adaptação ao novo ambiente, sendo tratados com ração Labina® e água "ad libitum".

### **2 ) PREPARO DOS ANIMAIS**

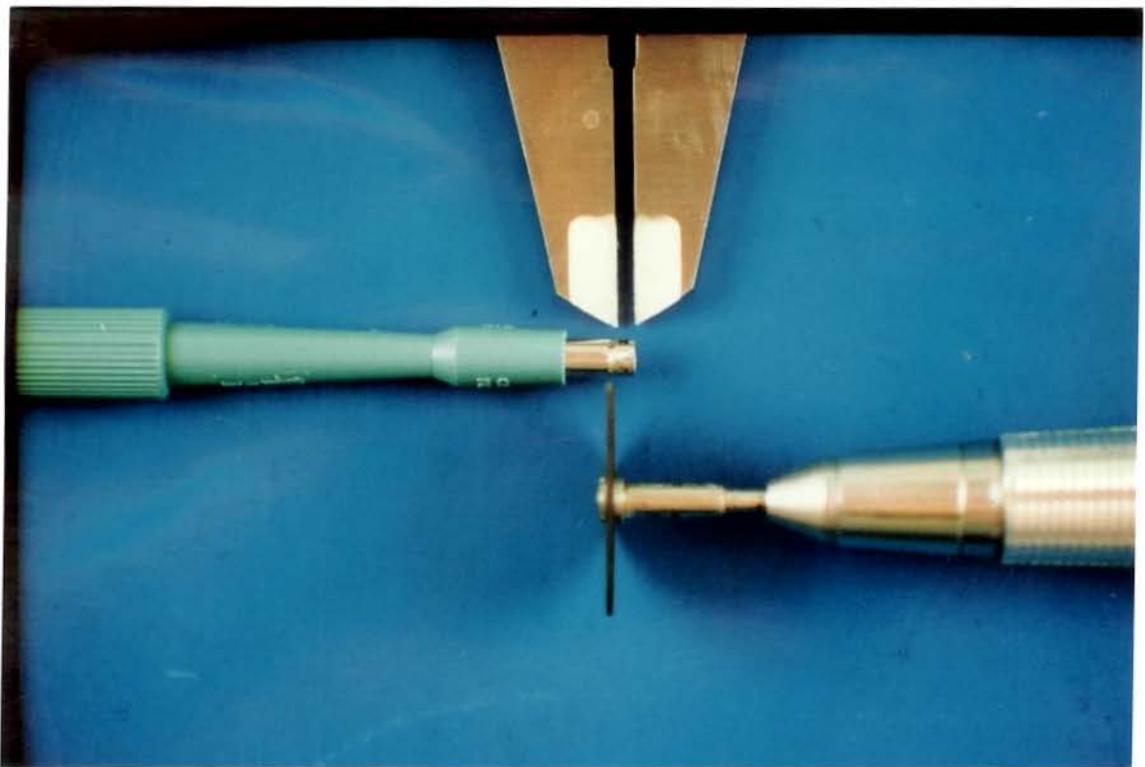
Após pesados, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de pentobarbital sódico à 3% ( Hypnol® )\* na dosagem de 40 mg / kg , recebendo em média 0,3 ml da solução anestésica. Em seguida, procedeu-se a tricotomia no dorso dos animais envolvendo uma área de aproximadamente 5,0 cm x 2.5 cm, suficiente para comportar a confecção das duas perfurações.( uma teste, no lado direito e outra controle, no lado esquerdo do dorso de cada animal).

Estas perfurações foram executadas com um bisturi circular ou "punch" (\*\*\*) de 3.5 mm de diâmetro previamente preparado. no qual foi confeccionado um sulco demarcador à dois milímetros da borda cortante do mesmo, com um disco de carborundum com o objetivo de padronizar a profundidade das feridas durante o ato cirúrgico( fig. 2 ).

\* FONTOVETER-CRISTÁLIA ( Itapira, São Paulo, Brasil )

\*\*\* MILTEX Co. ( Lake Success, N.Y., U.S.A. )

Com a utilização deste bisturi circular ( **BODNER**<sup>4</sup> ( 1993 ) **BODNER**<sup>5</sup> ( 1993 ) **KHANBERG & THILANDER**<sup>24</sup> (1982 ) ) foram então realizadas as perfurações ( fig. 3 ), sempre pelo mesmo operador, preservando uma distância aproximada de dois centímetros entre elas, procurando ainda a manutenção de uma margem de segurança de aproximadamente um centímetro de área tricotomizada em todas as direções no leito previamente preparado. Após a realização das perfurações, a porção de tecido incisado era pinçada e excisada na sua base com auxílio de tesoura cirúrgica ( fig. 4 ), com o intuito de manter uma profundidade uniforme de 2mm.



**FIGURA 2.** Confeção do sulco demarcador, com o auxílio de paquímetro e de disco de carborundum, à 2 mm da borda cortante do bisturi circular, com a finalidade de padronizar a profundidade das feridas,.



FIGURA 3. Confeção da ferida cirúrgica, com o bisturi circular, no dorso de um dos animais, numa profundidade padronizada de 2 mm observada através da demarcação realizada no bisturi.

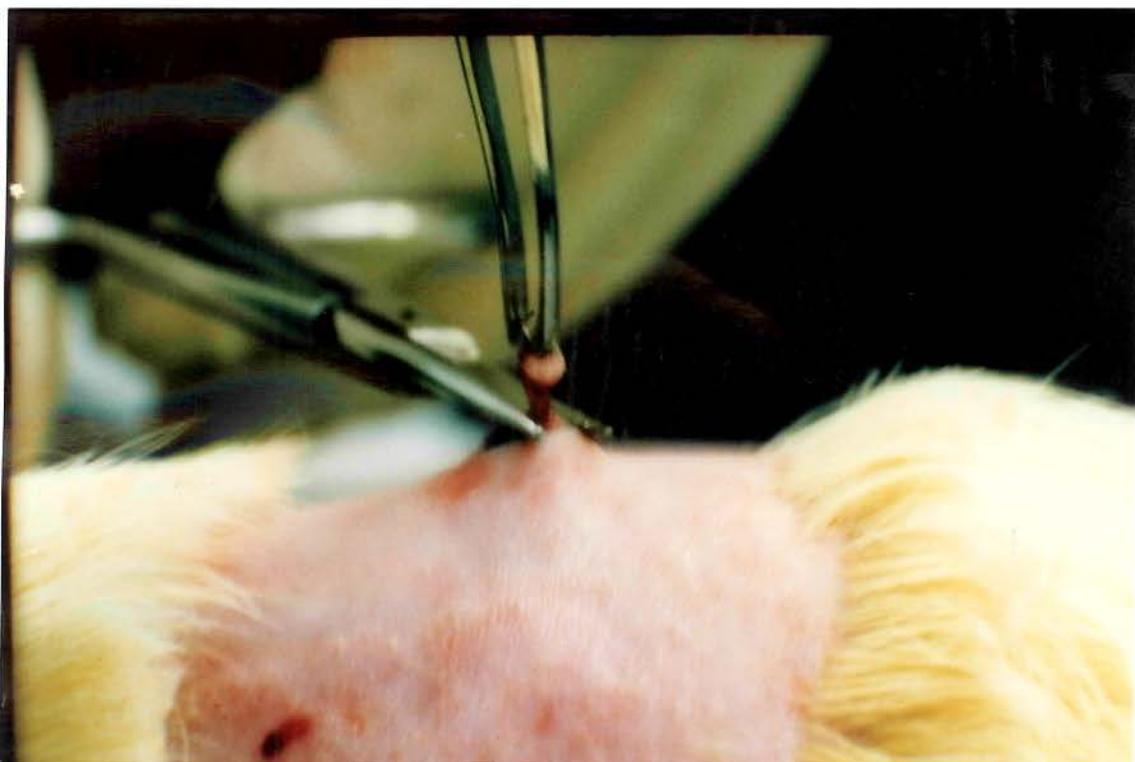


FIGURA 4. Excisão na base da porção do tecido com a utilização de uma tesoura cirúrgica.

As feridas foram então preenchidas com subgalato de bismuto no lado teste( lado direito), o qual foi preparado diluindo-se 14 g do hemostático em 15 ml de solução fisiológica para obtenção de um composto com consistência de "creme dental " ( fig. 5 ), como descrito por **COZZI et al.**<sup>8</sup> (1992). No lado controle ( esquerdo) foi utilizado apenas irrigação de solução fisiológica à 0,9% à temperatura ambiente.

Após essa etapa, nenhum outro procedimento foi executado nos animais.



**FIGURA 5.** Subgalato de bismuto, na consistência pastosa, preparado para utilização, após a adição do soro fisiológico.

### **3) DIVISÃO DOS GRUPOS**

Após preparados, os animais foram separados em dois grupos, como se segue:

#### **3.1) Grupo histológico e histométrico ( grupo I )**

Neste grupo foram utilizados 40 animais, divididos aleatoriamente em 05 sub -grupos conforme o período de sacrifício dos animais ( 01, 04, 07, 11 e 18 dias )

#### **3.2) Grupo macoscópico ( grupo II )**

Para o estudo fotográfico utilizou-se 15 animais nos quais procedeu-se a tomada das fotografias padronizadas nos mesmos períodos determinados( 01, 04, 07, 11 e 18 dias ) para o grupo histológico, não sendo, no entanto, necessário o sacrifício dos animais desse grupo.

### **4) SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS DO GRUPO HISTOLÓGICO E OBTENÇÃO DAS NECRÓPSIAS - Grupo I ( histológico e histométrico )**

Durante a fase experimental, os animais não receberam qualquer outro tipo de tratamento. Após completado cada período experimental, os animais foram sacrificados por inalação de dose letal de éter etílico P.A. e foram realizadas as necrópsias com margem de segurança em cada uma das áreas ( teste e controle ).

**SUBGRUPO H I** - animais sacrificados 01 dia após a confecção das feridas.

**SUBGRUPO H II** - animais sacrificados após 04 dias .

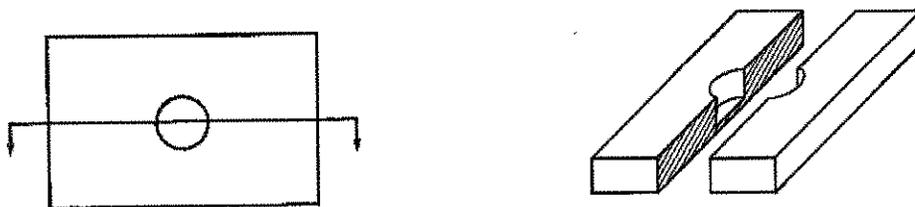
**SUBGRUPO H III** - animais sacrificados após 07 dias

**SUBGRUPO H IV** - animais sacrificados após 11 dias.

**SUBGRUPO H V** - animais sacrificados após 18 dias.

Em seguida, as necrópsias foram fixadas em formol à 10% ( formalina ) por no mínimo 24 horas.

Para o processamento histológico, as peças foram então cortadas no sentido do diâmetro da ferida ( corte transversal ), obtendo-se assim duas metades simétricas ( fig. 6 e 7 ), as quais foram incluídas em parafina num mesmo bloco.



**FIGURA 6.** Desenho esquemático da obtenção das peças para análise histológica e histométrica: corte no maior diâmetro (esquerda); peças simétricas separadas (direita).



**FIGURA 7.** Desenho esquemático das dimensões obtidas após separação das peças (esquerda), observando-se o plano de corte com o qual as peças foram incluídas em parafina (direita)

Os cortes obtidos, foram seriados, com espessura de  $7 \mu\text{m}$ , no sentido transversal da ferida, obtendo-se cortes simétricos a partir do centro da mesma, processados pelos métodos rotineiros, sendo que o primeiro corte foi corado com hematoxilina e eosina ( H.E.) sendo a primeira lâmina do bloco a qual foi escolhida para a realização das medidas ( desde que as mesmas apresentassem boa qualidade com relação ao processamento e coloração ). Essas e as outras lâminas subseqüentes foram usadas para a avaliação histológica., outro lote de lâminas( cortes subseqüentes) foram impregnados por prata, para observação de birrefringência de fibras colágenas em microscopia de polarização.

Os resultados histológicos foram então obtidos através da observação em microscópio ótico comum ( aumento de 10 X e 40 X ) e microscópio de polarização ( aumento de 16X ).

Para avaliação histométrica utilizou-se um aparato de medida constando de microscópio ótico comum ( \* ) ligado à uma microcâmara filmadora ( \*\* ), a qual captava a imagem do microscópio e a transmitia inicialmente a um monitor

\* DIASTAR( N.Y., N.Y., U.S.A. )

\*\* SONY, modelo CCD - IRIS color video camera (JAPÃO)

de vídeo (\*\*\*), para então ser digitalizada em um microcomputador 486/ DX4 66 MHz( 16 Mb de memória RAM ) o qual estava equipado com um programa específico para digitalização e leitura das imagens( \*\*\*\* ) como pode ser observado nas figuras 8, 9, 10 e 11, sendo realizada apenas uma medida por lâmina. Os subgrupos foram avaliados histometricamente em aumento de 2,5 X, conforme o quadro a seguir:

- I) Subgrupo HI: 1 dia - avaliação da medida de área de tecido ulcerado ( área de ferida )
- II ) Subgrupo H II: 4 dias- avaliação da medida da distância entre as bordas do epitélio da ferida.
- III ) Subgrupo H III : 7 dias - avaliação da área de tecido de granulação.
- IV ) Subgrupo H IV : 11 dias - avaliação da área de tecido de granulação.
- V ) Subgrupo H V : 18 dias - avaliação da área de tecido de granulação.

\*\*\* SONY (JAPÃO)

\*\*\*\* MOCHA 1.2 Image Analysis software, versão 1992-1994 (Jandel incorporation, U.S.A.)



FIGURA 8. Fotografia do microscópio óptico acoplado à microcâmera e estes ao monitor de vídeo.



FIGURA 9. Fotografia do microcomputador com o programa analisador de imagens.

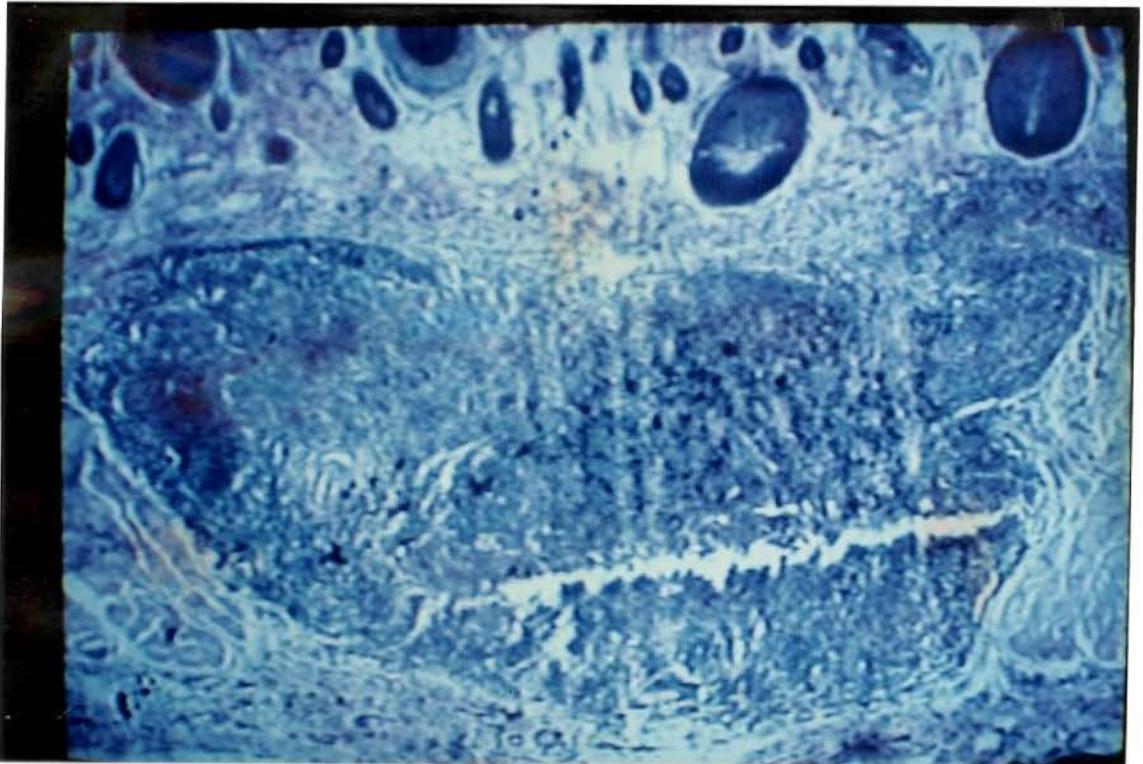


FIGURA 10. Imagem parcial do tecido de granulação captada pela microfilmadora do microscópio óptico sendo vista no monitor de vídeo.

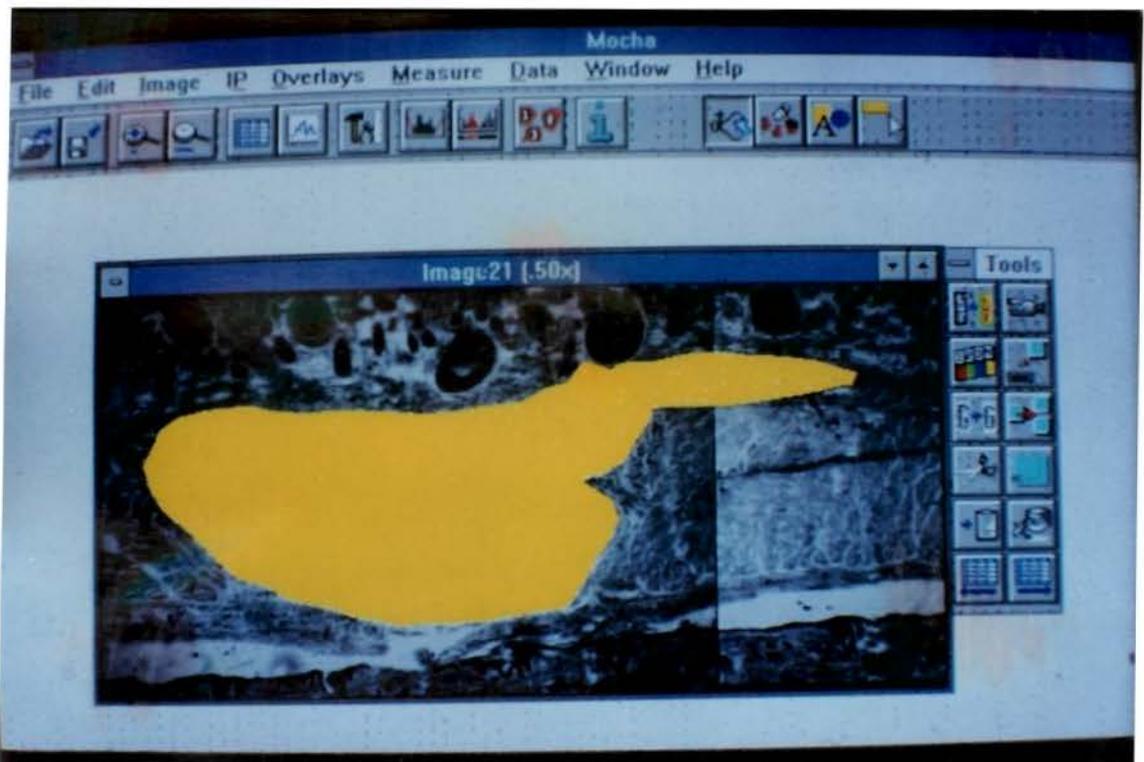


FIGURA 11. Área do tecido de granulação que foi medida a partir da imagem da figura 10 digitalizada no vídeo do computador.

## 5) AVALIAÇÃO DO GRUPO II ( macroscópico )

Foram utilizados 15 animais, que não foram sacrificados no final dos períodos estudados visto que o objetivo desta etapa era exclusivamente o acompanhamento e documentação fotográfica de todos os animais, em todos os períodos analisados.

As lesões provocadas de modo idêntico ao do grupo anterior, foram fotografadas ( fig.12 ) com máquina fotográfica ( \* ) fixada em mesa estativa e padronizada com abertura do diafragma f 1: 27 , velocidade do obturador 1/90 seg. e escala de relação de aumento estabelecido em 1:1, mantendo-se constante a distância compreendida entre plano do filme ( \*\* ) e plano da imagem ( ferida ) em 0.307 m ou 30, 7 cm ( medida encontrada na lente ).

Para tomada das fotografias, os animais foram anestesiados com éter etílico P.A., seguindo a cronologia anterior, isto é:

**SUBGRUPO F I** - lesões teste e controle fotografadas após 1 dia .

**SUBGRUPO F II** - lesões teste e controle fotografadas após 4 dias;

**SUBGRUPO F III** - lesões teste e controle fotografadas após 7 dias;

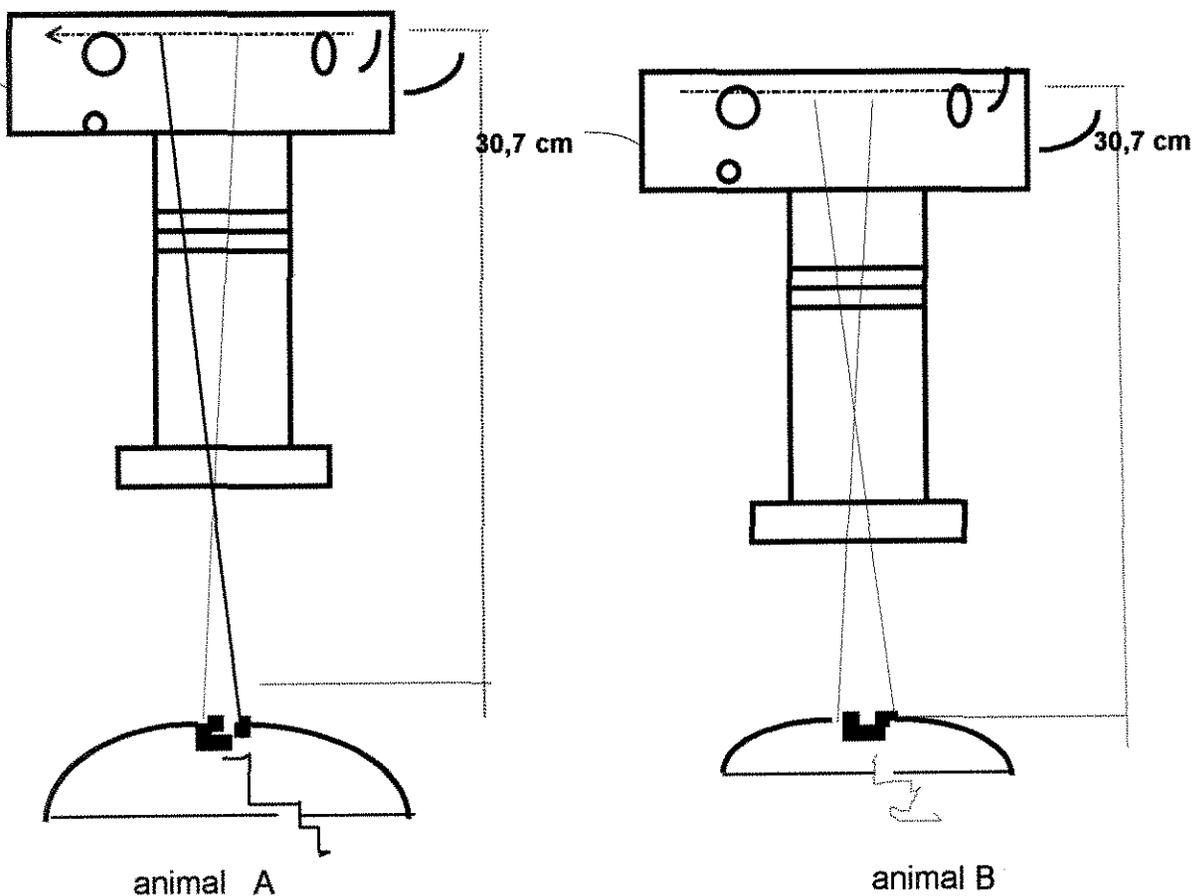
**SUBGRUPO F IV** - lesões teste e controle fotografadas após 11 dias;

**SUBGRUPO F V** - lesões teste e controle fotografadas após 18 dias.

---

\* CANON EOS - Rebel, lentes CANON "macro lens" EF 100 mm 1:2.8 e flash circular MICROLITE CANON ( Tóquio, JAPÃO)

\*\* KODAK EKTACRHOME, ASA 100 (Sao Paulo, S.P., Brasil)



**FIGURA.12** Desenho esquemático demonstrando que, mesmo variando a espessura do animal, a distância entre plano do objeto ( ferida no dorso do animal ) e plano do filme (linha tracejada na horizontal ) se mantém constante. ( linha pontilhada na vertical)

A seguir, os filmes fotográficos foram processados de modo uniforme, seguindo as especificações do fabricante, obtendo-se, em cada período avaliado, 15 diapositivos das lesões teste e 15 diapositivos das lesões controle, as quais

foram digitalizadas em "SCANNER" HP/ 4C<sup>®</sup>(\*) com uma placa de apoio para transparência HP/4C-T<sup>®</sup> (\*), o que permitiu a digitalização dessas imagens à partir dos diapositivos. As fotografias foram digitalizadas em escala de 800 % ( para facilitar a leitura das áreas das feridas), com "zoom" padronizado em uma área de 5 cm de largura por 5 cm de altura, obtendo-se imagens de mesmas proporções em todos os grupos.

As imagens das lesões digitalizadas foram levadas a um microcomputador (PC 486 DX4, com 16 Mb de memória RAM e HD com 840 MB) e medidas através do programa *GLOBAL LAB IMAGE* e *GLOBAL LAB ACQUIRE* ( \*\* ), comparando-se a contração lateral das feridas tanto do lado teste como do lado controle em todos os períodos analisados, através da medida do perímetro das feridas, sendo realizadas três medidas de cada ferida, obtendo-se a média das mesmas. Para a medida tomou-se como padrão a borda ulcerada mais externa ( região limítrofe entre tecido ulcerado e saudável ou curado ). Nos períodos mais avançados ( 11 e 18 dias ), quando a ferida não apresentava mais área de ulceração e/ou escara, considerava-se reparado e, portanto, com medida igual a zero.

---

\* HEWLETT PACKARD ( Palo Alto, Califórnia.Estados Unidos da América)

\*\*DATA TRANSLATION, Inc. 1995. (USA)

## 6. PARÂMETROS PARA AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA QUALITATIVA

Os parâmetros observados na avaliação histológica ( H.E.) das lâminas foram os seguintes:

- Avaliação das bordas epiteliais (aumento de 10 X );
- Tipo de reação inflamatória ( aumento de 40 X );
- Evolução do processo de reparação;
- Avaliação de vasos neoformados.

Para avaliação em microscopia de polarização, observou-se o brilho característico dos feixes de fibras colágenas para avaliação da maturação dos mesmos, nos vários períodos analisados.

## 7. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância ( ANOVA ) e desde que fossem encontradas interações entre as causas de variação ( dia e/ou tratamento ), tanto para o grupo histométrico quanto para o fotográfico, os dados serão submetidos a outros testes estatísticos ( teste t de student” ou teste t de comparações múltiplas , todos em nível de 5% ).

## **RESULTADOS**

## RESULTADOS

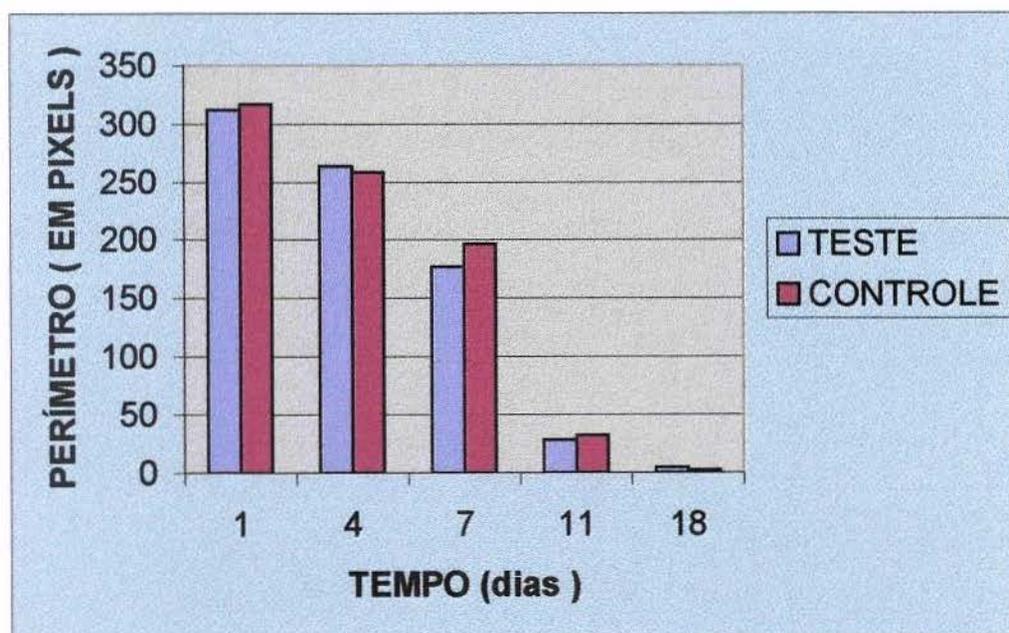
### **I - RESULTADO FOTOGRÁFICO**

Para a obtenção dos resultados fotográficos foram utilizados 15 animais que não foram sacrificados, pois o objetivo dessa análise foi simplesmente acompanhar, macroscopicamente, a evolução do processo de reparação; assim sendo, foram fotografados sempre os mesmos animais nos vários períodos avaliados ( 01, 04, 07, 11 e 18 dias ). Para a tomada das fotografias foram padronizados não só a velocidade do obturador mas também a abertura do diafragma e a distância entre o plano do filme e o plano da imagem. A análise digitalizada das fotografias nos vários períodos estudados, revelou que não houve efeito significativo do tratamento ( SGB ) sobre o perímetro das feridas (Tab. 1/gráf. 1), quando avaliado estatisticamente (Tab.2). A análise de variância ANOVA mostrou ainda que não foi detectada significância na interação do tempo com o tratamento, onde o comportamento do fechamento lateral das feridas foi similar, tanto para os lados teste quanto para os lados controle. Em complemento da análise de variância, foi efetuado um estudo da regressão linear, que resultou numa reta única, mostrando, mais uma vez, que o padrão do fechamento lateral das feridas, avaliado fotograficamente, não apresentou diferença estatisticamente significativa para os dois lados (teste e controle), como pode ser observado no gráfico 2.

Na prancha da avaliação fotográfica ( fig. 13 ) pode-se observar o padrão de fechamento lateral das feridas, ou seja, a diminuição do perímetro das feridas conforme a evolução da reparação tecidual em relação aos períodos estudados, de acordo com o quadro abaixo:

**Tabela 1.** Médias dos valores do perímetro das feridas nos dias 1, 4, 7, 11 e 18 dos lados teste e controle. ( valores em pixels )

Tratamentos	DIA 1	DIA 4	DIA 7	DIA 11	DIA 18
<b>TESTE</b>	311,843 ±22,630	263,532 ±63,274	176,918 ±34,812	28,603 ±28,786	4,463 ±11,925
<b>CONTROLE</b>	316,857 ±38,963	258,766 ±50,301	195,855 ±42,963	32,109 ±32,344	2,505 ±9,701

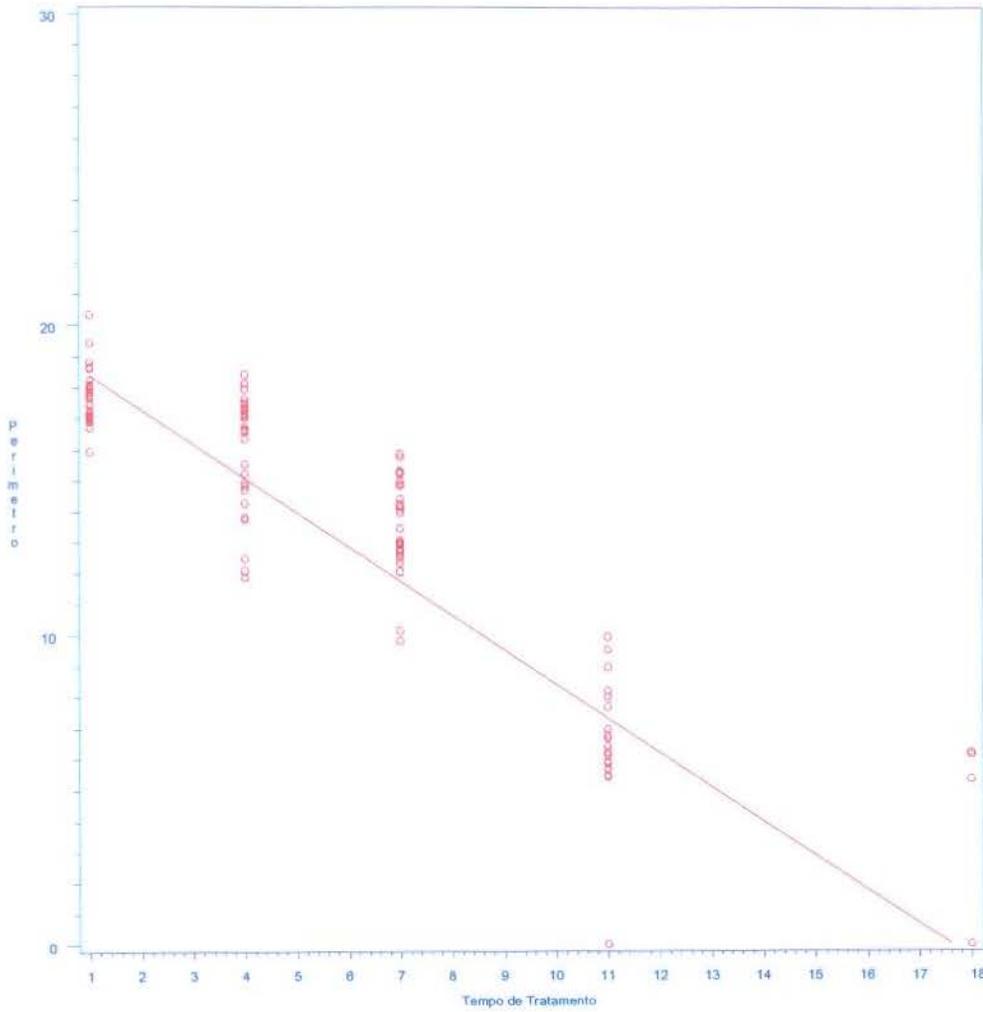


**Gráfico 1 - Médias do perímetro das feridas nos períodos de observação**

**Tabela 2.** Análise de variância dos dados de fechamento lateral das feridas, segundo modelo de parcelas subdivididas, tomando o tratamento como parcela e o tempo como subparcela.

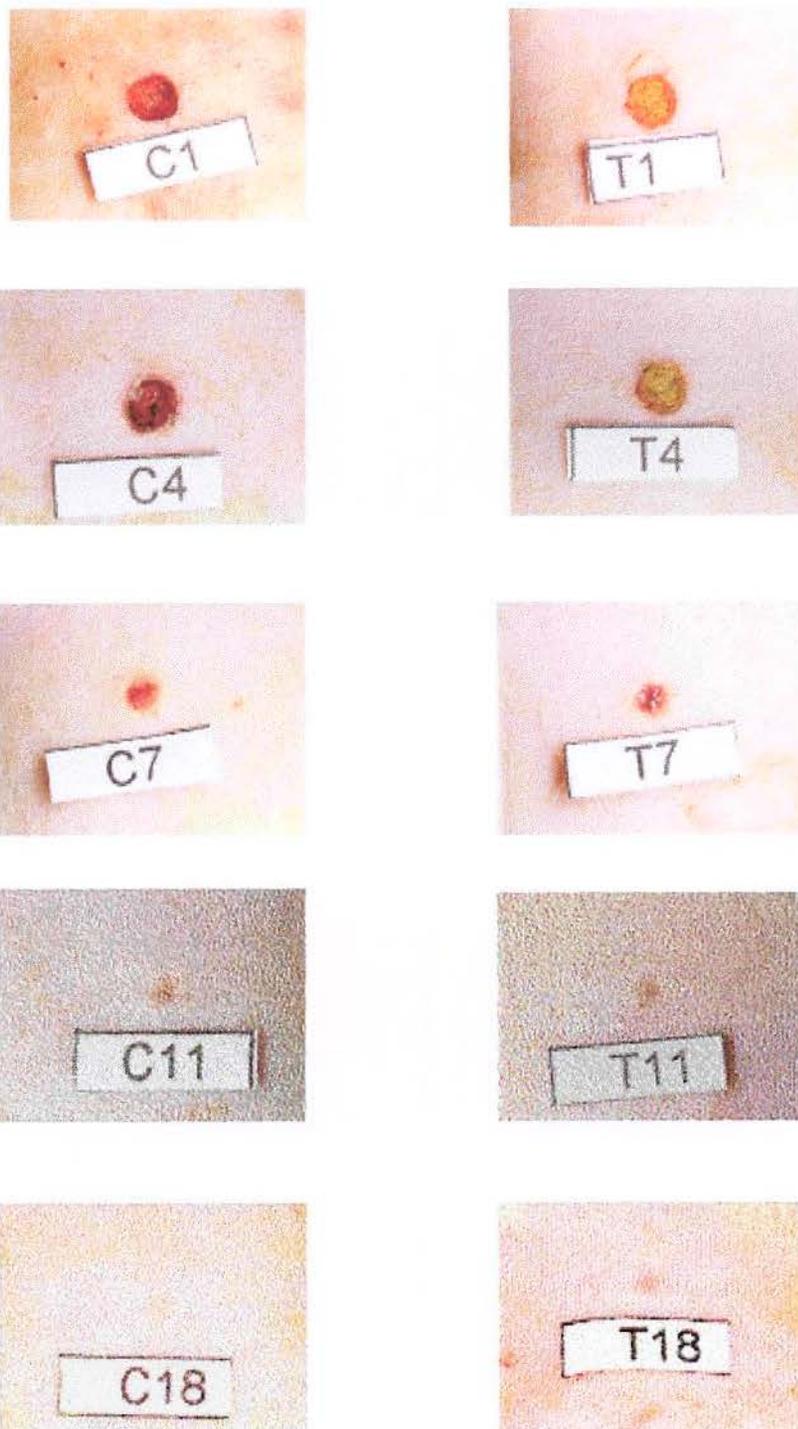
<b>CAUSA</b>	<b>DE G.L.</b>	<b>S.Q.</b>	<b>Q.M.</b>	<b>F</b>
<b>VARIAÇÃO</b>				
MODELO	37	7053.6	190.64	42.32
TRATAMENTO	1	0.5172	0.5172	0.09
RESÍDUO ( A )	28	153.25	5.4734	1.22
TEMPO	4	6895.5	1723.9	382.7
TRAT.* TEMPO	4	4.3320	1.0830	0.24
RESÍDUO ( B )	112	504.50	4.5045	
<b>TOTAL CORRIGIDO</b>	<b>149</b>	<b>7558.10</b>		

**ANOVA**



**GRÁFICO 2.** Regressão linear do perímetro da ferida em função do tempo decorrido no experimento para os lados teste e controle. (Equação do perímetro em função do tempo #  $\text{Perímetro} = 19,4932 - 1,107258 \times \text{tempo}$  [ $**R^2 = 85,06\%$ ])

**FIGURA 13.** Prancha da avaliação fotográfica, mostrando o padrão de contração das feridas no decorrer do período experimental ( T1 significa ferida teste com 1 dia e C1, ferida controle com 1 dia e assim sucessivamente )



## II- RESULTADOS HISTOLÓGICOS (Coloração por Hematoxilina e Eosina )

A avaliação histológica utilizando-se essa coloração tem por objetivo analisar o comportamento do tecido durante o processo de reparação através da observação da morfologia dos tecidos envolvidos nesse processo, principalmente o tecido conjuntivo néo-formado ( tecido de granulação ).

### DIA 1- Reparação tecidual

#### LADO CONTROLE

**Aumento menor (10X)** - Nesse aumento é possível se observar uma área bastante ampla de descontinuidade do epitélio , caracterizando ulceração do mesmo e conseqüente exposição do tecido conjuntivo. Observa-se ainda uma área de necrose superficial na ferida (crosta) caracterizada por uma massa de tecido desorganizado recobrando o tecido conjuntivo. Início de proliferação epitelial à partir das bordas da ferida. ( fig. 14 )

**Aumento maior (40X)** - O tecido conjuntivo se mostra com infiltrado inflamatório moderado, caracterizado, principalmente, pelo predomínio de leucócitos PMN e de alguns macrófagos. Presença de grande quantidade de exsudato inflamatório saindo do conjuntivo em direção ao exterior, coágulo presente em alguns espécimes.

#### LADO TRATADO COM SUBGALATO DE BISMUTO

**Aumento menor (10X)** - Tecido apresentando uma área de necrose superficial, caracterizada por uma massa de tecido desorganizado e pela presença do produto testado, o subgalato de bismuto, tendo coloração escura ( marrom esverdeada ) estando em íntimo contato com o tecido conjuntivo. Observa-se

área de descontinuidade do epitélio ( ulceração ), semelhante àquela encontrada no lado controle, assim como início de proliferação epitelial, à partir das bordas da ferida. ( fig. 15 )

**Aumento maior (40X)** - O infiltrado inflamatório se mostra também moderado à semelhança da área controle, sendo o predomínio de leucócitos polimorfonucleares semelhante em ambos os grupos. O número de macrófagos sugere ser maior no grupo teste.

#### **DIA 4- Reparação tecidual**

##### **LADO CONTROLE**

**Aumento menor (10X)** - No lado controle pode-se observar a migração de células epiteliais à partir das bordas das feridas em direção ao centro , formando uma camada delgada e quase que unidas, com poucas células recobrando o tecido conjuntivo subjacente, correspondendo à região ulcerada. diminuição do tamanho da ferida em relação ao período anterior, porém ferida ainda se apresenta ulcerada. Observa-se ainda a presença de uma camada necrótica na superfície da ferida, porém aparentemente menor que o período anterior estudado. ( fig. 16 )

**Aumento maior (40X)** - Infiltrado inflamatório moderado ainda presente, com predomínio de células linfocitárias; abaixo da zona inflamada há proliferação de fibroblastos e presença de vasos neoformados, sendo alguns destes já ativos demonstrando a evolução da reparação, vê-se ainda poucos feixes de fibras colágenas produzidas na área de tecido de granulação.

## LADO TRATADO COM SUBGALATO DE BISMUTO

**Aumento menor (10X)** - Área ulcerada ainda presente e preenchida com tecido necrótico e por subgalato de bismuto, estando esses invadidos por infiltrado inflamatório, tamanho da ferida parece ser semelhante ao controle; observa-se também migração de células epiteliais que iniciam o recobrimento da ferida. Abaixo da camada com o produto testado, o tecido de granulação está evoluindo com formação de fibras , não havendo diferenças significativas em relação ao controle. ( fig. 17 )

**Aumento maior (40X)** - Neste aumento pode-se observar a presença de vasos neoformados e vários vasos ativos e um infiltrado inflamatório moderado e com predomínio de macrófagos, a formação de novos feixes de fibras ainda é pequena, predominando a quantidade de fibroblastos no tecido de granulação, de maneira bastante semelhante ao controle, no mesmo período.

### **Dia 7- Reparação tecidual**

#### LADO CONTROLE

**Aumento menor (10X)** - Neste período a ferida se apresenta com o epitélio recobrimo toda a extensão da ferida, com aumento do número de camadas de células epiteliais e drástica redução do tamanho da ferida.O infiltrado em contato com a zona necrótica se apresenta muito discreto. ( fig. 18 )

**Aumento maior (40X)** - Com este aumento observa-se um tecido de granulação ainda presença de fibroblastos e de vasos neoformados de vários tamanhos, os feixes de fibras colágenas ainda têm aparência delgada e estão fracamente

coradas, em relação às fibras normais adjacentes à área da ferida. O tecido de granulação se mostra bastante fibroso e menos celular, quando comparado ao período anterior de 04 dias.

#### LADO TRATADO COM SUBGALATO DE BISMUTO

**Aumento menor (10X)** - Com este aumento pode-se observar a ferida praticamente recoberta por uma camada mais espessa de epitélio, à semelhança do lado controle. Uma pequena quantidade de SGB ainda se encontra presente no tecido de granulação. ( fig. 19 )

**Aumento maior (40X)** - No lado teste pode-se ver um tecido de granulação com grande número de fibroblastos, à semelhança do lado controle. Os feixes de fibras colágenas se apresentam ainda pouco espessas .A presença de um infiltrado inflamatório pouco intenso é notório, parecendo predominar macrófagos, principalmente identificáveis ao redor do produto testado. O tecido de granulação se mostra evoluindo normalmente, sem variações significativas quando comparado ao controle. Observa-se o SGB um pouco afastado do tecido de granulação, como que se dirigisse para a profundidade do tecido.

#### **DIA 11- Reparação tecidual**

##### LADO CONTROLE

**Aumento menor (10X)** - Neste período o epitélio apresenta-se recobrindo toda a área da ferida, o número de camadas de células demonstra padrão próximo ao de normalidade, inclusive com formação de queratina, bastante semelhante ao aspecto das áreas vizinhas com epitélio normal, pode-se observar início de formação dos anexos da pele. O tecido de granulação se mostra bastante fibroso

e, conseqüentemente, menos celular; mas ainda se apresenta imaturo em relação ao tecido normal. ( fig. 20 )

**Aumento maior (40X)** - Neste período, o tecido de granulação ainda se mostra com predominância de feixes de fibras. Presença de vasos de maior calibre e de feixes de fibras colágenas mais espessas que o período anterior, mas ainda sem características de normalidade. O aspecto do processo de reparação é normal.

#### LADO TRATADO COM SUBGALATO DE BISMUTO

**Aumento menor (10X)** - Observa-se ainda neste período resíduo do produto testado, onde os bordos da ferida se encontram unidos, demonstrando fechamento da ferida semelhante ao lado controle. Início de formação de quertina e de anexos também observado. ( fig. 21 )

**Aumento maior (40X)** - O tecido de granulação denota bastante igualdade quando comparado ao controle. O SGB se encaminha mais profundidade do tecido, se afastando da área ocupada pelo tecido de granulação, à semelhança do período anterior ( 07 dias).

#### **DIA 18- Reparação tecidual**

##### LADO CONTROLE

**Aumento menor (10X)** - Pode-se observar espessura do epitélio bastante próxima do normal, estando o mesmo recobrendo uma área mínima de tecido de granulação. Nota-se também formação de anexos da pele ainda numa fase

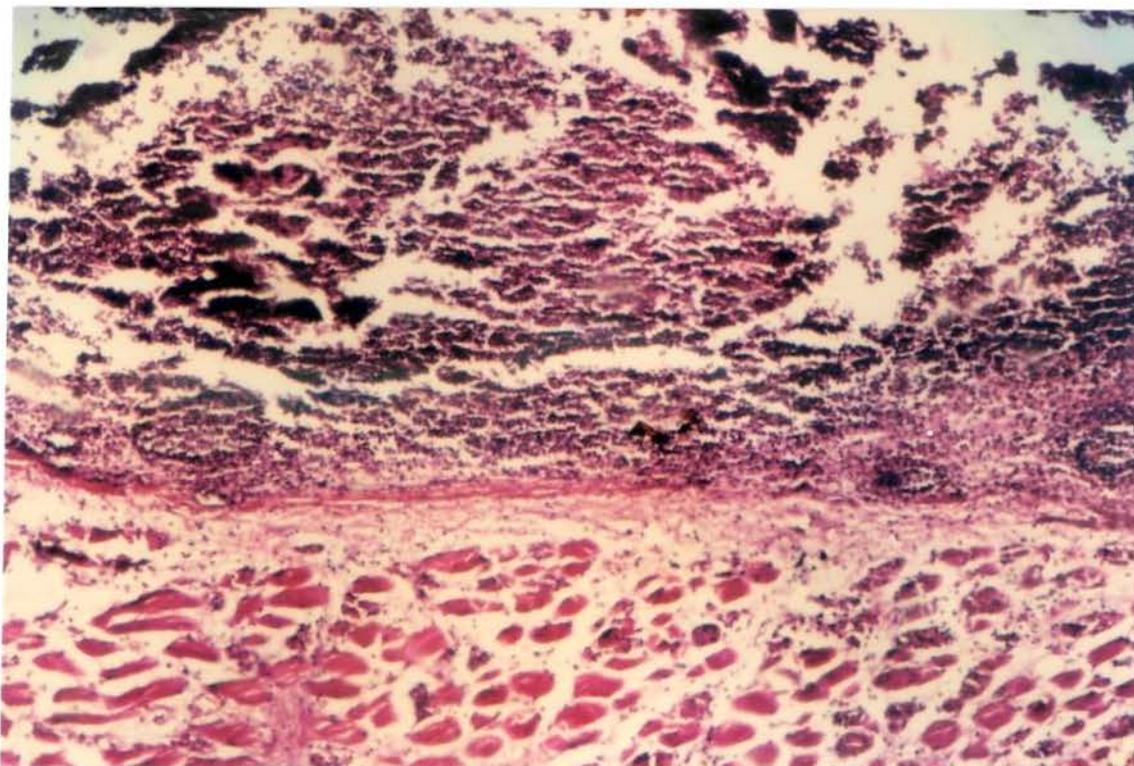
inicial. O tecido de granulação, já bastante reduzido, se mostra mais fibroso.  
( fig. 22 )

**Aumento maior (40X)** - Neste período nota-se que a celularidade de fibroblastos diminui, havendo uma aumento considerável no número e espessura dos feixes de fibras colágenas, chegando a ter um aspecto próximo do normal quando comparadas aos feixes adjacentes que não foram rompidos inicialmente.

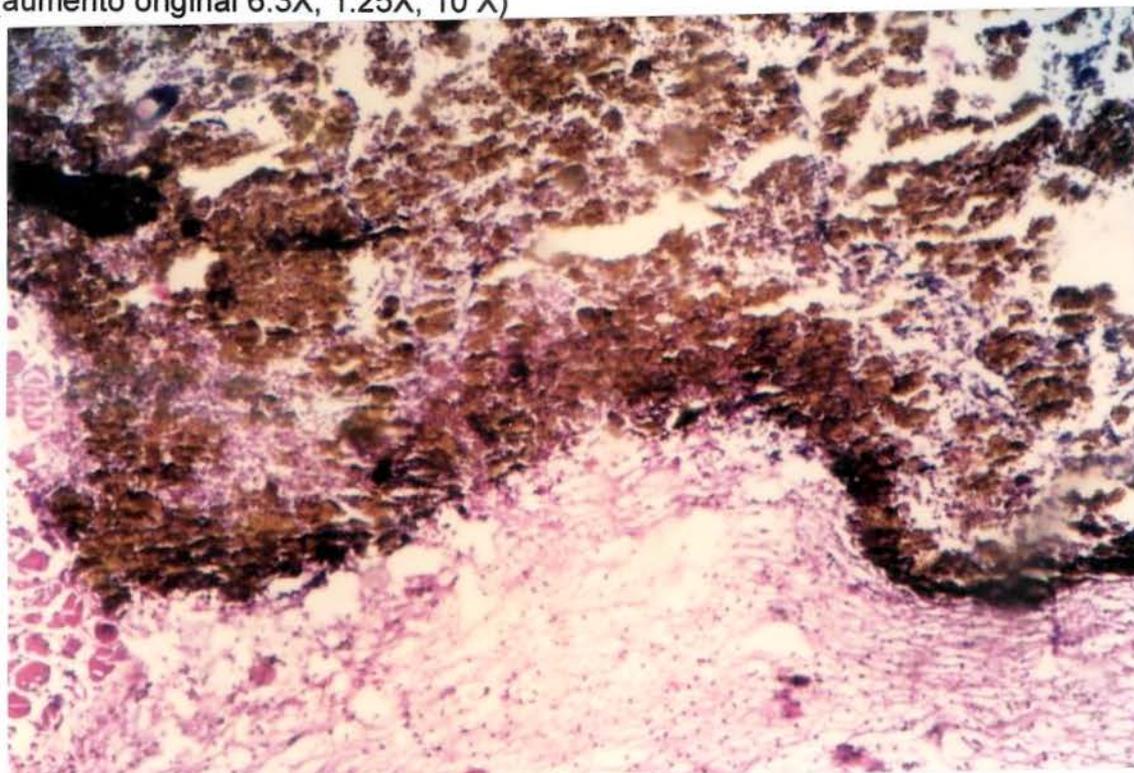
#### LADO TRATADO COM SUBGALATO DE BISMUTO

**Aumento menor (10X)** - O epitélio igualmente ao lado controle, se mostra praticamente normal tendo queratina e anexos em formação. Observa-se ainda neste aumento uma quantidade muito pequena de SGB no tecido conjuntivo, porém o aspecto do tecido é bastante maduro e muito semelhante ao do controle. ( fig. 23 )

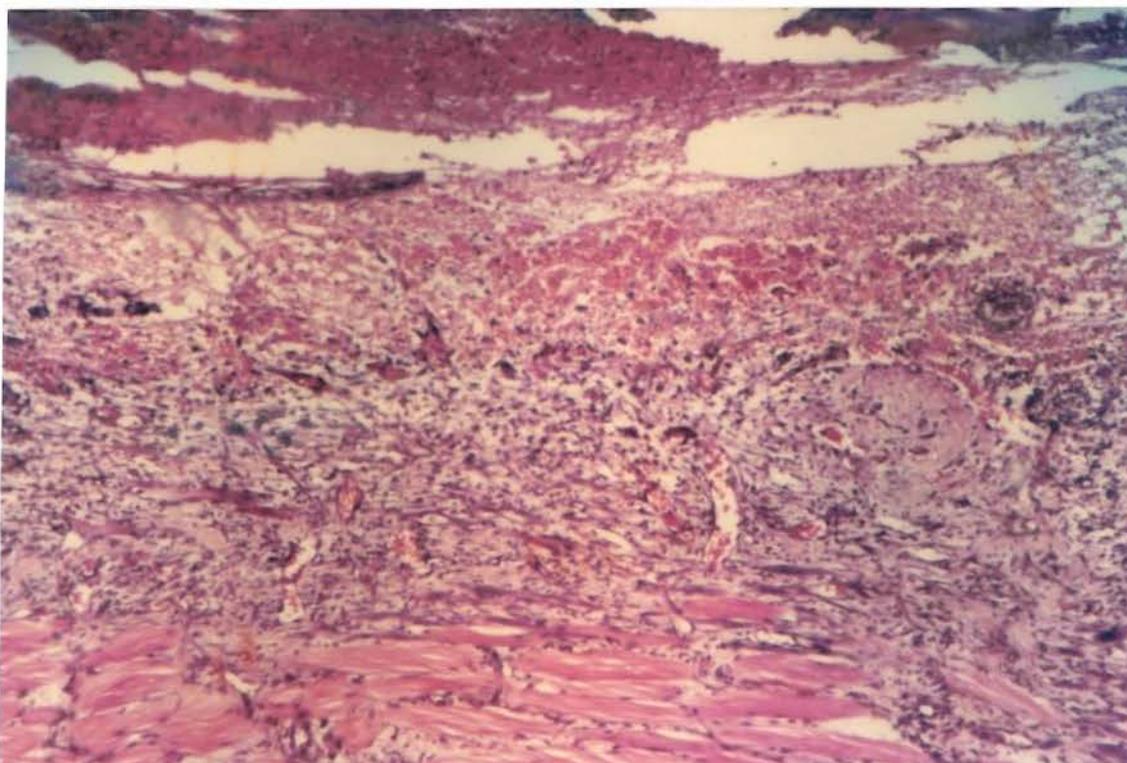
**Aumento maior (40X)** - Nesta fase nota-se ainda a presença de uma pequena área de tecido de granulação, O SGB presente em pouca quantidade, sendo ,o mesmo, permeado por poucos macrófagos. Os feixes de fibras colágenas, de maneira semelhante ao controle, já se mostram mais próximos do normal, porém o grau de fibrosamento do tecido de granulação ainda é menor que o tecido normal adjacente, à semelhança do controle. Um dado interessante de ser observado é o de que o pouco de SGB presente ainda continua, a exemplo dos grupos de 07 e 11 dias tratados, afastado do tecido de granulação ( em porções mais profundas do tecido ).



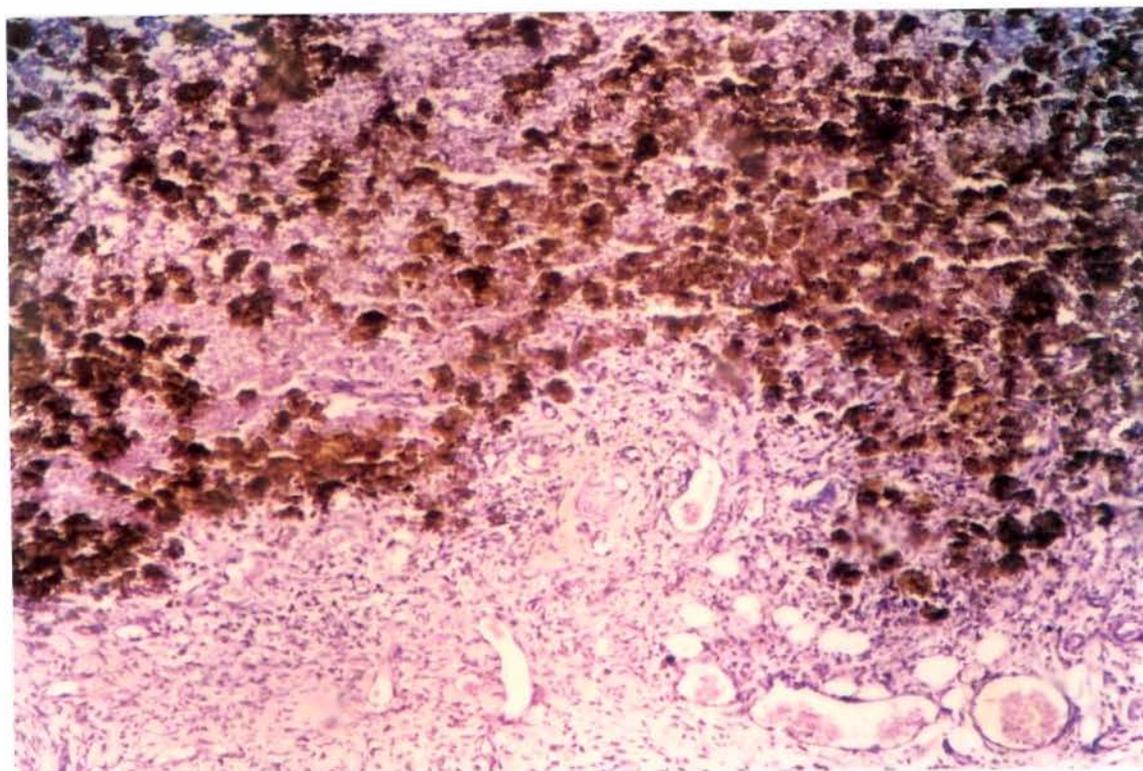
**FIGURA 14.** LADO CONTROLE DIA 01- Fotomicrografia da área de tecido ulcerado com presença de necrose superficial e infiltrado inflamatório. H.E. (aumento original 6.3X, 1.25X, 10 X)



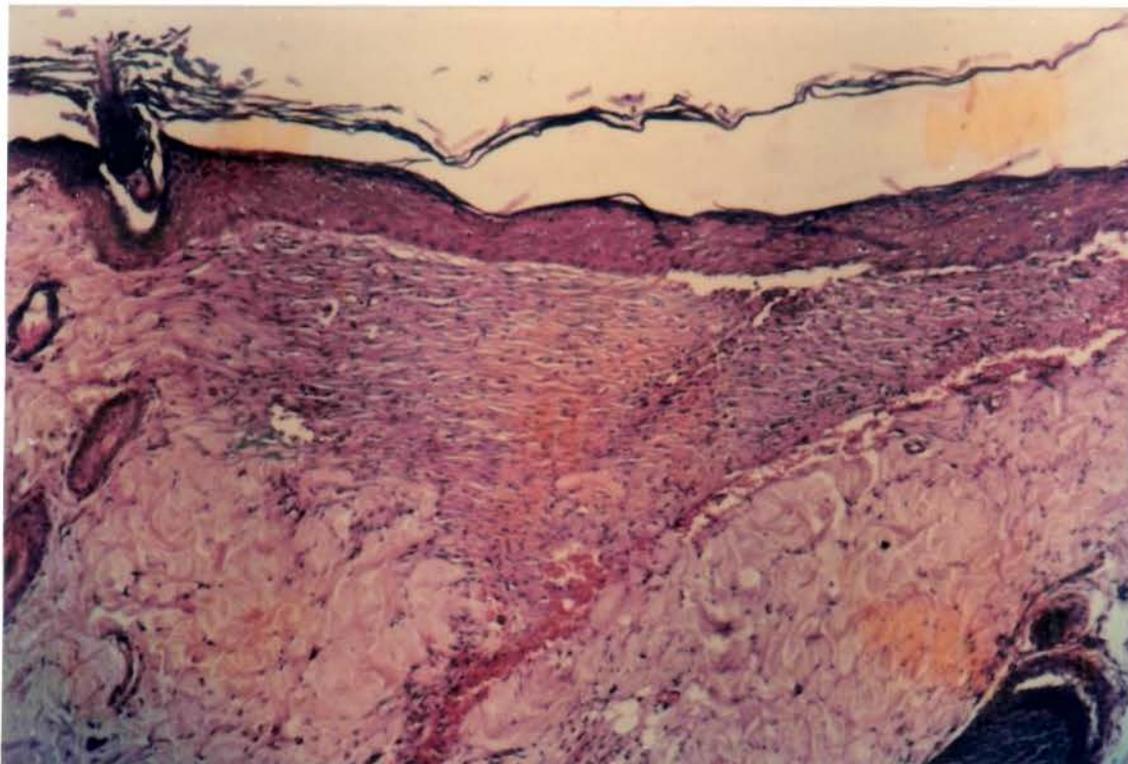
**FIGURA 15.** LADO TESTE DIA 01- Fotomicrografia da área de tecido ulcerado, preenchida com SGB estando o mesmo em íntimo contato com o conjuntivo. H.E. (aumento original 6.3X, 1.25X, 10 X)



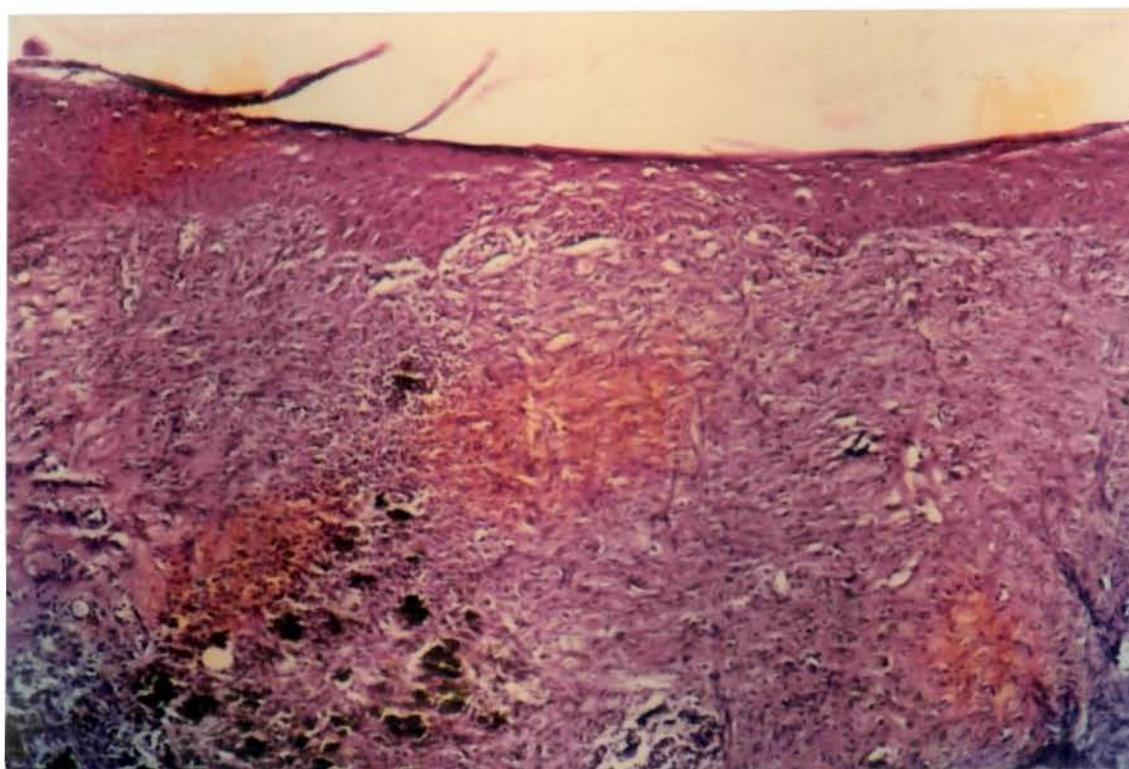
**FIGURA 16.** LADO CONTROLE DIA 4- Fotomicrografia demonstrando presença de infiltrado moderado e grande quantidade de vasos neoformados. H.E. (aumento original 6.3X, 1.25X, 10 X)



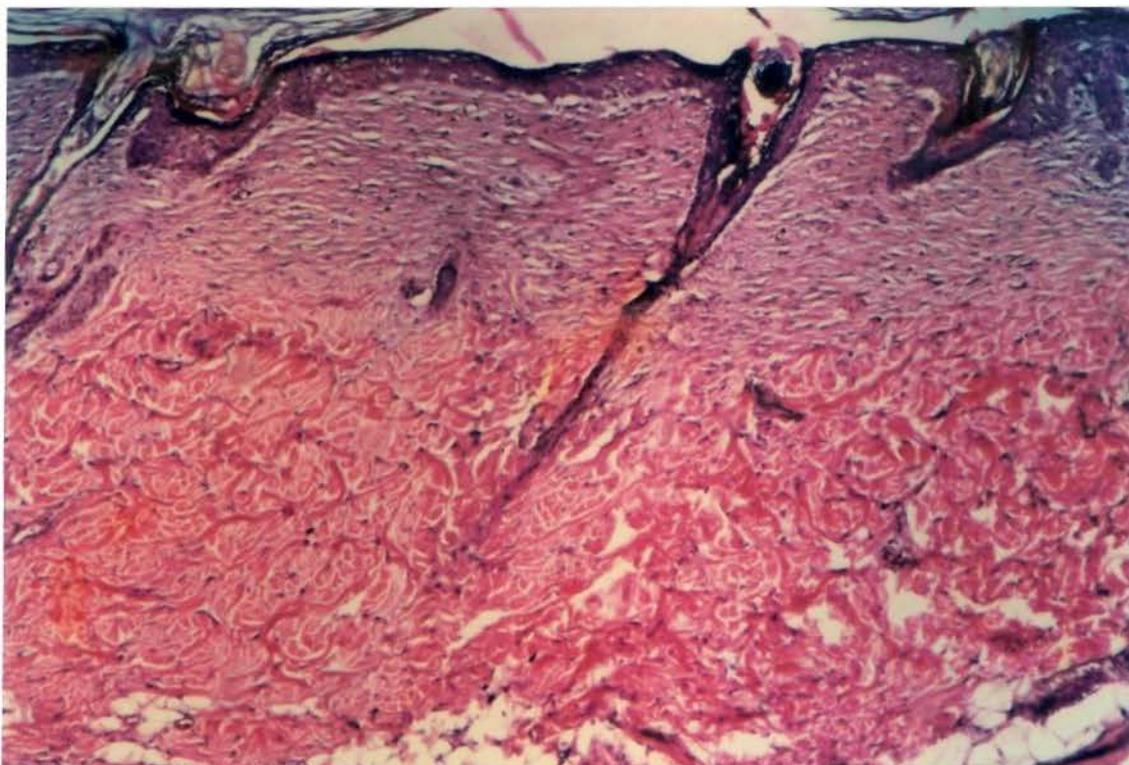
**FIGURA 17.** LADO TESTE DIA 04- Fotomicrografia demonstrando presença do SGB permeado por células inflamatórias. Vasos neoformados podem ser vistos em grande quantidade acima dessa região H.E. (aumento original 6.3X, 1.25X, 10 X)



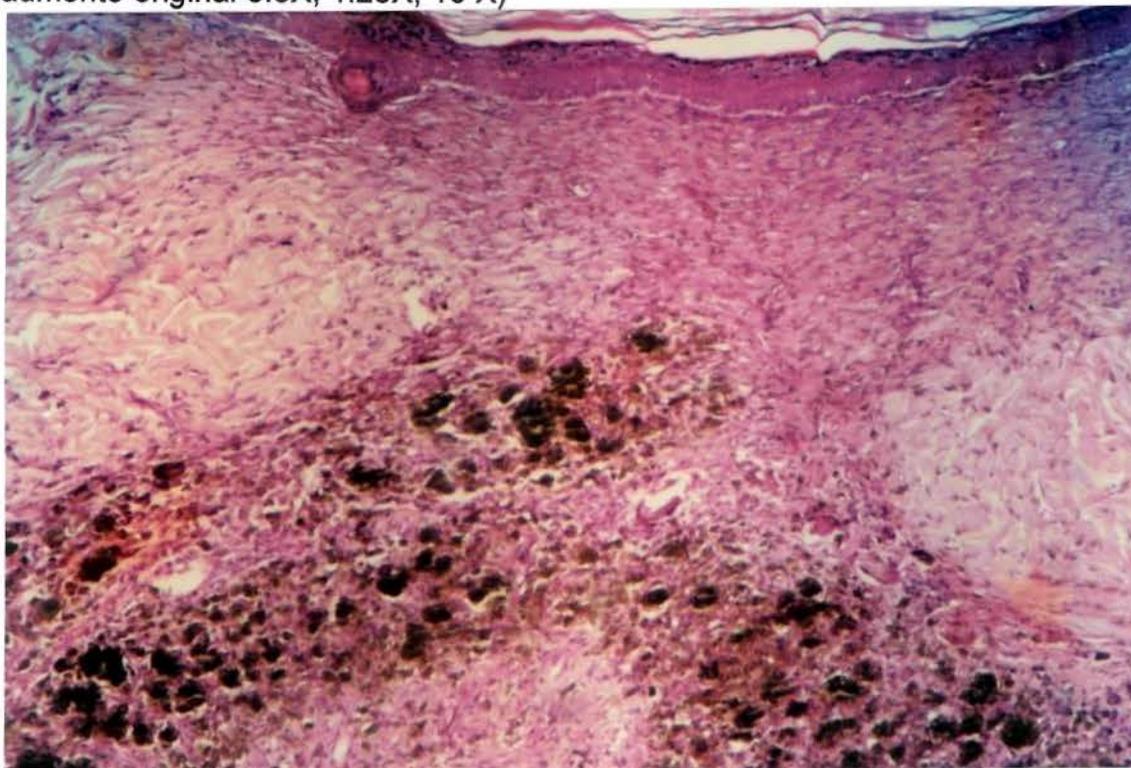
**FIGURA 18. LADO CONTROLE DIA 07-** Fotomicrografia apresentando tecido de granulação bastante celular, recoberto por epitélio. H.E. (aumento original 6.3X, 1.25X, 10 X)



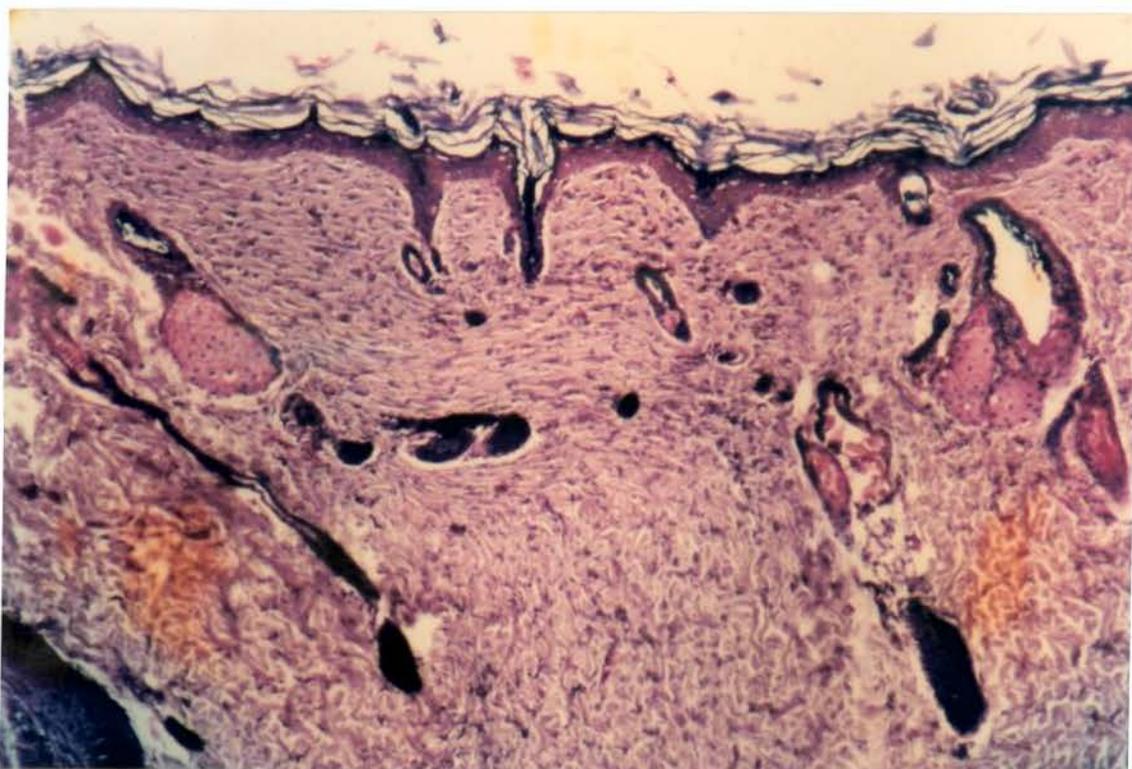
**FIGURA 19. LADO TESTE DIA 07-** Fotomicrografia apresentando tecido de granulação celular recoberto por epitélio, com presença do SGB em menor quantidade que o período anterior. H.E. (aumento original 6.3X, 1.25X, 10 X)



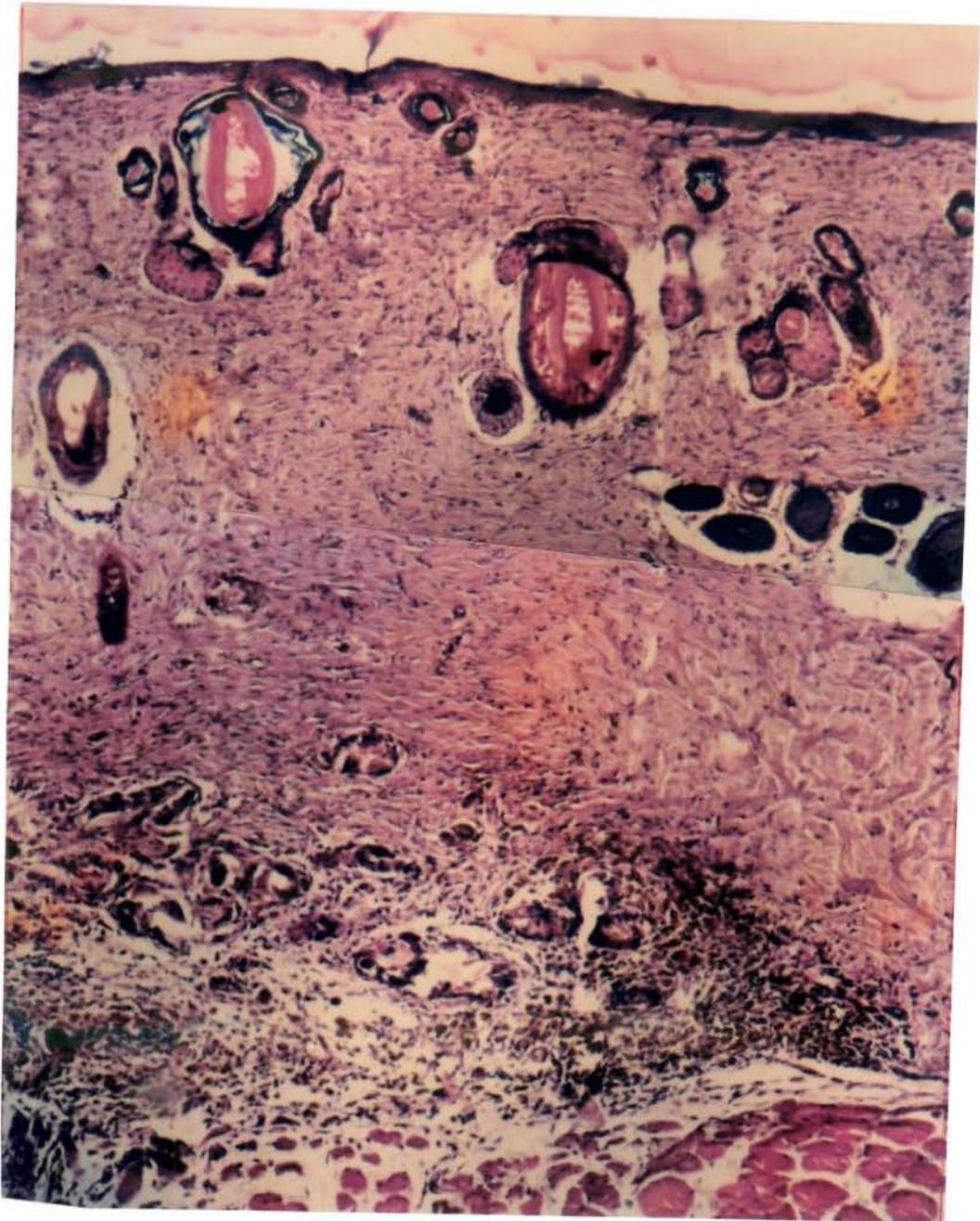
**FIGURA 20.** LADO CONTROLE DIA 11- Fotomicrografia mostrando a evolução do processo de reparação e início de formação de anexos do epitélio. H.E. (aumento original 6.3X, 1.25X, 10 X)



**FIGURA 21.** LADO TESTE DIA 11- Fotomicrografia mostrando presença do SGB numa porção mais profunda do tecido. H.E. (aumento original 6.3X, 1.25X, 10 X)



**FIGURA 22. CONTROLE DIA 18-** Fotomicrografia mostrando tecido de granulação mais fibroso, com características próximas ao tecido normal. H.E. (aumento original 6.3X, 1.25X, 10 X)



**FIGURA 23.** TESTE DIA 18- Fotomicrografia mostrando evolução do tecido de granulação bastante semelhante ao controle. Pouca quantidade de SGB ainda presente numa porção mais profunda do tecido. H.E. (aumento original 6.3X, 1.25X, 10 X)

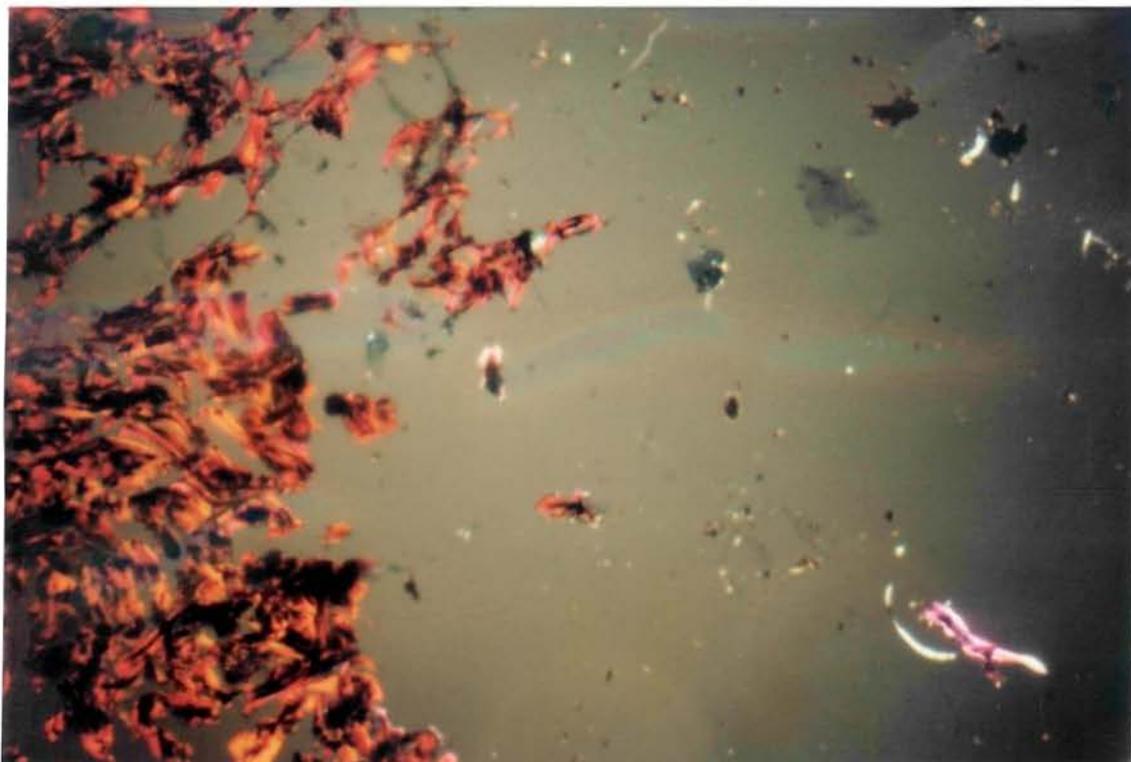
### **III –RESULTADOS HISTOLÓGICOS COM MICROSCOPIA DE LUZ POLARIZADA ( Impregnação por Prata e Birrefringência )**

O objetivo da utilização dessa coloração foi observar a formação e evolução dos feixes de colágeno do tecido de granulação e também a observação desses fenômenos sob microscopia de luz polarizada, para o estudo da birrefringência dos feixes de colágeno. A avaliação qualitativa dos cortes de tecido de granulação impregnados pela prata sob luz comum denotou a presença dos feixes de colágeno com uma coloração castanho escura ou quase negra. Por outro lado, quando essas observações foram realizadas sob luz polarizada, o colágeno do tecido de granulação brilhou numa tonalidade alaranjada ou avermelhada, segundo o estágio de evolução do tecido.

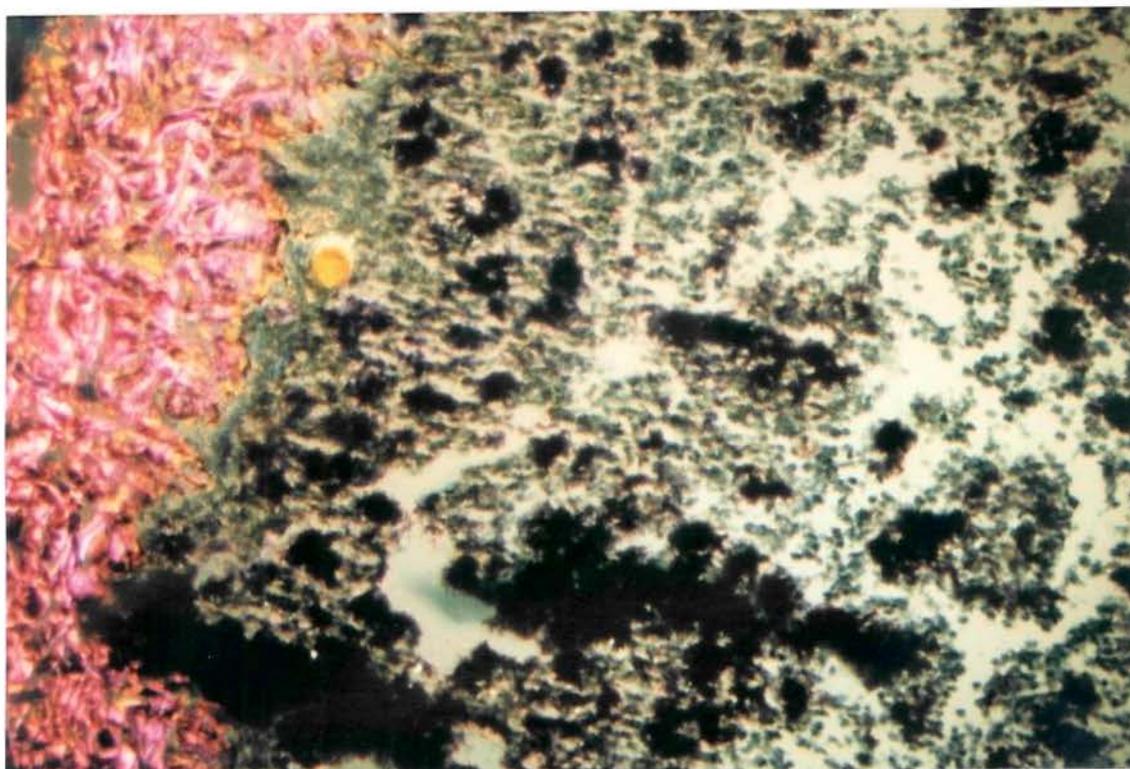
#### **Grupos controle e tratado com Subgalato de Bismuto.**

No período inicial avaliado ( DIA 01 ), os dois grupos apresentam apenas uma área ulcerada, com a presença de fibras com brilho muito próximo ao normal, adjacente à área da ferida; no teste foi possível observar o SGB em íntimo contato com o conjuntivo ( fig. 24 e 25 ). No DIA 04, as características dos dois grupos foram bastante semelhantes, com um tecido ainda imaturo, onde as fibras colágenas estavam em início de formação e ainda sem brilho característico de birrefringência. Pode-se notar a presença de fibrina na área de tecido necrótico, com pouco brilho, não devendo ser confundida com feixes de colágeno ( fig. 26 e 27 ). À partir do DIA 07 e com a evolução do tecido de granulação, pode-se observar uma maturação dos feixes de colágeno, estando estes mais densos e, quando avaliados sob luz polarizada, com um brilho cada vez mais intenso e tendendo para uma coloração mais avermelhada, sendo possível

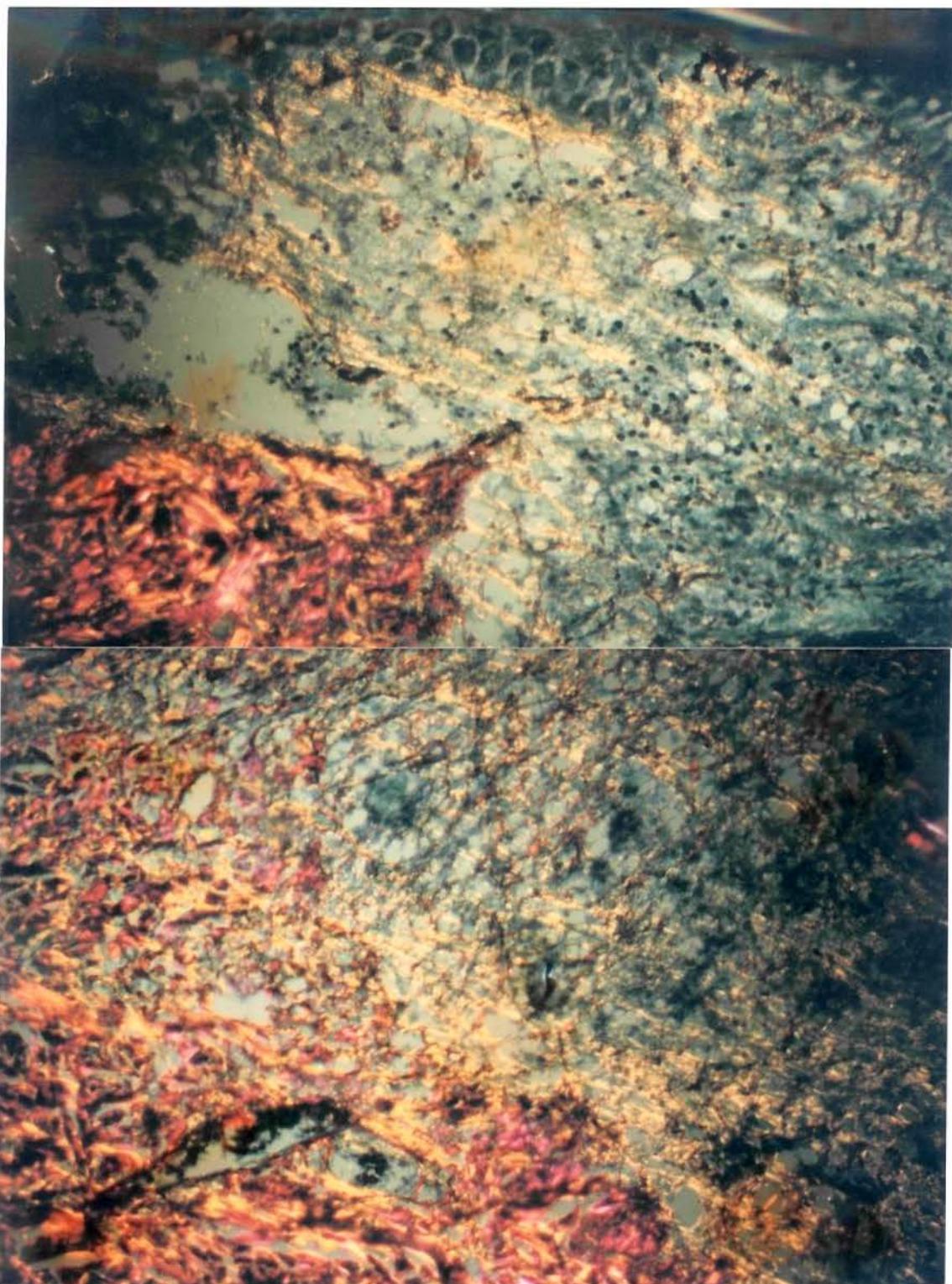
discernir pequena diferença a favor do grupo controle, onde se observa feixes de fibras colágenas um pouco mais densas e com coloração ligeiramente mais avermelhada, porém nos dois lados ( teste e controle ) é possível notar epitelização da ferida nos períodos mais avançados e início de formação de anexos da pele. . ( fig. 28, 29, 30, 31, 32 e 33 )



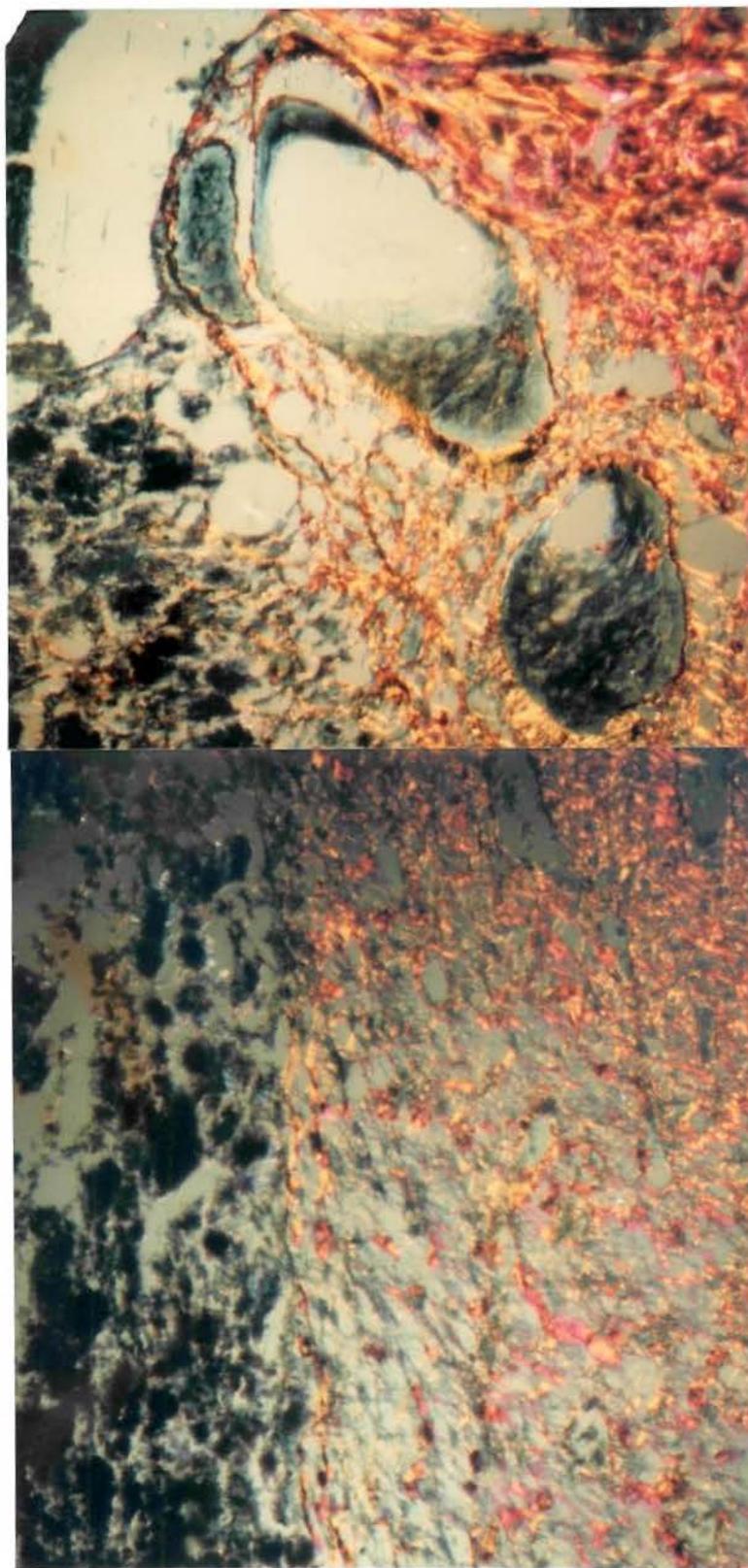
**FIGURA 24.** CONTROLE DIA 1- Fotomicrografia em microscopia de polarização mostrando a birrefringência das fibras colágenas com aspecto normal. Impregnação por prata.(aumento original 16X, 1.25X, 10X)



**FIGURA 25.** TESTE DIA 1- Fotomicrografia em microscopia de polarização mostrando preenchimento da área ulcerada com SGB e birrefringência das fibras colágenas com aspecto normal. Impregnação por prata.(aumento original 16X, 1.25X, 10X)



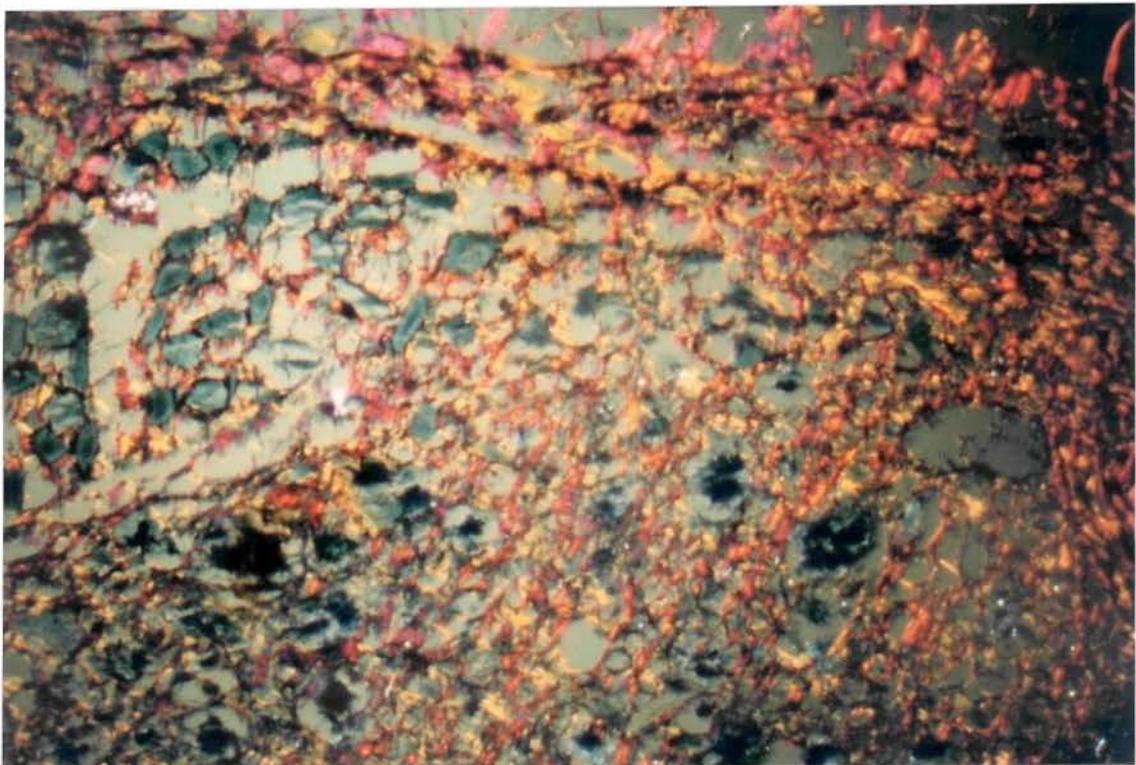
**FIGURA 26.** CONTROLE DIA 04- Fotomicrografia em microscopia de polarização mostrando área de feixes de fibras colágenas birrefringentes com aspecto normal ( esquerda ); e área de exsudato inflamatório com presença de fibrina birrefringente ( direita ). Impregnação por prata.(aumento original 16X, 1.25X, 10X)



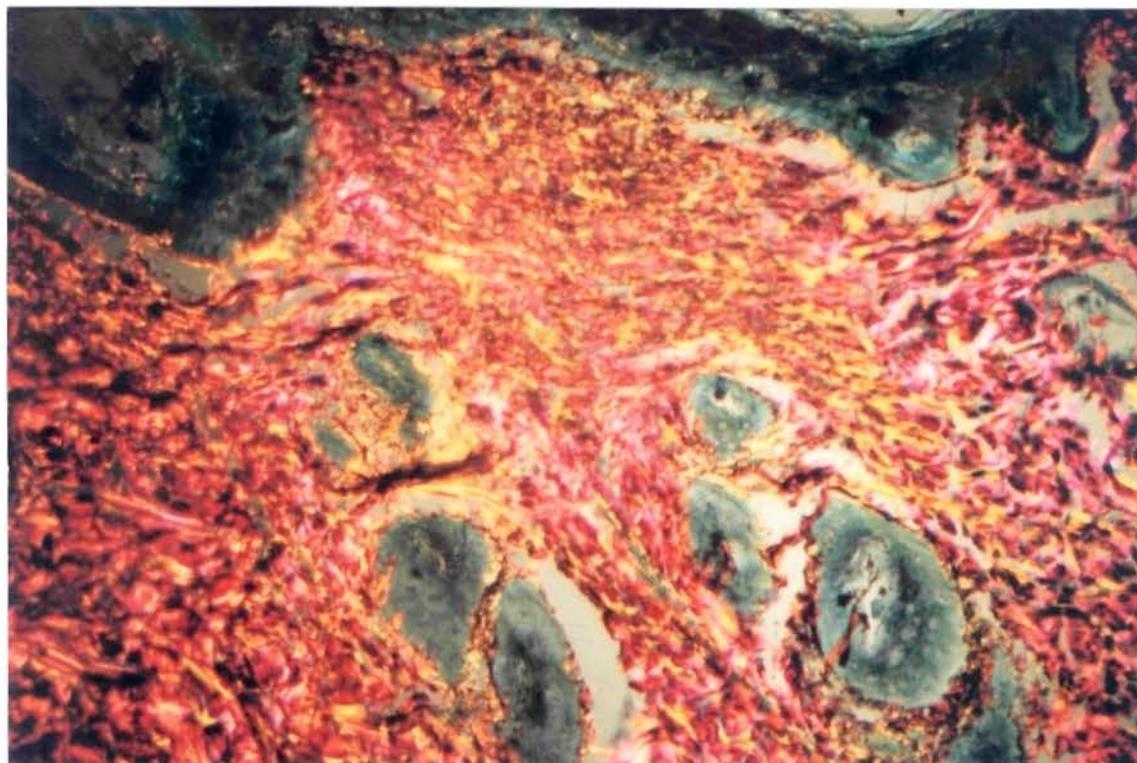
**FIGURA 27. TESTE DIA 04-** Fotomicrografia em microscopia de polarização mostrando preenchimento com SGB ( esquerda ); birrefringência dos feixes de fibras colágenas com aspecto normal ( superior direito ); e fibrina birrefringente ( inferior direito ). Impregnação por prata.(aumento original 16X, 1,25X, 10X)



**FIGURA 28. CONTROLE DIA 07-** Fotomicrografia em microscopia de polarização mostrando evolução dos feixes de fibras colágenas ainda com pouco brilho. Impregnação por prata.(aumento original 16X, 1.25X, 10X)



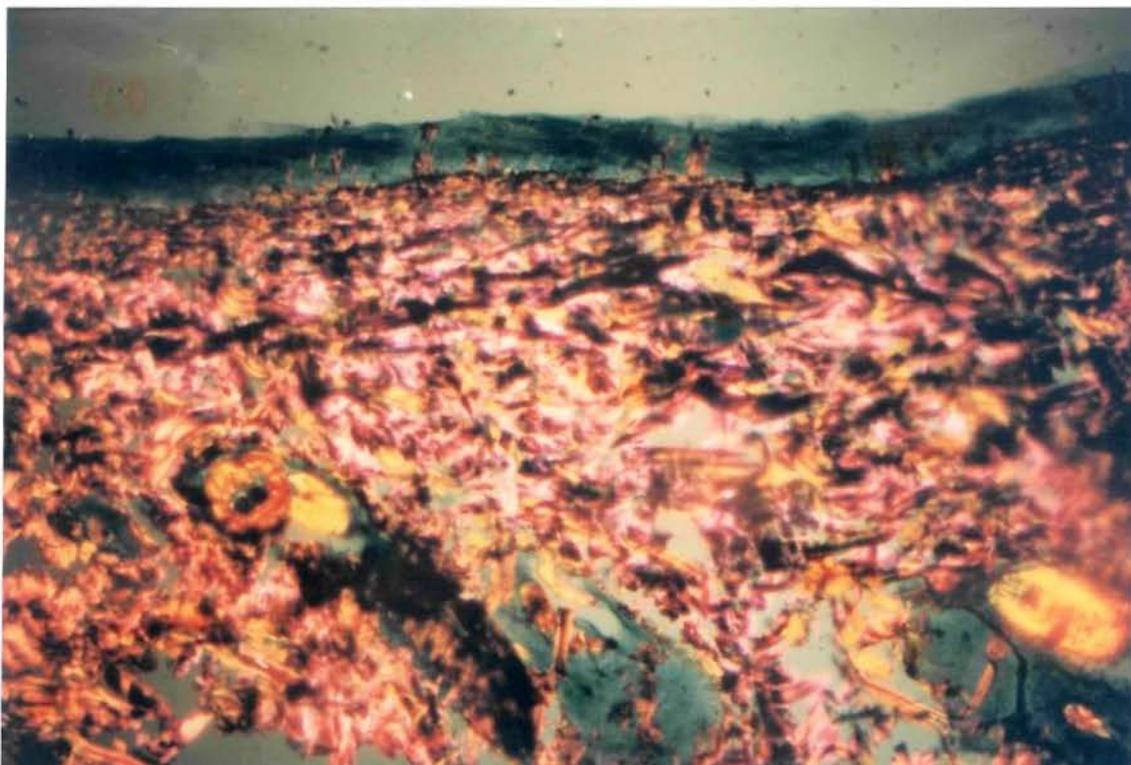
**FIGURA 29. TESTE DIA 07-** Fotomicrografia em microscopia de polarização mostrando feixes de fibras colágenas ainda imaturas como no controle. Impregnação por prata.(aumento original 16X, 1.25X, 10X)



**FIGURA 30. CONTROLE DIA 11-** Fotomicrografia em microscopia de polarização mostrando fibras com aspecto mais evoluído e brilho mais intenso. Impregnação por prata.(aumento original 16X, 1.25X, 10X)



**FIGURA 31. TESTE DIA 11-** Fotomicrografia em microscopia de polarização mostrando fibras com aspecto mais evoluído e brilho mais intenso, semelhante ao controle. Impregnação por prata.(aumento original 16X, 1.25X, 10X)



**FIGURA 32. CONTROLE DIA 18-** Fotomicrografia em microscopia de polarização mostrando feixes de fibras com aspecto próximo do normal. Impregnação por prata.(aumento original 16X, 1.25X, 10X)



**FIGURA 33. TESTE DIA 18-** Fotomicrografia em microscopia de polarização mostrando feixes de fibras colágenas com brilho intenso, próximo do normal. Impregnação por prata.(aumento original 16X, 1.25X, 10X)

#### IV - AVALIAÇÃO HISTOMÉTRICA.

Para a análise histométrica, avaliou-se no dia 1 ( teste e controle ) a área de tecido ulcerado, aos 4 dias foi avaliado a distância entre as bordas epiteliais e à partir do 7<sup>o</sup>. dia a avaliação foi feita com relação à area de tecido de granulação, delimitada pelo tecido normal e pelo tecido de granulação ( diferença de maturação dos feixes de fibras de colágeno ).

Os valores numéricos dos parâmetros histométricos avaliados e as tabelas estão contidas no apêndice. As análises de variância ( ANOVA ) para os vários períodos estudados, estão contidas nas tabelas 3 a 5, como se segue.

**TABELA 3.** Análise de variância dos dados da leitura da área de tecido ulcerado no DIA 1.

CAUSAS	DE	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
<b>VARIAÇÃO</b>					
TRATAMENTOS	1		30466425729.6	30466425729.6	8.59
RESÍDUO	8		28365269492.8	3545658686.6	
TOTAL CORRIGIDO	9		58831695222.4		
<b>ANOVA</b>					

**TABELA 4.** Análise de variância dos dados da leitura da distância das bordas epiteliais da ferida no DIA 4.

CAUSAS	DE	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
<b>VARIAÇÃO</b>					
TRATAMENTOS	1		304930.56	304930.56	10.37
RESÍDUO	8		205924.37	29417.76	
TOTAL CORRIGIDO	9		510854.94		

**ANOVA**

**TABELA 5.** Análise de variância dos dados da leitura da área de tecido de granulação da ferida nos DIAS 7, 11 e 18.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
TRATAMENTOS	1	2.103	2.103	176.0
DIA	2	0.129	0.0644	5.392
<b>DIA * TRATAMENTO</b>	<b>2</b>	<b>0.164</b>	<b>0.0819</b>	<b>6.858</b>
RESÍDUO	22	0.263	0.0119	
TOTAL CORRIGIDO	27	2.698		

**ANOVA**

Uma vez detectada a existência de interação entre DIA e TRATAMENTO, ( como observado na tabela 5 ) foi necessária a comparação dos tratamentos em cada um dos dias e da variação dos dias independentemente para cada tratamento,

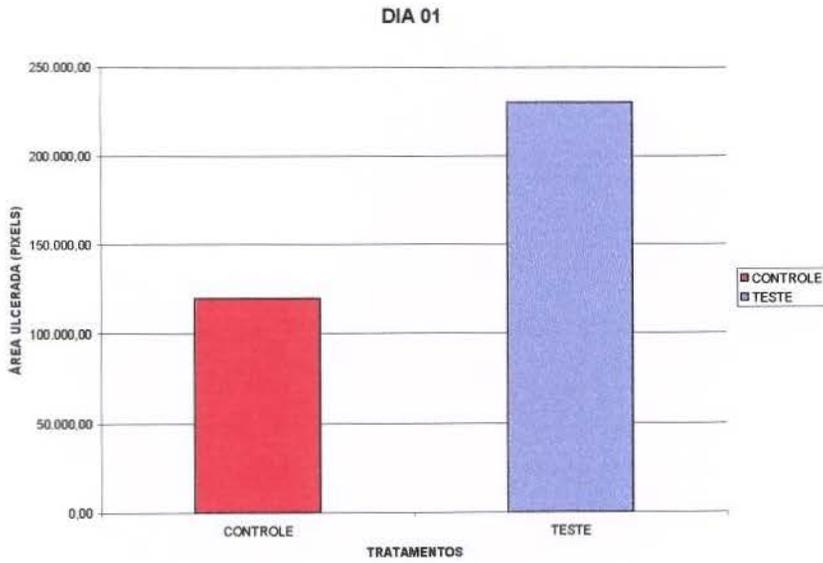
sendo para isso utilizado o teste t de comparações múltiplas numa significância de 5%. ( Tab. 6 )

**TABELA 6.** Comparações múltiplas das médias da área de granulação observada em diferentes dias separadamente em cada dia.

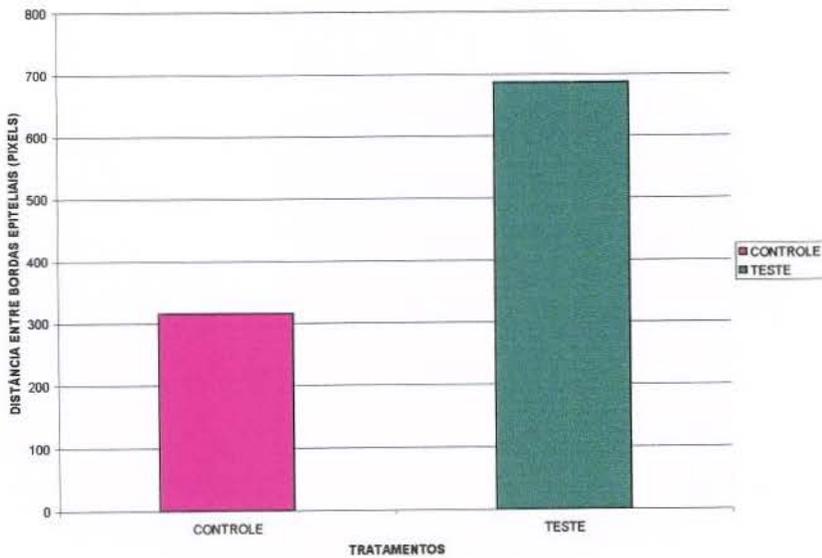
Tratamentos	Dias		
	Dia 7	Dia 11	Dia 18
Teste	162765 Aa	153801 Aa	137290 Aa
Controle	63177 Ba	41310 Bb	29254 Bab

**Teste t (  $p < 0.05$  )**

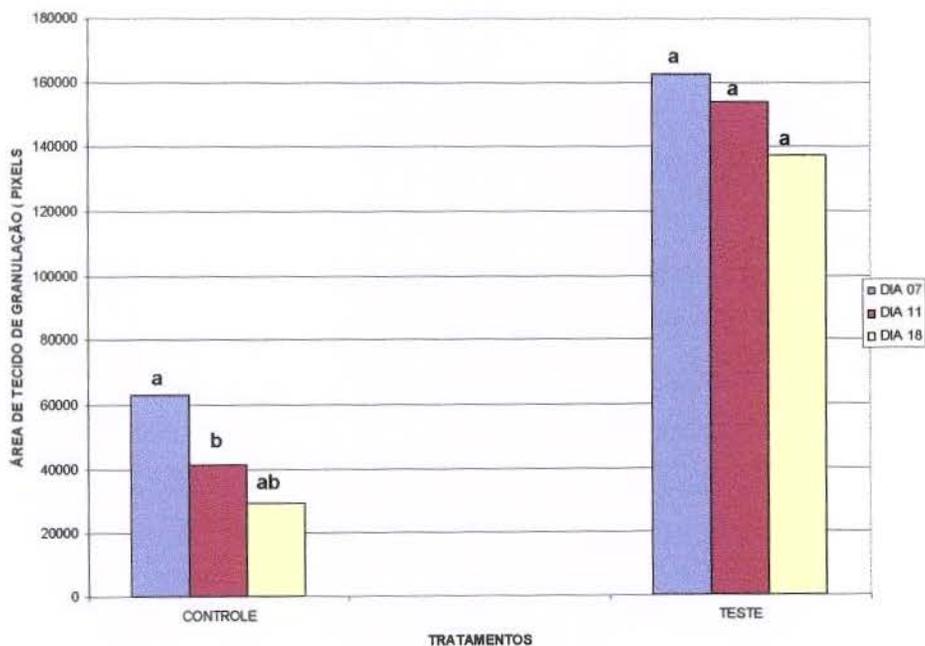
Médias com mesma letra não são significativamente diferentes. Letras maiúsculas devem ser comparadas na vertical e as minúsculas indicam comparações nas linhas.( horizontal ). Pode ser observado com esses dados que houve uma diferença significativa entre teste e controle nos períodos avaliados e que, nas feridas controle houve um decréscimo significativo na área d tecido de granulação, diferentemente do comportamento das feridas teste onde se utilizou o SGB.



**GRÁFICO 3.** Média das áreas ulceradas das feridas teste e controle no DIA 1



**GRÁFICO 4.** Médias das distâncias entre bordas epiteliais das feridas teste e controle no dia 4



**GRÁFICO 5** Médias das áreas de tecido de granulação nos dias 07, 11 e 18, permitindo a visualização das diferenças entre os dias nos diferentes tratamentos

**Observação:** Barras com a mesma letra não são significativamente diferentes das demais no mesmo dia, pelo teste t (  $p < 0,05$  )

## **DISCUSSÃO**

## DISCUSSÃO

A necessidade da utilização de hemostáticos locais em cirurgias que resultem em áreas de tecido conjuntivo exposto tem sido relatado por vários autores (**WIRTHLIN<sup>53</sup> et al., 1980; STEIN<sup>47</sup> et al., 1985; MANIGLIA<sup>33</sup> et al., 1989; WORMALD & SELLARS<sup>54</sup>, 1994; FENTON<sup>13</sup> et al., 1995, CALLANAN<sup>6</sup> et al., 1995**), onde uma preocupação constante dos mesmos repousa na diminuição do tempo operatório, aliado à diminuição do risco de hemorragia pós-operatória e à compatibilidade biológica desses hemostáticos.

O objetivo de se obter hemostasia em cirurgias periodontais (principalmente em áreas doadoras de enxerto gengival livre) levou vários autores a pesquisar substâncias e materiais com ação hemostática local no que concerne ao seu mecanismo de ação, efetividade hemostática e efeitos biológicos sobre os tecidos ( **VISTNES<sup>51</sup> et al., 1974; WIRTHLIN<sup>53</sup> et al., 1980; JEFFERY<sup>23</sup> et al., 1982; SAROFF<sup>42</sup> et al., 1982** ).

A utilização do subgalato de bismuto tem sido amplamente relatada na área médica como sendo um hemostático eficiente no controle da hemorragia local em tonsilectomias e adenotonsilectomias, diminuindo sensivelmente os casos de hemorragia pós-operatória ( cerca de 0,28% dos casos , segundo **MANIGLIA, KUSHNER e COZZI<sup>33</sup>, 1989**). Com isso, se torna bastante segura a indicação dessa substância como hemostático local, desde que não haja rompimento de vasos de maior calibre. Porém, apesar de sua indicação clínica como hemostático, praticamente não há relatos na literatura sobre seus efeitos biológicos sobre os

tecidos, principalmente no que concerne ao seu efeito sobre o processo de reparação tecidual.

Em nosso trabalho, bem como nos casos clínicos onde o SGB foi utilizado como hemostático local, não foi possível se observar hemorragia pós-operatória, desde que fosse seguida a indicação do mesmo, ou seja, não haver sangramento proveniente de vasos de maior calibre, mas sim sangramento proveniente de capilares e vasos menores.

Com o intuito de contribuir para a avaliação da resposta tecidual frente à utilização do SGB, este trabalho avaliou, qualitativa e quantitativamente, os efeitos do mesmo na reparação de feridas previamente confeccionadas e padronizadas com bisturi circular, onde buscou-se uniformizar essas lesões, bem como a padronização da obtenção dos cortes sempre no diâmetro da lesão e ainda a utilização apenas daquelas lâminas onde se conseguiu identificar com clareza a área ou distância a serem medidas, sendo as lâminas de qualidade duvidosa descartadas, por isso o número de medidas realizadas no teste e controle nem sempre foi o mesmo, o que não impediu a análise dos dados. Através dessa padronização procurou-se minimizar o erro no momento da execução das medidas das imagens digitalizadas em computador a partir das lâminas histológicas. Porém, esse método histométrico, mesmo bem conduzido, tem suas restrições, sendo a maior delas a dificuldade de delimitação exata do tecido normal e do tecido ulcerado ou do tecido de granulação, o que poderia ser melhorado se houvesse uma coloração específica ou um marcador ( a semelhança de marcadores de osso neoformado, como por exemplo a tetraciclina) que pudessem delimitar com maior exatidão os limites desse tecido de

granulação. Autores como **BODNER<sup>5</sup> et al.**(1992) e **BODNER<sup>4</sup> et al.** (1993) se utilizaram de medidas de área de infiltrado inflamatório e área de tecido de granulação através do uso de grades oculares milimetradas, porém em seus trabalhos os autores não especificaram qual método utilizaram para padronizar as feridas ou mesmo os cortes histológicos. Os parâmetros utilizados no presente trabalho para avaliar resultados seguem, a princípio, os mecanismos mais relevantes no processo de reparação citados por **HARRISON<sup>19</sup>** ( 1991 ) em seu artigo de revisão, ou seja, coagulação e inflamação ( avaliação qualitativa ); cura epitelial ( avaliada qualitativa e quantitativamente ); cura do tecido conjuntivo ( qualitativa e quantitativa através de medida de área de tecido de granulação) e maturação e remodelação da ferida ( qualitativamente e através de birrefringência ).

Os resultados do estudo fotográfico realizado demonstraram que não houve efeito significativo do tratamento ( SGB) sobre o fechamento lateral das feridas e que o mesmo foi similar, tanto no grupo teste quanto no controle. Esse resultado mostra uma característica clínica da reparação tecidual, demonstrando que o SGB não alterou clinicamente o processo de reparação, pois nos vários períodos estudados (1,4,7,11 e 18 dias ) as medidas do perímetro das feridas obtidas através da análise digitalizada das fotografias padronizadas mostraram números bastante homogêneos que não resultaram em diferença estatisticamente significativa. No estudo realizado por **KANBERG E THILANDER<sup>23</sup>** ( 1982 ), a avaliação fotográfica de feridas circulares de 3 mm de diâmetro no palato de ratos, demonstrou que a cura total das mesmas acontecia em torno de 3 semanas e que, em torno de 7 à 10 dias, havia uma redução por volta de 50% no tamanho das

feridas, dados esses que se assemelham ao presente trabalho, pois aos 18 dias ( período final ) as feridas estavam epitelizadas e com aspecto clínico bastante próximo ao do tecido adjacente normal e ainda com 11 dias de avaliação pôde-se constatar que, tanto as médias dos perímetros das feridas do grupo teste quanto à do controle, se mostravam aproximadamente 90% menor que as do período inicial de 01 dia, havendo redução de 311,843 pixels para 28,603 pixels no grupo teste e no grupo controle uma redução também bastante similar sendo de 316,857 pixels para 32,109 pixels.

A avaliação histológica feita com coloração de hematoxilina e eosina mostrou no período inicial ( 1 dia ) do estudo uma área de ulceração extensa com formação de necrose superficial da ferida, tanto no controle quanto no teste, onde neste pode-se observar a presença do SGB em íntimo contato com o tecido conjuntivo e preenchendo toda a ferida, fato este que pode ser considerado favorável, pois o mesmo poderia funcionar como proteção da área ulcerada, não deixando a mesma descoberta e sujeita à penetração de agentes agressores, o que está de acordo com **MATTHEW et al., (1994)**<sup>35</sup> que citam que a cobertura biológica de áreas desnudas na mucosa oral é vantajosa devido à proteção física conferida e também pela redução da colonização bacteriana , o que poderia ser extrapolado para a clínica como um fator positivo na indicação do SGB como protetor de feridas cirúrgicas. Com 4 dias, as feridas apresentam uma evolução normal, caracterizando-se por migração epitelial à partir das bordas das feridas, onde no grupo controle parece haver uma ligeira vantagem em termos de fechamento da ferida ( maior proximidade das bordas epiteliais ). Pode-se observar ainda que no grupo teste é possível constatar a presença do SGB junto

ao tecido conjuntivo, sendo o mesmo permeado por células inflamatórias, mas sem características de toxicidade ou maior agressão além da própria presença física do produto. Com a evolução da ferida, aos 7 dias se observa poucas camadas de células epiteliais recobrimo toda a extensão da ferida, demonstrando que, tanto no grupo teste quanto no controle, as feridas estão evoluindo normalmente sem grandes diferenças morfológicas entre elas e onde o tecido de granulação agora já se mostra mais definido que no período anterior e com grande quantidade de fibroblastos e formação inicial de feixes de fibras de colágeno. É interessante notar que à partir deste período o SGB passa a se localizar numa posição mais profunda do tecido conjuntivo, deixando a porção mais superficial do tecido de granulação livre para evoluir normalmente, sem a presença física do produto nessa porção mais superficial. Esse motivo sugere o porquê da análise fotográfica realizada não ter demonstrado diferenças significativas com relação ao fechamento lateral da ferida, pois a porção visível clinicamente ( porção superficial da ferida ) não mais continha o SGB, estando o mesmo confinado às porções mais profundas do tecido, não impedindo a reepitelização das feridas. Nos períodos mais avançados do processo de reparação avaliados ( 11 e 18 dias ), é possível ainda notar a evolução normal das feridas, onde, tanto no grupo teste quanto no controle, existe uma formação gradual de feixes de fibras colágenas, já com características de espessura e de coloração bastante similares aos feixes das áreas circunjacentes normais. Observa-se também nos grupos teste uma diminuição gradual da quantidade de SGB, sendo essa extremamente reduzida no período final analisado ( 18 dias ) demonstrando que esse hemostático é na sua maior parte absorvido e eliminado pelas células do sistema fagocitário, mostrando

uma compatibilidade biológica bastante favorável e não tóxica, o que está de acordo com **JEFFERY et al.**<sup>23</sup> ( 1982 ) que cita que um hemostático ideal, após servir seu propósito primário, deveria sofrer biodegradação e não apresentar efeito adverso ou mudanças teciduais estruturais, não devendo promover qualquer barreira ao processo normal de reparação.

A falta de trabalhos relacionando o SGB com processo de reparação nos levou a explorar da maneira mais ampla possível o assunto, buscando-se obter vários resultados ( histológico qualitativo, histológico com birrefringência, histométrico e macroscópico ) para obtenção de dados que nos permitissem conclusões seguras para posterior indicação deste produto, sem riscos para os pacientes.

Vários trabalhos foram realizados com outros agentes hemostáticos avaliando seus efeitos biológicos relacionado com o processo de reparação. **HUNT & BENOIT ( 1976 )**<sup>21</sup>, concluíram em seu trabalho sobre reparação de alvéolos em felinos, quando da utilização do colágeno microcristalino, que este material parece não retardar a cura, havendo mínima reação inflamatória; **BENOIT & HUNT ( 1976 )**<sup>2</sup> compararam, através da mesma metodologia, o efeito do colágeno microcristalino e da espuma de gelatina sobre o processo de reparação em alvéolo, concluindo que, histologicamente, os dois hemostáticos pareceram não retardar o processo de cura dos alvéolos. Similarmente, **SCHITTEK et al.**( 1976 )<sup>44</sup> utilizando-se de um estudo fotográfico do fechamento das feridas em ratos, concluíram não haver diferença significativa ( teste t de Student ) entre as feridas testadas com colágeno microcristalino e as controle ( salina 0,85% ). **KRAMER & POLLACK**<sup>29</sup> (1982) trabalhando com colágeno microcristalino em

área doadora de enxerto gengival livre, não encontraram, histologicamente, nenhuma evidência significativa no que concerne a qualidade do processo de reparação. **MATTHEW et al., (1994)**<sup>35</sup>, através de avaliação histológica e histométrica de feridas de 2,5 cm por 2,0 mm em mucosa oral de cães preenchidas com fibra de alginato ( hemostático ) concluíram que o mesmo não tem propriedade de acelerar o processo de reparação, ao contrário de **BARNETT & VARLEY** <sup>1</sup>( 1987 ) que demonstraram uma reação inflamatória mais severa quando da utilização desse mesmo hemostático, apesar de não haver atraso significativo na cura das feridas. **JEFFERY et al.** <sup>23</sup>( 1982) trabalhando com amilose succinato de sódio ( IP 760 ) avaliando seu efeito sobre a reparação tecidual em baço de cão e comparando os resultados com colágeno microfibrilar, encontraram que, em geral, a amilose succinato apresentava um menor grau de inflamação que o grupo tratado com colágeno microfibrilar, o qual demonstrou um tempo maior para ser reabsorvido. Após investigação da literatura sobre o assunto, nada foi encontrado relacionando o SGB e seus efeitos sobre o processo de reparação. Com a execução do presente trabalho pode-se inferir que o SGB, à semelhança dos hemostáticos anteriormente comentados, se mostrou bastante seguro com relação à toxicidade e aceitabilidade, não demonstrando diferenças marcantes com relação à evolução do processo de reparação, o que foi também comprovado pela avaliação de cortes histológicos corados com impregnação por prata para avaliação, em microscopia de polarização, da maturação dos feixes de fibra de colágeno através da propriedade das mesmas em apresentar birrefringência e terem, por isso, um brilho com tonalidade alaranjada ou avermelhada segundo o estágio de evolução em que se encontra o tecido. Após a

avaliação qualitativa da birrefringência, pôde-se observar que os grupos teste e controle se comportaram de maneira bastante semelhante, onde a intensidade do brilho dos feixes de fibras colágenos foi aumentando gradativamente, conforme a evolução do tecido de granulação, correspondendo à maturação dos feixes de fibras colágeno de maneira normal e progressiva, demonstrando mais uma vez que o SGB não interferiu negativamente com a maturação e evolução do processo de reparação tecidual.

A utilização de análise histométricas de imagens digitalizadas em computador permitiu a avaliação numérica de algumas observações qualitativas, como área de tecido ulcerado ( dia 01 ), distância das bordas epiteliais ( dia 04 ) e área de tecido de granulação ( dias 07, 11 e 18 ). No dia 01 encontrou-se uma área ulcerada com medida significativamente maior no teste, o que pode ser explicado devido à ferida estar preenchida pelo material ( SGB ), havendo menor contração inicial da ferida. No período de 04 dias, onde o tecido de granulação mostrou início de sua organização, porém sem um área bem delimitada, o que impossibilitou a execução dessa medida, optando-se então pela avaliação da distância entre as bordas epiteliais, que se mostrou significativamente maior nas feridas tratadas com SGB, demonstrando com isso uma menor velocidade de migração epitelial que pode ser justificada pela presença do SGB em íntimo contato com o conjuntivo e bordas epiteliais da ferida, dificultando a migração de células e a formação de vasos neoformados que dão condições para multiplicação e migração epitelial. **BODNER et al.**<sup>5</sup> (1992) e **BODNER et al.**<sup>4</sup>. (1993), avaliaram a área de tecido de granulação em feridas em palato de ratos normais e sialadenectomizados, através da utilização de grades oculares milimetradas,

encontrando áreas maiores e presença de infiltrado inflamatório persistente no grupo sialadenectomizado. No presente trabalho, com a evolução do processo, nos dias 07, 11 e 18, a área de tecido de granulação no grupo teste mostrou-se sempre estatisticamente maior que a área do grupo controle no mesmo período, havendo o decréscimo na mesma com o passar dos dias, porém numa intensidade menor que no controle. O fato da área de tecido de granulação ser maior no grupo teste nos períodos avaliados, sugere um atraso na reparação das feridas, porém, como observado nas avaliações histológicas e de birrefringência, as feridas nesses períodos ( 07, 11 e 18 dias ) se apresentavam epitelizadas, tanto no teste quanto no controle, o que não demonstra atraso significativo em relação à reepitelização das feridas, visto que o SGB mostrou uma interessante característica de se localizar em camadas mais profundas do tecido permitindo a evolução do tecido de granulação na porção superficial, sendo facilmente absorvido e eliminado da ferida ( presente em quantidades mínimas aos 18 dias ), não tendo características tóxicas ou agressivas ao tecido. Através da birrefringência dos feixes de fibras colágenas, pôde-se ainda visualizar que a maturação das mesmas se mostrou muito semelhante nos grupos teste e controle. O fato mais importante para justificar essas maiores áreas de tecido de granulação no grupo teste é pela presença física do SGB no interior do tecido e não por qualquer aspecto de toxicidade ou alteração tecidual.

A utilização do SGB na clínica odontológica é ainda um fato recente, onde os resultados clínicos com relação à obtenção da hemostasia são bastante positivos, em muito se assemelhando aos relatos na área médica. Com os resultados obtidos no presente trabalho, pode-se extrapolar que o mesmo não

apresenta efeitos deletérios aos tecidos, não causando efeito inibidor significativo no processo de reparação. Obviamente outros trabalhos, inclusive clínicos, deverão ser executados para corroborar ou confrontar nossos resultados.

## **CONCLUSÕES**

## **CONCLUSÕES**

A avaliação do efeito do Subgalato de bismuto no processo de reparação em dorso de ratos através de análise macroscópica, histológica e histométrica, permite afirmar, dentro das condições experimentais utilizadas no presente trabalho, que:

**1. Não houve diferença entre as feridas tratadas com Subgalato de bismuto e as feridas controle com relação à contração lateral das mesmas, quando avaliadas macroscopicamente.**

**2. Não houve diferenças histológicas relevantes entre as feridas tratadas com Subgalato de bismuto e as controle, nos vários períodos avaliados .**

**3. A avaliação da birrefringência demonstrou um padrão de maturação dos feixes de fibras colágenas bastante semelhante entre as feridas tratadas com Subgalato de bismuto e as controle, com vantagem para as feridas controle.**

**4. Através da avaliação histométrica, observou-se valores maiores para as feridas teste, demonstrando que a presença do SGB levou a um atraso no processo de reparação, não impedindo, porém , a epitelização das feridas e a evolução do tecido de granulação.**

**5. O Subgalato de bismuto não apresentou efeitos deletérios aos tecidos avaliados, mostrando biocompatibilidade favorável e demonstrando efeito inibor pouco significativo sobre o processo de reparação.**

# APÊNDICE

## APÊNDICE

### 1) Medidas fotográficas do perímetro das feridas no dia 01 ( em pixels )

DIA 01								
	Teste			x	Controle			x
<b>1</b>	332,808	337,430	329,416	329,885	415,351	410,690	415,835	413,958
<b>2</b>	278,002	279,390	279,271	278,888	382,551	385,934	363,753	377,413
<b>3</b>	358,176	358,968	344,962	354,035	290,360	293,045	294,769	292,725
<b>4</b>	304,134	304,280	306,439	304,951	309,238	314,389	315,532	313,053
<b>5</b>	327,012	329,223	326,429	327,551	325,425	319,538	326,058	323,674
<b>6</b>	325,888	320,890	322,622	323,133	344,134	345,448	348,803	346,128
<b>7</b>	325,952	325,022	329,819	326,931	299,722	297,125	291,679	296,175
<b>8</b>	289,453	292,540	289,836	290,610	316,351	308,834	319,781	314,989
<b>9</b>	291,935	295,000	294,991	293,975	293,326	298,423	299,565	297,105
<b>10</b>	292,774	284,138	290,607	289,173	287,105	282,962	286,258	285,442
<b>11</b>	294,279	291,638	288,627	291,515	319,464	315,930	315,855	329,083
<b>12</b>	303,773	306,722	303,114	304,536	258,166	252,541	251,932	254,183
<b>13</b>	349,466	348,348	346,223	348,012	324,626	318,946	314,402	311,281
<b>14</b>	290,894	285,788	287,311	287,997	292,105	293,394	290,822	292,107
<b>15</b>	316,002	328,611	334,731	326,448	307,078	305,257	304,264	305,533

Média final -Teste 01 dia = 311,843

controle 01 dia = 316,857

**2) Medidas fotográficas do perímetro das feridas no dia 04 ( em pixels )**

<b>DIA 04</b>								
	<b>Teste</b>			<b>x</b>	<b>Controle</b>			<b>X</b>
1	154,116	159,072	153,072	155,397	290,981	289,817	294,401	291,763
2	274,426	274,061	276,454	274,980	287,409	298,000	286,777	290,729
3	223,101	216,816	227,917	222,611	291,246	289,838	290,432	290,504
4	344,408	335,572	336,782	338,921	277,672	278,251	275,653	290,505
5	281,320	272,865	275,829	310,005	190,366	193,266	189,217	190,950
6	277,052	275,504	277,102	276,553	281,702	276,198	282,489	280,130
7	142,909	143,063	152,392	146,121	319,976	327,573	319,751	322,433
8	313,936	311,322	308,885	311,381	300,745	309,172	305,945	305,287
9	303,261	301,216	293,642	299,373	133,778	144,437	145,778	141,331
10	305,290	308,833	305,579	306,567	242,101	244,597	238,704	241,801
11	325,193	327,795	333,103	328,697	217,752	221,391	220,516	219,886
12	299,116	292,176	291,284	294,192	297,201	306,915	299,492	301,203
13	296,845	296,550	292,980	295,458	225,896	236,788	232,777	231,820
14	203,845	202,445	203,980	203,423	215,854	219,476	212,465	215,932
15	177,088	192,333	198,494	189,305	268,515	262,869	270,285	267,222

Media final - Teste- 04 dias

263,532

Controle 4 dias 258,766

**3) Medidas fotográficas do perímetro das feridas no dia 07 ( em pixels )**

<b>DIA 07</b>								
	<b>Teste</b>			<b>x</b>	<b>Controle</b>			<b>X</b>
1	233,439	232,229	230,181	231,616	227,937	237,526	232,040	232.501
2	192,782	191,657	200,613	195,017	221,915	226,894	224,795	224.535
3	182,743	184,350	176,727	181,273	244,955	204,055	215,050	221.353
4	166,904	169,897	163,458	166,753	160,475	161,221	153,808	158.501
5	231,889	235,874	235,862	234,541	157,249	163,681	161,822	160.917
6	149,688	137,015	148,976	145,226	218,811	212,966	241,345	224.374
7	103,461	096,359	109,285	103.035	245,287	251,853	248,707	248.615
8	201,972	195,074	197,831	198.293	192,338	209,560	205,274	202.390
9	170,462	169,241	167,586	169.096	086,946	102,095	100,925	096.655
10	173,064	167,643	171,399	170.702	137,507	153,975	145,149	145.543
11	218,974	218,693	221,558	219.742	156,765	171,522	168,857	162.381
12	162,443	171,155	169,949	167.849	208,306	210,022	203,600	207.309
13	165,059	168,927	155,392	163.126	246,726	251,530	256,385	251.547
14	162,637	149,130	144,606	152.124	190,344	203,887	207,706	200.645
15	150,616	157,852	157,690	155.386	192,577	201,209	207,874	200.553

Média final -Teste 07 dias =

176.918

controle 07 dias 195.855

4) Medidas fotográficas do perímetro das feridas no dia 11( em pixels )

DIA 11								
	Teste			X	Controle			x
1	030,263	029,303	030,291	29.952	0	0	0	0
2	0	0	0	0	034,489	034,144	028,810	32.481
3	033,353	034,648	034,777	34.259	097,952	098,231	099,972	98.718
4	091,063	090,479	091,728	91.090	062,651	062,445	067,113	64.070
5	040,475	041,305	041,982	41.254	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	043,052	048,970	044,954	45.659
8	0	0	0	0	048,580	047,209	050,121	48.636
9	069,407	070,645	061,910	67.321	080,599	083,623	077,609	80.610
10	035,926	031,882	029,773	32.527	0	0	0	0
11	0	0	0	0	040,465	032,778	039,168	37.470
12	038,050	040,680	037,206	38.645	048,108	041,006	044,693	44.602
13	057,434	059,804	060,583	59.273	0	0	0	0
14	0	0	0	0	034,084	025,127	028,970	29.394
15	037,385	033,953	032,807	34.715	0	0	0	0
Média final -Teste11 dias =				28,603	controle11 dias =			32,109

5) Medidas fotográficas do perímetro das feridas no dia 18 ( em pixels )

DIA 18								
	Teste			x	Controle			X
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0
7	029,896	031,313	024,392	28.533	038,360	037,435	036,925	37.573
8	0	0	0	0	0	0	0	0
9	038,257	039,628	037,359	38.415	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0
Média final -				Teste18 dias = 4,463	controle 18 dias=			2,505

**6) Medidas histométricas ( em pixels ) da área ulcerada obtidas no dia 01.**

REPETIÇÕES	CONTROLE	TESTE
1	174281	166509
2	106441	315167
3	138483	267822
4	64672	261630
5	115314	140027
Média final	119838,2	230231

**7) Medidas histométricas ( em pixels ) da distância entre bordas epiteliais obtidas no dia 04**

REPETIÇÕES	CONTROLE	TESTE
1	1.00	750.67
2	337.15	717.35
3	614.02	615.56
4	311.90	733.58
5	(.)	615.08
Média final	316.02	686.45

Obs. O valor ponto (.) indica um dado perdido.

**8) Medidas histométricas ( em pixels ) da área de tecido de granulação obtidas no dia 07.**

REPETIÇÕES	CONTROLE	TESTE
1	64868	114798
2	69685	163035
3	62799	211179
4	48453	100333
5	73173	288066
Média final	63177	162765

9) Medidas histométricas ( em pixels ) da área de tecido de granulação obtidas no dia 11.

REPETIÇÕES	CONTROLE	TESTE
1	52308	154917
2	41060	127061
3	31123	183389
4	43568	159134
5	(.)	149909

Média final                    **41310**                    **153801**

Obs. O valor ponto (.) indica um dado perdido.

10) Medidas histométricas ( em pixels ) da área de tecido de granulação obtidas no dia 18.

REPETIÇÕES	CONTROLE	TESTE
1	30178	157964
2	38634	157140
3	21470	144406
4	26997	99113
5	31707	(.)

Média final                    **29254**                    **137290**

Obs. O valor ponto (.) indica um dado perdido.



**SUMMARY**

## SUMMARY

The aim of this study was to evaluate the effect of Bismuth subgallate on wound healing. In fifty five Wistar rats, two standardised wounds were made with a biopsy punch ( 3,5 mm X 2,0 mm ) at the back of each rat. Test wound was filled with bismuth subgallate and the control with salina 0,9%. The periods of evaluation were 1, 4, 7, 11 and 18 days. The methods utilised were: qualitative evaluation of the granulation tissue morphology; evaluation of collagen synthesis ( polarisation microscopy / birefringence ); histometric evaluation of digitalized histology images and evaluation of a macroscopic ( photograph ) group. The results showed that: histologically there were no relevant differences between test and control, with collagen synthesis very similar to each other. At the photographic group, no statistically significant difference (ANOVA) was observed between test and control, related to the lateral closure of the wounds. Histometrically, the parameters analysed ( area of ulceration - Day 1; distance between epithelial edges - Day 4 and area of granulation tissue - Days 7, 11 and 18 ) showed that there were statistically significant differences between test and control ( ANOVA - Days 1 and 4; *student t* test ,  $p < 0,05$  - Days 7, 11 and 18 ). **It was concluded that bismuth subgallate did not interfere on wound healing quality, being biocompatible to the tissues, showing only a greater area of granulation tissue due to the physical presence of bismuth subgallate.**

**KEY WORDS:** Bismuth subgallate, wound healing

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

- 01) BARNETT, S.E. & VARLEY, S.J. The effects of calcium alginate on wound healing. *Ann. R. Coll. Surg. Engl.*, London, 69 (4): 153-5, July 1987.
- 02) BENOIT, P.W. & HUNT, L.M. Comparison of a microcrystalline collagen preparation and a gelatin foam in extraction wounds. *J. oral Surg.*, Chicago, 34 (12): 1079-83, Dec. 1976.
- 03) BLAIR, S.D. *et alii* Clinical trial of calcium alginate haemostatic swabs. *Br. J. Surg.*, Guildford, 77 (5): 568-70, May 1990.
- 04) BODNER, L. *et alii* Characteristics of palatal wound healing in desalivated rats. *Archs oral Biol.*, Oxford, 38 (1): 17-21, 1993.
- 05) BODNER, L. *et alii* Healing of experimental wounds in sialadenectomized rat. *J. clin. Periodont.*, Copenhagen, 19 (5): 345-7, 1992.
- 06) CALLANAN, V. *et alii* The influence of bismuth subgallate and adrenaline paste upon operating time and operative blood loss in tonsillectomy. *J. Lar. Otol.*, London, 109 (3): 206-8, Mar. 1995.
- 07) COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. Inflammation and repair. Chapter 3. *In: 1994, p. 85-88. Pathologic Basis of Diseases. 5.ed. Philadelphia: W.B. Saunders.*
- 08) COZZI, L.M. *et alii* Pulmonary sequelae of intraparenchymal Bismuth Subgallate. *Laryngoscope*, Saint Louis, 102 (6): 597-9, June 1992.

---

\* De acordo com a NB-66, de 1978, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Abreviatura dos periódicos de conformidade com o "World List of Scientific Periodicals".

- 09) ESMON, C.T. Cell mediated events that control blood coagulation and vascular injury. *A. Rev. Cell Biol.*, Palo Alto, 9: 1-26, 1993.
- 10) EVANS, B.E. Local hemostatic agents. *N. Y. J. Dent.*, New York, 47 (4): 109-14, Apr. 1977.
- 11) *FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil*. 2.ed. São Paulo: Siqueira, 1959. v.2, p.483-484.
- 12) FEJERSKOV. O. Keratinized squamous epithelium of normal and wounded palatal mucosa in Guinea pigs. *Journal of periodont. Res.*, Copenhagen, 1-80, 1973. [Supplement, 11].
- 13) FENTON, J.E.; BLAYNEY, A.W.; O'DWYER, T.P. Bismuth subgallate - its role in tonsillectomy. *J. Lar. Otol.*, London, 109 (3): 203-5, Mar. 1995.
- 14) FLIER, J.S. & UNDERHILL, L.H. Molecular and cellular biology of blood coagulation. *N. Engl. J. Med.*, Waltham, 326 (12): 800-6, Mar. 1992.
- 15) FURIE, B. & FURIE, B.C. The molecular basis of blood coagulation. *Cell*, Cambridge, 53: 505-18, May 1988.
- 16) GOODMAN, L.S. & GILMAN, A. *Goodman e Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica*. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara - Koogan, 1983. v.2.
- 17) GORBACH, S.L. Bismuth therapy in gastrointestinal diseases. *Gastroenterology*, Philadelphia, 99 (3): 863-75, 1990.
- 18) GUYTON, A.C & HALL, J.E. Hemostasis and blood coagulation. Chapter 36. In: 1994, p.463-68. *Textbook of medical physiology*. 9<sup>o</sup>.Ed. Philadelphia : W.B. Saunders.

- 19) HARRISON, J.W. Healing of Surgical Wounds in oral mucoperiosteal tissues. *J. Endod.*, Baltimore, 17 ( 8 ): 401-8, Aug. 1991.
- 20) HEUGHNAN, C. & HUNT, T.K. Some aspects of wound healing research: a review. *Can. J. Surg.*, Ottawa, 18 (2): 118-27, Mar. 1975.
- 21) HUNT, L.M. & BENOIT, P.W. Evaluation of a microcrystalline collagen preparation in extraction wounds. *J. oral Surg.*, Chicago, 34 (5): 407-14, May 1976.
- 22) JARRET, J.N. Efficacious treatment of the common wart (*Verruca Vulgaris*). *W. Va Med. J.*, Charleston, 88 (9): 404-5, Sept. 1992.
- 23) JEFFERY, D.L. *et alii* Hemostatic and healing studies of sodium amylose succinate (IP760). *J. Biomed. Mater. Res.*, New York, 16 (1): 51-61, Jan. 1982.
- 24) KAHNBERG, K.E. & THILANDER, H. Healing of experimental excisional wounds in the rat palate. I. Histological study of the interphase in wound healing after sharp dissection. *Int. J. oral Surg.*, Copenhagen, 11 (1): 44-51, 1982.
- 25) \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ Healing of experimental excisional wounds in the rat palate. II. Histological study of electrosurgical wounds. *Swed. dent. J.*, Stockholm, 8 (2): 49-56, 1984.
- 26) \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ Healing of experimental excisional wounds in the rat palate. III. Effects of radiation on wound healing. *Swed. dent. J.*, Stockholm, 11 (1-2): 61-70, 1987.
- 27) KIM, S.H.; GREIN, R.L. O subgalato de Bismuto em cirurgia periodontal. *Anais do 1º CIOPAR*, p.81 - 2. 1991.

- 28) KIM, S.H.; GREIN, R.L.; TRAMONTINA, V.A. Aplicação do Subgalato de Bismuto como hemostático em cirurgia periodontal. *J. bras. Odont. clin.*, 1 (1): 31-4, jan./fev. 1997
- 29) KRAMER, G.M. & POLLACK, R. Clinical application and histologic evaluation of microfibrillar collagen hemostat (Avitene\*) in periodontal surgery. *Int. J. periodont. restor. Dent*, Carol Stream, 2 (1): 8-16, 1982.
- 30) LAMBERT, J.R. Pharmacology of Bismuth-Containing Compounds. *Rev. infec. Dis.*, Chicago, 13: S691-5, July/Aug. 1991. [Supplement, 18]
- 31) LARJAVA, H. *et alii* Anti-integrin antibodies induce Type IV collagenase expression in keratinocytes. *J. Cell. Physiol.*, New York, 157 (1): 190-200, 1993.
- 32) LOWE, D.J. Adverse effects of bismuth subgallate. A further report from the Australian drug evaluation committee. *Med. J. Aust.*, Sydney, 2 (18): 664-6, 1974.
- 33) MANIGLIA, A.J.; KUSHNER, H.; COZZI, L. Adenotonsillectomy. A safe outpatient procedure. *Archs Otolar.*, Chicago, 115 (1): 92-4, 1989.
- 34) MARSHALL, B.J. *et alii* Antibacterial action of bismuth in relation to *Campylobacter pylorides* colonization and gastritis. *Digestion*, Basel, 37: 16-30, 1987. [Supplement, 2]
- 35) MATTHEW, I.R. *et alii* Alginate fiber dressings for oral mucosal wounds. *Oral Surg.*, Saint Louis, 77 (5): 456-60, May 1994.
- 36) *MERCK Index: an encyclopedia of chemicals and drugs*. 9.ed. Rahway: Merck & CO, 1976.

- 37) NASSIF, A.C.N. & PATROCÍNIO, J.A. O Subgalato de Bismuto nas Amidalectomias. *Revta bras. Med.*, São Paulo, 35 (8): 505-6, ago. 1978.
- 38) PRATT, L.W. & GALLAGHER, R.A. Tonsillectomy and adenoidectomy: incidence and mortality. *Archs Otolar.*, Chicago, 87 (2): 159-66, 1979.
- 39) RATNOFF, O.D. & CRUM, J.D. Activation of Hageman factor by solutions of ellagic acid. *J. Lab. clin. Med.*, Saint Louis, 63 (3): 359-77, Mar. 1964.
- 40) REYNOLDS, J.E.F. *Martindale the extra pharmacopoeia*. 29.ed. London: Pharmaceutical Press, 1989. p. 777,1548.
- 41) SALO, T. *et alii* Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 during early human wound healing. *Lab. Invest.*, Baltimore, 70 (2): 176-82, 1994.
- 42) SAROFF, S.A. *et alii* Free soft tissue. Hemostasis and protection of the palatal donor site with a microfibrillar collagen preparation. *J. Periodont.*, Chicago, 53 (7): 425-8, July 1982.
- 43) SCHACHTER, D. History of the evolution of methods and the study of blood coagulation. *Surgical bleeding : Handbook for medicine, surgery and specialities*. A.W. Ulin and S.S. Gollub (editors). The Blakiston Division. McGraw-Hill Co., New York, 1966. **apud** WILNER, G.D.; NOSSEL, h.I.; LEROY, E.C. Aggregation of platelets by collagen. *J. clin. Invest*, New York, 47 (12): 2616-21, 1968.
- 44) SCHITTEK, A. *et alii* Micocrystalline collagen hemostat (MCCH) and wound healing. *Ann. Surg.*, Philadelphia, 184 (6): 697-704, Dec. 1976.

- 45) SHADLE, P.J. & BARONDES, S.H. Adhesion of human platelets to immobilized trimeric collagen. *J. Cell. Biol.*, New York, 95 (1): 361-5, Oct. 1982.
- 46) SILVERSTEIN, M.E. & CHVAPIL, M. Experimental and clinical experiences with collagen fleece as a hemostatic agent. *J. Trauma*, Baltimore, 21 (5): 388-93, May 1981.
- 47) STEIN, M.D. *et alii* Collagen sponge as a topical hemostatic agent in mucogengival surgery. *J. Periodont.*, Chicago, 56 (1): 35-8, Jan. 1985.
- 48) TANNOUS, W.N.; AZOUZ, E.M.; TEWFIK, T.L. Pitfall-to-avoid pharyngeal opacities caused by bismuth subgallate. *J. Can. Ass. Radiol.*, Montreal, 40 (6): 312, Dec. 1989.
- 49) TENERY, J.H. Personal communication *Apud* ABBOTT, W.M. & AUSTEN, G. *Op. cit.* Ref. 84.
- 50) THORISDOTHIR, H.; RATNOFF, O.D.; MANIGLIA, A.J. Activation of Hageman factor ( factor XII ) by bismuth subgallate, a hemostatic agent. *J. Lab. clin. Med.*, Saint Louis, 112 (4): 481-6, Oct. 1988.
- 51) VISTNES, L.M. *et alii* Control of capillary bleeding by topical application of microcrystalline collagen. *Surgery*, Saint Louis, 76 (2): 291-4, Aug. 1974.
- 52) WILNER, G.D.; NOSSEL, H.L.; LEROY, E.C. Aggregation of platelets by collagen. *J. clin. Invest.*, New York, 47 (12): 2616-21, 1968.

- 53) WIRTHLIN, M.R.; VERNINO, A.R.; HANCOCK, E.B. The use of a new topical hemostatic agent. *J. Periodont.*, Chicago, 51 (4): 225-7, Apr. 1980.
- 54) WORMALD, P.J. & SELLARS, S.L. Bismuth subgallate: a safe means to a faster adenotonsillectomy. *J. Lar. Otol.*, London, 108 (9): 761-2, Sept. 1994.
- 55) YATES, S.; BARNETT, C.; PETERSON, W.L. Enteric-Coated Charcoal as a means of blinding studies comparing Bismuth and H<sub>2</sub> - receptor antagonists. *Am. J. Gastroenterol.*, New York, 87 (8): 981-4, 1992.