



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ**  
**ESCOLA DE CIÊNCIAS DA VIDA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**  
**ÊNFASE EM ORTODONTIA**

**ITALO NOGIRI FILHO**

**EFEITO DO SUBGALATO DE BISMUTO NAS FERIDAS DA  
MUCOSA PALATINA. ESTUDO HISTOMÉTRICO DA POPULAÇÃO  
DE MASTÓCITOS EM RATOS**

**Curitiba  
2009**

**ITALO NOGIRI FILHO**

**EFEITO DO SUBGALATO DE BISMUTO NAS FERIDAS DA MUCOSA  
PALATINA. ESTUDO HISTOMÉTRICO DA POPULAÇÃO DE MASTÓCITOS  
EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia, Ênfase em Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. Sung Hyun Kim

**Curitiba  
05/06/2009**

Dados da Catalogação na Publicação  
Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR  
Biblioteca Central  
Luci Eduarda Wielganczuk – CRB 9/1118

N777e  
2009      Nogiri Filho, Italo  
            Efeito do subgalato de bismuto nas feridas da mucosa palatina : estudo  
            histométrico da população de mastócitos em ratos / Italo Nogiri Filho ;  
            orientador: Sung Hyun Kim. – 2009.  
            63 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná,  
Curitiba, 2009  
Bibliografia: f. 54-56

1. Ortodontia. 2. Palato – Ferimentos e lesões – Tratamento. 3. Bismuto.  
4. Hemostáticos. 5. Mastócitos. I. Kim, Sung Hyun. II. Pontifícia Universidade  
Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. III. Título.

617.643

CDD 20. ed. –



Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

## TERMO DE APROVAÇÃO

**ITALO NOGIRI FILHO**

### **EFEITO DO SUBGALATO DE BISMUTO NAS FERIDAS DA MUCOSA PALATINA. ESTUDO HISTOMÉTRICO DA POPULAÇÃO DE MASTÓCITOS EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos parciais para a obtenção do Título de Mestre em Odontologia, Área de Concentração em Periodontia.

Orientador (a):

  
Prof. Dr. Sung-Hyun Kim  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR

  
Prof. Dr. Vinícius Augusto Tramontina  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR

  
Prof. Dr. Antonio Adilson Soares de Lima  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, UFPR

Curitiba, 05 de junho de 2009.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao meu orientador Dr. Sung Hyun Kim por ter um papel muito importante na minha formação profissional.

Agradeço a todos os meus mestres que me orientaram na Periodontia e Implantodontia.

Agradeço aos professores de patologia Antônio Adilson S. Lima e Jaime Bordini Júnior pelo grande apoio e orientação.

Agradeço aos professores, Vinícius Augusto Tramontina, Vula Papalexiou e a todos os professores do programa de mestrado da PUC PR, pelos ensinamentos e momentos de boa convivência.

Agradeço ao Professor Doutor Sérgio Vieira pelo trabalho realizado na PUCPR com a pós-graduação de Odontologia.

Ao professor Dr. Sérgio Ignácio, professor de Estatística do Mestrado de Odontologia da PUCPR.

Agradeço também a todos meus amigos, pois tornam a vida mais divertida.

Agradeço aos funcionários da PUC-PR que me ajudaram em todas as fases do curso.

Agradeço a minha equipe pela colaboração em todos os momentos da minha profissão.

Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

## LISTA DE ABREVIATURAS

G1 – Grupo que utilizou soro fisiológico estéril

G2 – Grupo que utilizou subgalato de bismuto

SB – Subgalato de Bismuto

T0 – tempo inicial do estudo

T1 – 3 dias após o T0

T2 – 7 dias após o T0

T3 – 15 dias após o T0

T4 – 30 dias após o T0

T5 – 60 dias após o T0

G1T1 – animais do grupo 1 no período T1

G1T2 – animais do grupo 1 no período T2

G1T3 – animais do grupo 1 no período T3

G1T4 – animais do grupo 1 no período T4

G1 T5 –animais do grupo 1 no período T5

G2T1 – animais do grupo 2 no período T1

G2T2 – animais do grupo 2 no período T2

G2T3 – animais do grupo 2 no período T3

G2T4 – animais do grupo 2 no período T4

G2T5 – animais do grupo 2 no período T5

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estatísticas descritivas do número de mastócitos segundo grupo.....	37
Tabela 2 - Estatísticas descritivas do número de mastócitos segundo grupo x tempo.....	38
Tabela 3 - Teste de variância ANOVA a dois critérios, modelo fatorial completo. ....	39
Tabela 4 - Teste de Tukey HSD segundo grupo versus tempo.....	39
Tabela 5 - Estatísticas descritivas do número médio de mastócitos em t <sub>0</sub> de t <sub>i</sub> segundo grupo.....	40
Tabela 6 - Teste de Levene para igualdade de variâncias.....	41
Tabela 7 - Estatísticas descritivas do número médio de mastócitos em t <sub>0</sub> de t <sub>i</sub> e t <sub>j</sub> para o grupo 1.....	41
Tabela 8 - Teste t de Student para amostras emparelhadas para o grupo 1.....	42
Tabela 9 - Estatísticas descritivas do número médio de mastócitos em t <sub>0</sub> de t <sub>i</sub> e t <sub>j</sub> para o grupo 2.....	42
Tabela 10 - Teste t de Student para amostras emparelhadas do grupo 2.....	43
Tabela 11- Teste de Tukey HSD segundo grupo x tempo.....	47

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Número médio de mastócitos segundo grupo.....	38
Gráfico 2 – Número médio de mastócitos segundo grupo x tempo.....	40
Gráfico 3 – Número médio de mastócitos segundo tempo 0 com tempo 1 e grupos.....	43
Gráfico 4 – Número médio de mastócitos segundo tempo 0 com tempo 2 e grupos.....	44
Gráfico 5 – Número médio de mastócitos segundo tempo 0 com tempo 3 e grupos.....	45
Gráfico 6 – Número médio de mastócitos segundo tempo 0 com tempo 4 e grupos.....	46
Gráfico 7 – Número médio de mastócitos segundo tempo 0 com tempo 5 e grupos.....	47

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Visualização da segunda prega palatina (seta).....	28
Figura 2- Medição com o compasso de ponta seca.....	28
Figura 3 - Medição do comprimento da prega palatina.....	29
Figura 4 - Demarcação do centro da prega palatina.....	29
Figura 5 - Bisturi circular para criação da ferida inicial.....	30
Figura 6 – Composto de Subgalato de Bismuto.....	31
Figura 7 - Tamponamento com gaze e soro fisiológico.....	32
Figura 8- Aplicação do Subgalato de Bismuto.....	32
Figura 9- Demarcação da área de remoção dos espécimes teciduais.....	33
Figura 10 -Visualização do espécime tecidual com a ferida inicial no centro.....	34
Figura 11- Fotomicrografia do corte do grupo 2 no período de 3 dias com aumento de 40 X. Área central da ferida.....	35
Figura 12 - Fotomicrografia da imagem processada pelo software do corte do grupo 2 no período de 3 dias com aumento de 100 x evidenciando mastócitos (setas).....	36

## RESUMO

O propósito deste estudo foi avaliar a resposta inflamatória de feridas da mucosa palatina de ratos em contato com o subgalato de bismuto e com soro fisiológico, através da contagem de mastócitos. Foram selecionados 50 ratos da raça Wistar, machos, adultos jovens, pesando em torno de 250 a 300 gramas e realizadas feridas padronizadas com diâmetro de 3,0 mm na região central do palato duro. Os animais foram divididos em dois grupos com 25 animais cada, separados de maneira aleatória e denominados de grupo 1 tratado com soro fisiológico e grupo 2 que recebeu o composto de subgalato de bismuto. As amostras colhidas no período inicial do estudo foram avaliadas. Nos períodos de 3, 7, 15, 30 e 60 dias foram mortos 5 animais de cada grupo e as amostras teciduais foram removidas. De cada peça foram obtidos seis cortes histológicos no centro da ferida e coradas com azul de toluidina a 0.2% por 30 segundos para avaliação histológica. Foi obtida a média do número de mastócitos de cada tempo do estudo dos 5 animais de cada grupo para a análise estatística com comparação entre os tempos e entre os grupos. Foi utilizado o teste estatístico de comparações múltiplas paramétricas de Tukey HSD para analisar as diferenças entre os tempos em ambos os grupos. No período de 3 dias o grupo 1 apresentou média de 7.40 mastócitos enquanto o grupo 2 apresentou média de 9,40 que quando comparados com a média de mastócitos no período inicial do estudo ambos os grupos apresentaram uma redução de mastócitos. O único período que apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos foi o de 7 dias com número médio de mastócitos de 10.80 para o grupo 1 e de 15.40 para o grupo 2. No período de 15 dias o número médio de mastócitos foi de 12.60 para o grupo 1 e de 13.20 para o grupo 2. No período de 30 dias ambos os grupos apresentaram número médio de mastócitos de 16.40. Para o período de 60 dias o grupo 1 apresentou número médio de mastócitos de 21.80 e o grupo 2 de 20.80. Com a avaliação dos resultados do estudo os autores sugerem que o efeito do subgalato de bismuto como agente hemostático demonstrou alterar a reação inflamatória inicial no período de 7 dias o que não atrasou a cicatrização das feridas quando comparado com a utilização de soro fisiológico.

**Palavras-chave:** subgalato de bismuto, hemostático tópico oral, mastócitos.

## ABSTRACT

This study aimed to assess the inflammatory response of wounds in the palatal mucosa of rats exposed to bismuth subgallate and saline solution using mast cell counts. Fifty young adult male Wistar rats weighing 250 to 300 grams were chosen, and 3.0 mm diameter wounds were made in the central region of the hard palate. The rats were randomly separated into two groups of 25 rats each. The group 1 were treated with saline solution and group 2 that received the bismuth subgallate compound. Samples collected were collected in periods of 3, 7, 15, 30 and 60 days, in each period, 5 animals from group 1 and 5 from group 2 were killed and tissue samples were removed. Six histological sections were obtained from the middle of the wound and stained with 0.2% toluidine blue for 30 seconds aiming the histological evaluation. An average number of mast cells at each time of the study were obtained for statistical analysis. Tukey HSD parametric multiple comparisons statistical test was used to analyze the differences between distinct times in both groups. Over the course of three days, group 1 had an average of 7.40 mast cells, while group 2 had an average of 9.40, indicating that both groups had a reduction in mast cells when compared to the initial period of the study. The only time when there was a significant difference between groups was 7 days after euthanasia, when group 1 had 10.80 mast cells and group 2 has 15.40. Over a 15-day period, the average number of mast cells in group 1 was 12.60 and 13.20 in group 2. Over the course of 30 days, both groups had an average of 16.40 mast cells. For the next 60 days, group 1 had an average number of mast cells of 21.80 and group 2, 20.80. When compared to the use of saline, the effect of bismuth subgallate as a hemostatic agent demonstrated to change the initial inflammatory reaction within 7 days and did not delay wound healing.

**Key words:** bismuth Subgalate, hemostatic oral topic, mast cells.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>16</b>
<b>3 PROPOSIÇÃO.....</b>	<b>27</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>27</b>
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>37</b>
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>48</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>53</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>55</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>58</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Como descrito na Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil (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  $C_7H_7O_7Bi$ . A preparação do subgalato de bismuto ocorre a partir da dissolução do subnitrito de bismuto em ácido acético diluído e com a precipitação do produto em composto com ácido gálico. Suas principais características são: forma de pó, coloração amarelo citrino, amorfo, inodoro, quase insípido, inalterável ao ar, 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 quente.

O subgalato de bismuto é um metal pesado utilizado para o tratamento de distúrbios como angina de Vincent, gengivite ulcerativa necrosante aguda e sífilis, assim como para redução do odor em procedimentos de colostomia e assepsia de feridas abertas. Alguns estudos demonstraram que o subgalato de bismuto ativa o fator XII (fator Hageman) da cascata de coagulação acelerando a formação do coágulo (Thorisdottir H, Ratnoff O, Maniglia A., 1988). Outros autores demonstraram o efeito do material em interromper o sangramento de vaso de menor calibre e capilares (Callanan V et al., 1995; Fenton JE et al., 1995).

Existe uma grande preocupação com a hemostasia durante procedimentos cirúrgicos. Para evitar complicações pós operatórias a ciência pesquisa muitos agentes hemostáticos locais. Estes agentes auxiliam na coagulação e garantem maior segurança principalmente em procedimentos que resultam na exposição de tecido conjuntivo. Com uma coagulação mais rápida, conseqüentemente obtêm uma redução do tempo operatório e menor incidência de complicações pós operatórias como hemorragia. (CALLANAN et al., 1995; FENTON, 1995; MANIGLIA, KUSHNER & COZZI, 1989; STEIN et al., 1985; WIRTHLIN, 1980; WORMALD & SELLARS, 1994).

Em periodontia existem procedimentos que necessitam maior atenção com relação à hemostasia, principalmente em áreas doadoras de enxerto gengivais livres localizadas na sua maior parte na região palatina. Com as incisões para remoção do enxerto de mucosa queratinizada, existe a ruptura de muitos vasos capilares e até vasos de maior calibre. A ciência, através de diversos estudos com substâncias e materiais no que concerne ao seu mecanismo de ação, efetividade hemostática e

efeitos biológicos sobre os tecidos, desenvolveu diversos agentes hemostáticos locais.(KIM, GREIN & TRAMONTINA, 1997; SAROFF et al., 1982; VISTNESS et al., 1974; WIRTHLIN, VERNINO & HANCOCK, 1980).

Algumas evidências clínicas demonstram que a formação do biofilme microbiano pode contribuir em cronificar algumas feridas (Bjarnsholt et al. 2008; Davis et al. 2008; James et al. 2008). As feridas crônicas com as em pés de diabéticos e úlceras venosas em pernas podem ser tornar dolorosas e trazer estresse aos pacientes quando os nervos forem prejudicados.

Os sais de bismuto tem um efeito sinérgico com antibióticos destruindo bactérias como um anti septico (HSU et al. 2008). Nos tratamentos de infecções causadas por *Helicobacter Pylori* terapias com amoxicilina, tetraciclina, inibidores da bomba de proton e os sais de bismuto foram efetivos como uma segunda linha de terapia (Chi et al. 2003).

Para obtenção da hemostasia em procedimentos de amigdalectomia e tonsilectomia, Nassif e Patrocínio (1978) foram os primeiros na utilização de uma pasta de subgalato de bismuto com o objetivo de controlar o sangramento. Foi constatada pelos autores uma redução no tempo operatório, redução no número de suturas e principalmente não foi relatada nenhuma complicação relacionada com intolerância ao material. Utilizando-se destes estudos relacionados com a Otorrinolaringologia, Kim, Tramontina e Grein(1997) ao perceber a dificuldade de se obter hemostasia na região doadora em procedimentos de enxerto gengival livre, realizaram estudo com o composto de subgalato de bismuto associado ao tamponamento com gaze para acelerar a coagulação.

De acordo com o estudo realizado por Maniglia, Kushner e Cozzi(1989) confirmaram a utilização do subgalato de bismuto associado à epinefrina como agente hemostático local e não apresentaram nenhum relato de complicação pós operatória como hemorragia imediata (< 24 horas) ou tardia (> 24 horas). O subgalato de bismuto mostrou-se um agente hemostático local seguro para utilização em procedimentos de tonsilectomias e adenotonsilectomias. Porém, apesar de ter indicação comprovada clinicamente, existem poucos estudos na literatura sobre os efeitos biológicos do material nos tecidos, referente ao processo de reparação.

Existem poucos relatos que se referem à toxicidade do subgalato de bismuto quando ocorre a absorção tecidual do material (REYNOLDS, 1989). Alguns autores explicam o número reduzido de adversidades pela estrutura química do composto. O

subgalato de bismuto é insolúvel em água, álcool e éter, ele é decomposto apenas por ácido clorídrico, nítrico e sulfúrico quentes (FARMACOPÉIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL, 1959). Devido à característica de insolubilidade, o material não apresenta nenhuma contra indicação no seu uso em meio bucal. Um cuidado fundamental para o uso do material é o de evitar a sua ingestão ou aspiração, utilizando-o em forma de pasta densa, localizada e bem controlada.

Murray, et al. (2000) publicaram artigo reportando à deficiência respiratória após aspiração do subgalato de bismuto. A aspiração do subgalato de bismuto provoca insuficiência respiratória em animais, mas até então não foi clinicamente correlacionada em humanos. No artigo os autores reportam dois casos de deficiência respiratória após procedimentos de adenoidectomia e tonsilectomia. Nenhuma das complicações necessitou de intubação ou resultou em uma complicação respiratória mais séria e ambos os pacientes apresentavam histórico de doenças respiratórias. Os autores sugerem que esse relato sirva para alertar os cirurgiões quando utilizarem o composto como agente hemostático local principalmente em pacientes que apresentam histórico de doenças respiratórias.

De acordo com Klueh, et al (2010) um dos primeiros fatores e a mais intensa resposta tecidual a implantação de qualquer objeto na pele é a ativação dos mastócitos. Como produto desta ativação dos mastócitos é liberada uma gama de mediadores pro inflamatórios e citocinas que imediatamente iniciam o processo inflamatório nos tecidos. Caso a injúria é mantida (ex. Inflamação crônica) os mastócitos podem sintetizar mais mediadores pro inflamatórios e citocinas que recrutam e ativam uma grande variedade de leucócitos incluindo macrófagos e linfócitos, que contribuem para a degradação tecidual e processo inflamatório. Os mastócitos podem também produzir fatores angiogênicos, como fator de crescimento vascular endotelial, que tem vital importância para a revascularização do tecido lesado. Os autores citam também a importância das citocinas e dos fatores de crescimento produzidos pelos mastócitos ativados que recrutam e ativam os fibroblastos que produzem a fibrose tecidual.

Os mastócitos são móveis, derivados da medula óssea, encontrados no tecido conjuntivo, mucosas e ao redor do sistema nervoso central (Purcell e Atterwill, 1995; Silver et al.,1996). Os mastócitos liberam mediadores inflamatórios como citocinas, aminas vaso ativadoras e enzimas sempre que ativados por estímulos que podem ser imunológicos ou não. Os mastócitos são encontrados em todos os tecidos da cavidade

bucal inclusive na polpa (Farnoush, 1984; Walsh et al. 1995). Os grânulos secretores dos mastócitos são corados por azul de toluidina e quando analisados por microscopia óptica aparentam formato circular, contudo em uma análise imunohistoquímica ou por microscopia eletrônica de transmissão aparentam o formato de dendritos (Kaminer et al., 1991; Walsh et al., 1991c). No entanto os mastócitos degranulados não são detectados por microscopia óptica, teste imunohistoquímico ou microscopia eletrônica de transmissão (Kaminer et al., 1991). Portanto com a análise quantitativa dos mastócitos podemos avaliar a resposta inflamatória dos tecidos frente ao subgalato de bismuto.

A aplicação deste composto para obtenção da hemostasia na mucosa bucal, principalmente em cirurgias que expõem o tecido conjuntivo, parece ser pertinente. Por sua vez, avaliar a reação inflamatória dos tecidos na presença do mesmo é importante. A falta de trabalhos que relacionam o subgalato de bismuto com o processo inflamatório nos levou a explorar o assunto. O objetivo do trabalho foi o de avaliar a reação inflamatória através da análise histométrica quantitativa do número médio de mastócitos em amostras da mucosa bucal de ratos submetidos a aplicação do subgalato de bismuto sobre as feridas, para obtenção de dados que nos permitam conclusões seguras para posterior indicação deste produto sem riscos para os pacientes.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

De acordo com o estudo de Ratnoff e Crum (1964), o subgalato de bismuto tem semelhança relacionada à sua estrutura química com o ácido elágico. O ácido elágico assim como o subgalato de bismuto é derivado do ácido gálico. O mecanismo de ação do ácido elágico como agente promotor da coagulação ocorre através da formação de trombina pela ativação da via intrínseca da cascata de coagulação. Os autores citaram que a atuação principal do ácido elágico é sobre o fator XII da coagulação sangüínea, através da adsorção deste fator do plasma por ter seus grupos químicos carregados negativamente. O ácido elágico tem a capacidade de acelerar a coagulação.

Segundo Lowe (1974), certos pacientes desenvolveram lassidão e perda de energia com sensações peculiares nos dedos e unhas após um longo tempo da ingestão do pó de subgalato de bismuto. Também foi relatado pelo autor casos de perda de memória e da capacidade de concentração com a ingestão deste produto. Foi ressaltado pelo autor que após a supressão do uso os sinais e sintomas citados acima desapareceram.

Conforme citado por Evans (1977), os agentes hemostáticos não devem retardar o processo de reparação e também não devem aumentar o risco de infecção da ferida. Foi citado pelo autor que cirurgias bucais podem ser realizadas de maneira segura com a utilização de medidas locais de hemostasia em pacientes com deficiência de coagulação como: falha na integridade dos vasos, da função plaquetária e ou dos fatores de coagulação que com sua interação convertem fibrinogênio em fibrina formando o coágulo. Existem restrições e limitações a essa regra, como pacientes com coagulopatias (hemofilia, induzidas por medicação anticoagulante, tromboembolismo e idiopáticas). Nestes pacientes o profissional deve procurar auxílio do médico antes da intervenção cirúrgica.

Na especialidade médica de otorrinolaringologia o subgalato de bismuto tem sido amplamente utilizado como agente hemostático. Nassif e Patrocínio (1978) relataram complicações na hemostasia desenvolvendo quadros de hemorragia em procedimentos de amigdalectomia e ou adenoidectomia tanto no trans como no pós-operatório. Em seu estudo os autores constataram uma redução significativa no tempo operatório e redução na quantidade de suturas necessárias para se obter hemostasia no grupo teste que utilizou o agente hemostático. Não foi relatada nenhuma reação adversa ou intolerância no grupo de pacientes que utilizaram o sal de subgalato de

bismuto. Como relatado por Bogliolo (1981), a histamina é produzida e armazenada principalmente pelos mastócitos. É contida, juntamente com a heparina em grânulos metacromáticos. A liberação de histamina dos mastócitos pela atuação do agente inflamatório realiza-se por mecanismos diversos, sendo dois os principais: agressão direta à membrana do mastócito, o que determina sua lise (ação de enzimas proteolíticas; de anticorpos e complemento sobre a membrana, etc.) e ação sobre os receptores de membrana, cuja estimulação promove liberação de histamina, sem lise da célula. É o que ocorre na reação do antígeno com o anticorpo citotrópico (IgE) sobre a membrana do mastócito, ou com a ação de peptídios básicos, anafilotoxina, prostaglandinas e algumas substâncias de alto peso molecular (dextran, etc.). A histamina é responsável pela vasodilatação e pelo aumento da permeabilidade vascular iniciais. Sua intervenção na reação inflamatória inicial está demonstrada com segurança, principalmente pelos fatos seguintes: é liberada das células em consequência de irritações inflamatórias (químicas, físicas, bacterianas, etc.).

Thorisdother, Ratnoff e Maniglia (1988) avaliaram o subgalato de bismuto que era até então utilizado de maneira empírica, na forma de pasta, contendo epinefrina como agente hemostático durante adenotonsilectomias. Foram utilizadas amostras de plasma de 24 pacientes, onde este foi colocado em contato com várias concentrações de subgalato de bismuto (desde 4 µg/ml até 1 mg por ml) e obtiveram uma redução no tempo de formação do coagulo quanto maior a concentração do subgalato de bismuto aplicado no plasma. Foi ressaltado pelos autores que o subgalato de bismuto não promoveu coagulação quando a amostra de plasma apresentava deficiência de algum dos fatores de coagulação da via intrínseca de formação de trombina. A ação do subgalato de bismuto ocorre nos primeiros momentos da via intrínseca, pois a ativação do fator XII depende da presença de pares de grupos carboxila na posição orto. De acordo com Reynolds (1989), o subgalato de bismuto não é usualmente absorvido, apresenta pequena penetrabilidade e afeta apenas as camadas superficiais das células. Este material tem efeito adstringente, pois precipita proteínas quando aplicado sobre mucosas ou sobre a pele injuriada formando uma camada protetora. Por este motivo, este produto tem sido empregado como pó para ser polvilhado em desordens da pele, hemorróidas, tratamento da diarreia, disenteria e colite ulcerativa. Os adstringentes são utilizados para proteger a pele e mucosas diminuindo secreções exudativas, bem como a hemorragia em úlceras bucais, hiperhidrose e hemorróidas. O autor relatou em seu estudo alguns efeitos adversos como

distúrbios gastrointestinais, reações na pele e descoloração de membranas e mucosas, podendo aparecer uma linha azulada na gengiva. Também foram relatados danos aos rins e fígado, presença de encefalopatia reversível, não sendo necessariamente associada ao uso prolongado dos sais de bismuto. Em alguns casos também foram relatadas alterações ósseas e articulares.

Com a publicação de um trabalho realizado por Maniglia, Kushner e Cozzi (1989) ressaltou-se o uso do subgalato de bismuto como agente hemostático. Foram avaliados 1428 pacientes submetidos a procedimentos de tonsilectomia e ou adenoidectomia. Como agente hemostático local foi utilizado o subgalato de bismuto. Os pacientes foram avaliados por 4 a 5 horas após o procedimento cirúrgico e somente receberam alta médica se não apresentavam nenhuma complicação pós operatória. Não houve nenhum caso de mortalidade, apenas 2 casos de hemorragia imediata ocorreram nas primeiras 24 horas (0,14%) e 2 casos de hemorragia posteriores após as primeiras 24 horas (0,14%), totalizando 0,28% do total dos pacientes. No ano seguinte foi publicado o estudo de Gorbach (1990), no qual o autor ressaltou a importância do subgalato de bismuto por possuir atividade antimicrobiana comprovada cientificamente. A partir de estudos realizados em biópsia endoscópica realizadas em pacientes tratados com sais de bismuto, demonstraram alterações na estrutura bacteriana com presença de vacuolização de seus componentes e deposição de material eletro denso observados na superfície externa e logo abaixo da parede celular dos microorganismos. Os autores sugeriram em sua publicação que os compostos com subgalato de bismuto têm ação direta sobre as bactérias e apresentam habilidade em interferir sobre a aderência do microorganismo ao epitélio. Em estudo publicado por Walsh et al. (1990) demonstraram que a síntese crônica de fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF) liberado pelos mastócitos mantém a migração dos leucócitos e promove a cronicidade da lesão inflamatória. O TNF exerce modestos efeitos quimiotáticos sobre os neutrófilos, contudo tem como principal atividade na adesividade das moléculas. A migração dos neutrófilos e linfócitos-T dentro dos tecidos inflamados pode ser orientada pelos TNF secretados pelos mastócitos. No estudo de Lambert (1991) o autor avaliou vários sais inorgânicos de bismuto e relatou a propriedade que estes têm em combater a bactéria *Helicobacter pylori*. Esta bactéria está diretamente relacionada com a formação de úlceras gástricas e intestinais. O autor concluiu que os sais de bismuto têm ação eficaz no tratamento de pacientes com úlcera gástrica e duodenal.

Em um estudo controlado e randomizado Wormalde Sellars (1994) avaliaram o uso de um composto de subgalato de bismuto como agente hemostático em procedimentos de adenotonsilectomia. No total 202 tonsilectomias foram separadas em dois grupos randomicamente. Em 90 pacientes foi usado subgalato de bismuto enquanto os outros 112 pacientes foram usados como controle. A média do tempo operatório reduziu de 11,5 para 9,9 minutos com o uso do subgalato. Esta redução foi estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ). Não foram relatadas complicações pós operatórias em ambos os grupos. Os autores concluíram que o uso do subgalato de bismuto em procedimentos de tonsilectomia ou adenotonsilectomia sozinho reduziu significativamente o tempo operatório e resultou em menor hemorragia intra-operatória.

Callanan, et al. (1995) realizaram um estudo com o objetivo de demonstrar o efeito da pasta de subgalato de bismuto com adrenalina aplicada nos procedimentos de tonsilectomia. Foram avaliados 98 pacientes em um estudo prospectivo com triagem randomizada. O sal de subgalato de bismuto foi misturado com 10 ml de solução salina e 0,03ml de 1:1000 de adrenalina para confeccionar uma pasta. Esta pasta foi utilizada como agente hemostático tópico nos procedimentos de tonsilectomia. O subgalato de bismuto atua ativando o fator XII acelerando a cascata de coagulação. A adrenalina promove vaso constricção facilitando a agregação plaquetária. A aplicação da pasta de subgalato de bismuto com adrenalina reduziu o tempo operatório em 23% ( $p < 0,05$ ) na equipe com maior treinamento e reduziu em 32% ( $p < 0,05$ ) o tempo operatório para equipe com menor treinamento. A hemorragia foi reduzida em 21% ( $p > 0,05$ ) comparada com a média das tonsilectomias pediátricas.

Com estudo publicado no mesmo ano, Fenton, Blayney e O'dwyer (1995) relataram que existe um grande esforço para identificar substâncias e de desenvolver técnicas para auxiliar o cirurgião na hemostasia em procedimentos cirúrgicos. O uso de subgalato de bismuto como agente hemostático foi testado em um estudo com 100 pacientes pediátricos aonde em 50 pacientes foi realizada a tonsilectomia com o subgalato como agente hemostático e nos outros 50 pacientes não foi usado nenhum agente hemostático ficando como grupo controle. O grupo teste teve 7,8 minutos de média no tempo de hemostasia enquanto o grupo controle apresentou uma média de 9,9 minutos representando uma diferença estatisticamente significativa. Os autores concluíram que a pasta de subgalato de bismuto com adrenalina reduz

significativamente o tempo operatório diminuindo o tempo de hemostasia, mas não reduzem a morbidade pós-operatória.

Com o intuito de observar os efeitos do subgalato de bismuto como agente hemostático em cirurgias periodontais, Kim, Tramontina e Grein (1997) apresentaram um relato clínico. De acordo com os autores a hemostasia em procedimentos cirúrgicos periodontais de enxertos de tecido conjuntivo ou gengival livre demanda muito tempo operatório. Estes procedimentos foram avaliados com a utilização do sal de subgalato de bismuto para hemostasia local. Como resultado do estudo, os casos tratados com o subgalato de bismuto demonstraram redução no tempo de cirurgia com aumento na segurança contra hemorragia.

Conley e Ellison (1999) descreveram a incidência de hemorragia primária pós tonsilectomia. No grupo teste foram avaliadas 705 crianças sem anormalidades de hemostasia no qual foi utilizado o sal de subgalato de bismuto como agente hemostático e no grupo controle foram avaliadas 581 crianças submetidas ao procedimento padrão com tamponamento com gaze embebida com soro fisiológico estéril. Nenhum episódio de hemorragia primária (nas primeiras 24 horas) ocorreu e a incidência de hemorragia tardia (após as primeiras 24 horas) foi de 1.1% no grupo teste. A média de hemorragia primária foi significativamente inferior ( $p=0.007$ ) no grupo teste que no controle (0% versus 1.0%), assim como no número total de hemorragia (1.1% versus 4.1%) e de hemorragias tardias (1.1% versus 3.1%). Os autores concluíram que o uso do subgalato de bismuto como agente hemostático reduz significativamente a incidência de hemorragias em procedimentos de tonsilectomia.

No intuito de comprovar a eficácia hemostática do subgalato de bismuto em procedimentos de tonsilectomia, Sorensen, Henrichsen, Bonding (1999) realizaram um estudo em 204 pacientes divididos em dois grupos. No grupo teste foi utilizada a pasta de subgalato de bismuto com adrenalina e no grupo controle apenas compressão com gaze e soro fisiológico. Foram relatados o tempo operatório, o tempo para se obter hemostasia e hemorragia pré e pós operatória, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos. Foi concluído pelos autores que a evidência para o uso do subgalato de bismuto como agente hemostático local é fraca. De acordo com os autores o efeito relatado em artigos prévios relacionado com o efeito hemostático do subgalato de bismuto deve estar relacionado com a adrenalina associada ao sal.

Murray, et al. (2000) publicaram artigo relacionado à deficiência respiratória após aspiração do subgalato de bismuto. De acordo com pesquisas anteriores o subgalato de bismuto atua como agente hemostático ativando o fator XII da cascata da coagulação. Este sal é utilizado em procedimentos de tonsilectomia e adenotonsilectomia. A aspiração do subgalato de bismuto provoca insuficiência respiratória em animais, mas até então não foi clinicamente correlacionada em humanos. No artigo os autores reportam dois casos de deficiência respiratória após procedimentos de adenotonsilectomia. Nenhuma das complicações necessitou de intubação. Os autores sugerem que esse relato de casos de deficiência respiratória após inalação do subgalato de bismuto sirva para alertar os cirurgiões quando o utilizarem como agente hemostático em procedimentos de adenotonsilectomias.

Hatton (2000) avaliou a pasta de subgalato de bismuto com epinefrina como agente hemostático local em procedimentos de adenotonsilectomias. Foi realizada a pesquisa no banco de dados do *medline* de Janeiro de 1966 até Outubro de 1999 e também foram pesquisados os dados publicados de Janeiro de 1977 até Outubro de 1999. Os termos utilizados para pesquisa foram: subgalato de bismuto, adenoidectomia, tonsilectomia, e adenotonsilectomia. Os autores relataram que procedimentos de adenotonsilectomias são procedimentos comuns, embora existam algumas complicações como hemorragia o subgalato de bismuto tem sido utilizado como agente adstringente e hemostático. Os autores concluíram que existe pouca evidência científica que comprove o uso do subgalato de bismuto com epinefrina como agente hemostático. A literatura sugere que a epinefrina deve ser o ingrediente ativo relacionado à hemostasia. A pasta é de baixo custo, oferece pouco risco e reduz o sangramento pós operatório. Contudo, a pasta se porta como um agente hemostático local razoável.

Tramontina, et al. (2002) avaliaram o efeito do subgalato de bismuto na reparação de feridas no dorso de ratos Wistar. Foram avaliados 40 ratos e duas feridas foram realizadas e padronizadas com a utilização de um bisturi circular para biópsia de 3.5 mm. De um lado foi utilizado tamponamento com gaze embebida com soro fisiológico e do outro o subgalato de bismuto. As feridas foram avaliadas histologicamente nos períodos de 1, 4, 7, 11 e 18 dias. A evolução qualitativa do tecido de granulação foi avaliada histologicamente e imagens digitalizadas foram medidas histométricamente. A avaliação histológica não apresentou diferença estatisticamente significativa, enquanto que na histometria houve diferença. Em seu estudo o autor

concluiu que o subgalato de bismuto é biocompatível aos tecidos de reparação e não interferiu significativamente com o desenvolvimento do processo de reparação.

De acordo com o relato de Boyce (2003), os mastócitos são células inflamatórias presentes no tecido conjuntivo com origem na medula óssea que respondem as injúrias ao organismo liberando mediadores químicos fundamentais para o processo inflamatório. A distribuição espacial dos mastócitos indica que estas células se localizam preferencialmente ao redor de vasos e nervos. Os mastócitos reconhecem diretamente os produtos das infecções bacterianas através de uma variedade de receptores de superfície, liberam proteases, citocinas, recrutam neutrófilos e com isso facilitam a reparação tecidual. Mastócitos ativados sintetizam e secretam uma série de citocinas pró-inflamatórias, quimioatrativas e moduladoras do sistema imunológico durante o período inicial do processo inflamatório. A liberação destes mediadores químicos resulta no extravasamento do exsudato, edema tecidual, bronco constrição, recrutamento de leucócitos e inflamação das mucosas.

Walsh (2003) descreveu em seu artigo o comportamento dos mastócitos em inflamações bucais. Estas células contem citocinas pró inflamatórias em seus grânulos que ao ser liberadas promovem a infiltração dos leucócitos durante o processo inflamatório. Os principais mediadores inflamatórios secretados pelos mastócitos são: serina protease triptase, quimase, catepsina G, histamina, heparina, serotonina, hidrolase ácida, citocinas ativadoras do fator de necrose tumoral- $\alpha$  e a interleucina-16. Cada mastócito possui de 80 a 300 grânulos em media. Quando ativados os mastócitos podem degranular de maneira explosiva ou podem degranular de maneira fasciculada. Na mucosa bucal de humanos o tipo predominante de mastócitos armazenam usualmente histamina e fator de necrose tumoral- $\alpha$  como mediadores químicos. A triptase é uma proteinase encontrada nos mastócitos e basófilos com função principal de reparação epitelial, recrutamento de granulócitos e degradação do tecido conjuntivo ativando a pro colagenase. O fator de necrose tumoral derivado dos mastócitos tem como papel principal a estimulação da secreção dos linfócitos T de gelatinase MMP-9 que degrada o colágeno tipo IV que facilita a migração dos leucócitos na região inflamada. O fator de necrose tumoral- $\alpha$  também atua induzindo a expressão da selectina-E que atua na rápida adesão dos neutrófilos, linfócitos-T, monócitos e outros leucócitos nas células endoteliais. A histamina liberada pelos mastócitos tem um papel importante nas mudanças ocorridas na

permeabilidade vascular por alterações estruturais no endotélio microvascular como a contração endotelial e a formação de espaços intercelulares. Nas inflamações bucais, a degranulação dos mastócitos pode ser evidenciada pela secreção dos grânulos com cortes histológicos corados por azul de toluidina ou análise imuno histoquímica. Ao avaliar que os mastócitos tem importante papel no processo inflamatório o autor sugere que terapias envolvendo o controle da função dos mastócitos podem ter valor no tratamento de desordens inflamatórias crônicas na cavidade bucal.

Ao avaliar que as maiorias das lesões de pele cicatrizam entre 1 a 2 semanas Mai, et al (2003) avaliaram um medicamento que propõe facilitar a cicatrização assim como controlar a sua qualidade referente à função e estética do tecido novo. O nome comercial do medicamento é Subolgin e tem como componentes principais subgalato de bismuto e borneol. Embora o Borneol tenha propriedades antibióticas e o subgalato de bismuto seja amplamente utilizado na clínica, nenhum tinha sido utilizado especificamente para cicatrização de feridas. O experimento teve como objetivo avaliar o efeito do subgalato de bismuto e do borneol na cicatrização de feridas. Este estudo também comparou o subolgin com o flamazine que é o medicamento mais popular para tratamento de feridas de pele em hospitais. Foram criadas feridas de espessura total padronizadas no dorso de ratos adultos machos Sprague-Dawley. Os animais foram divididos de maneira randômica em 7 grupos: grupo com subgalato de bismuto e vaselina (BSV), grupo com vaselina e borneol (BOV), grupo com borneol e vaselina mais subgalato de bismuto (BS + BOV), grupo com vaselina (V), Flamazine (F), controle sem tratamento e grupo normal sem injúria e sem tratamento. O grupo normal continha 3 ratos enquanto os outros grupos continham de 6 a 7 ratos cada. Os medicamentos foram reaplicados a cada 2 dias até a completa cicatrização. O grupo que recebeu a combinação de borneol com subgalato de bismuto obteve o melhor efeito na cicatrização pela redução da área da lesão, e aumento da formação de tecido de granulação, re-epitelização e reconstituição das propriedades do tecido. Os autores concluíram que o subgalato de bismuto associado ao borneol tem um efeito de sinergismo na cicatrização das de feridas de pele.

Ao observar que o subgalato de bismuto é amplamente usado na clinica para tratamento de sífilis, adenotonsilectomias, angina de Vincent's, gengivite necrosante aguda, entre outras, Lin, Shen e Wu (2004) avaliaram o efeito do subgalato de bismuto

sobre o ácido nítrico e a produção de prostaglandina E2 que são importantes mediadores do processo inflamatório. O subgalato de bismuto aumenta a produção de TGF beta 1 que em termos pode promover a degradação do RNA mensageiro de ácido nítrico inibindo a sua produção. Adicionalmente o subgalato de bismuto inibe a expressão do RNA mensageiro de prostaglandina e a atividade da COX 2. O subgalato de bismuto causa supressão da produção de óxido nítrico e prostaglandina E2 de maneira dose dependente. Os autores concluíram que a inibição da prostaglandina E2 pelo subgalato de bismuto exerce efeito indireto referente à inibição do óxido nítrico.

Avaliando cirurgias de adenotonsilectomia, Garcia e Pérez (2006) citaram a hemorragia como a mais comum das complicações pós operatórias nestes procedimentos. Os autores citaram que o subgalato de bismuto ajuda no diagnóstico preciso da região com sangramento durante o procedimento operatório. De acordo com os autores o subgalato tem ação hemostática, pois ativa o fator XII da coagulação.

Weller et al. (2006) relataram que a ativação dos mastócitos e a liberação de histamina tem papel fundamental para uma cicatrização normal das feridas cutâneas. Foi realizado estudo experimental de feridas induzidas nas peles de ratos com deficiência de mastócitos, em ratos normais e em ratos deficientes de mastócitos reconstituídos com células derivadas da medula óssea. O fechamento da ferida em ratos com ausência de mastócitos foi debilitada durante os seis primeiros dias da análise da cicatrização da ferida. A avaliação histomorfométrica revelou uma degranulação dos mastócitos maior quanto mais perto estiverem da ferida. Além disso os animais sem mastócitos demonstraram um recrutamento de neutrófilos reduzido para a região da ferida. Contudo o fechamento da ferida e o recrutamento dos neutrófilos para região da ferida aparentou normalidade nos animais sem mastócitos reconstituídos. Também foi avaliado o papel dos mastócitos na cicatrização das feridas pela liberação de histamina ou o fator de necrose tumoral- $\alpha$ . O fechamento das feridas foi reduzido em ratos tratados com um antagonista dos receptores de histamina ou na ausência de fator de necrose tumoral- $\alpha$ .

Em estudo realizado por Serena et al.(2007), relataram que o modelo de biópsias humana de ante-braço pode avaliar o efeito de novos agentes em feridas agudas. Subgalato de bismuto/borneol (Suile) é um novo produto regulamentado pelo FDA para tratamento de feridas de espessura parcial. Artigos recentes reportaram a

efetividade do Suile para tratamento de feridas de espessura total pelas suas propriedades antimicrobianase hemostáticas. Em um estudo randomizado avaliado por um investigador cego, 20 indivíduos saudáveis se submeteram a duas biópsias de espessura total com 6 mm de diâmetro, realizadas no antebraço. No grupo teste foi aplicado o Suile e no controle Bacitracin. As feridas foram examinadas, mensuradas por planimetria digital e fotografadas diariamente até a cicatrização. Reações adversas e o nível de dor foram monitorados. O tempo para o completo fechamento da ferida foi determinado. Comparações quantitativas e qualitativas diretas da cicatrização das feridas foram realizadas. O grupo teste apresentou uma cicatrização bem mais rápida que o grupo controle avaliando todos os indivíduos. Em avaliações comparativas no mesmo indivíduo as biópsias tratadas com Suile cicatrizaram mais rápido ( $p=0,03$ ). Neste estudo foram achadas evidências fortes que o Suile resultou em cicatrizações mais rápidas que o Bacitracin neste modelo de estudo.

Em estudo realizado por Wilgus (2008) foi descrita a influência das células imunológicas na cicatrização de feridas na pele. Com relação aos mastócitos o autor citou a capacidade de liberar mediadores inflamatórios dentro da ferida. Contudo estas células são melhor conhecidas no seu papel nas reações alérgicas mas o autor citou estudos que sugerem que os mastócitos regulam a infiltração dos neutrófilos na ferida.

Em recente estudo publicado Puia et al. (2009) avaliaram de maneira quantitativa e qualitativa a cicatrização de alvéolos frescos de ratos com a presença do subgalato de bismuto como agente hemostático. Foram extraídos os primeiros molares mandibulares bilateralmente de 40 ratos. Os animais foram separados randomicamente, de um lado o subgalato de bismuto foi posicionado imediatamente após a extração enquanto que do outro lado foi mantido apenas o coágulo. Os animais foram mortos imediatamente, 7, 14 e 30 dias após a cirurgia. As mandíbulas foram radiografadas e processadas para avaliação histológica.

Atualmente Farahani et al. (2010) publicaram artigo avaliando diferentes níveis de fibrose com a contagem do número médio de mastócitos e também correlacionaram a contagem de mastócitos com o nível da inflamação. Em um estudo trans seccional foram avaliadas 40 amostras de fibroma irritativo, hiperplasia inflamatória fibrosa, granuloma periférico de células gigantes e fibroma periférico ossificante comparados com cinco amostras de tecido gengival normal. Foi contado o número médio de mastócitos em 5 campos que de cada corte corado por azul de toluidina. Foi avaliado o nível de inflamação em cada caso e foi realizada análise

estatística. Os autores encontraram um aumento no número médio de mastócitos das amostras realizadas com tecidos inflamados quando comparadas as amostras dos tecidos normais. Uma significativa correlação foi encontrada entre os níveis de inflamação e o número médio de mastócitos. Os achados deste estudo sugerem que os mastócitos tem um papel importante na síntese de colágeno e conseqüentemente na variação das características microscópicas das lesões dos tecidos moles bucais.

Em estudos recentes Chung JW et al. (2011) evidenciaram a terapia quadruple a base de Bismuto indicada para tratamento de gastrite crônica, úlcera péptica e linfomas em mucosa gástrica todos relacionados a *Helicobacter Pylori* como uma segunda linha eficaz de terapia. Com o aumento da resistência bacteriana frente as antibióticos é de suma importância uma segunda linha de terapia.

### 3 PROPOSIÇÃO

O propósito deste estudo foi avaliar a resposta inflamatória de feridas da mucosa palatina de ratos, em contato com o subgalato de bismuto e com soro fisiológico utilizados como agentes hemostáticos locais, por meio da contagem de mastócitos.

### 4- MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado ao receber parecer favorável pelo Comitê de Ética no uso de animais da Pontifícia Universidade Católica do Paraná sob o registro do parecer no CEUA/PUCPR nº 347 na data 16 de Junho de 2008. Foram selecionados 50 ratos da raça Wistar, machos, adultos jovens, pesando em torno de 250 a 300 gramas, obtidos de criadores indicados pelo TECPAR e adquiridos através da PUCPR. Os animais foram operados no Laboratório de Técnica Operatória, localizado no Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da PUCPR .

Os animais foram anestesiados com Tiopental sódico (Cristália, São Paulo, Brasil), via intramuscular, com a dosagem de 25 MG/kg de peso, após jejum alimentar prévio de 12 horas e hídrico por 6 horas, os animais foram conduzidos à sala de experimentação, dentro do Laboratório de Técnica Operatória, localizado no Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) da PUC-Pr.

Após a anestesia, realizou-se assepsia bucal com solução de clorexidina a 0,2% (Periogard® – Colgate) por meio de imbricação com gaze estéril. A seguir foi realizada ferida padronizada na região central do palato duro dos ratos, sendo uma ferida apenas por palato, seguindo a direção da rafe palatina na região da segunda prega (figura 1). Para localizar o centro da ferida foi utilizado um compasso de ponta seca para mensurar o comprimento total da segunda prega palatina (figura 2). Com a medida (figura 3) foi possível localizar o centro da prega palatina dividindo o comprimento total pela metade e demarcando o centro para orientar a localização da ferida inicial (figura 4). Todas as feridas iniciais foram feitas com um bisturi de lâmina circular “punch” (Miltex Co, Lake Success, N.Y., USA) padronizado, de três milímetros de diâmetro (figura 5). Após o uso do bisturi circular foi utilizada uma pinça e uma lâmina de bisturi número 11 (Miltex Co, Lake Success, N.Y., USA) para remoção do tecido incisado. Todo o material obtido pela biópsia tecidual inicial foi utilizado como o tempo 0.

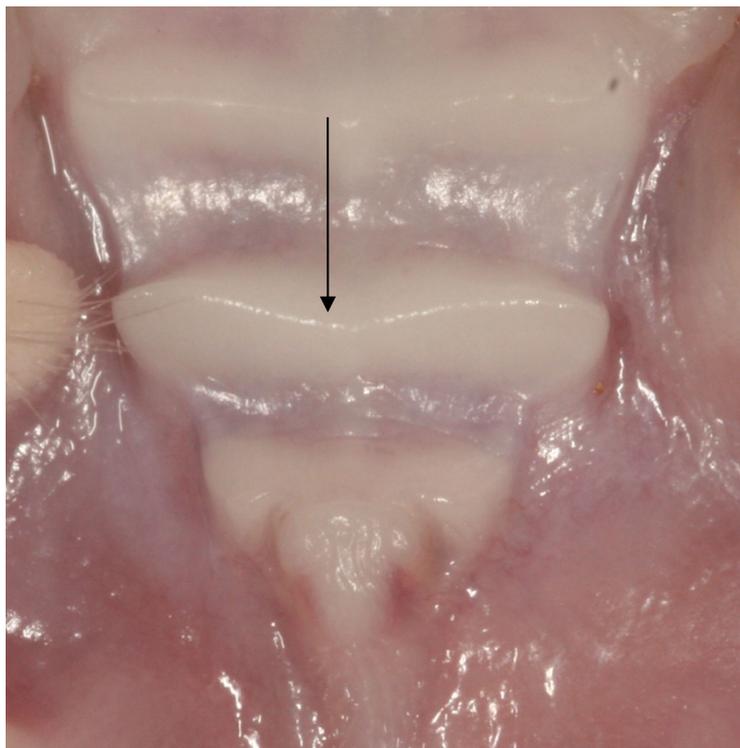


Figura 1 -Visualização da segunda prega palatina (seta)

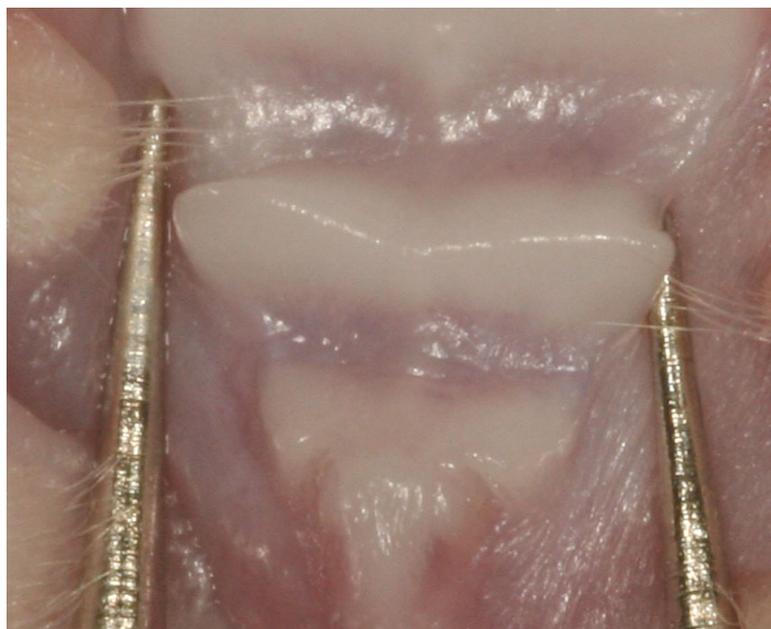


Figura 2-Medição como compasso de ponta seca

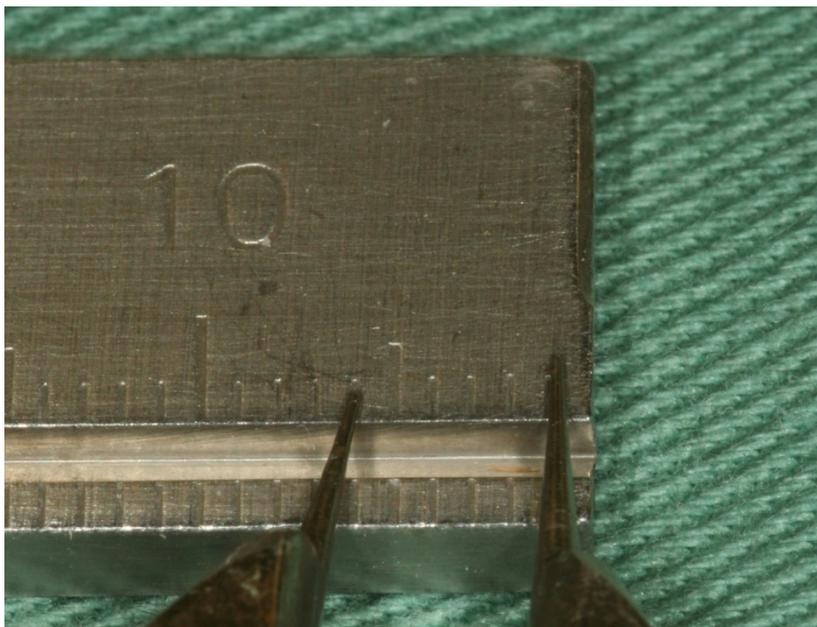


Figura 3—Medição do comprimento da prega palatina

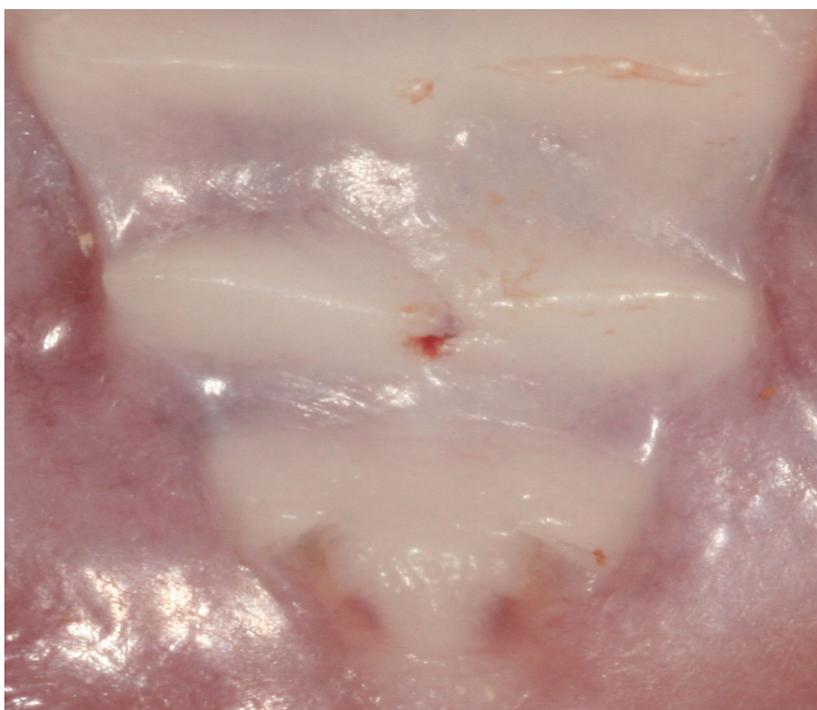


Figura 4- Demarcação do centro da prega palatina

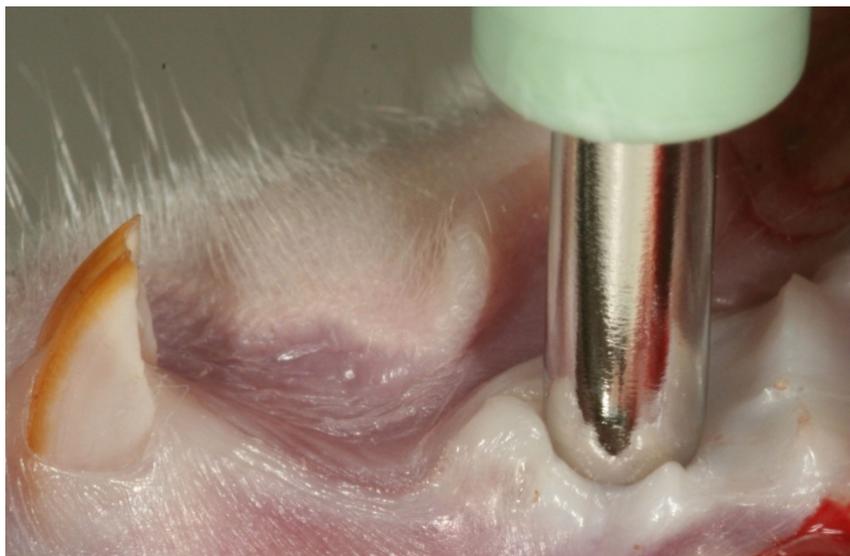


Figura 5- Bisturi circular para criação da ferida inicial

Os animais foram divididos em dois grupos, 1 e 2, cada um contendo 25 ratos. No grupo 1 foi aplicada a solução fisiológica a 0,9% à temperatura ambiente onde a hemostasia foi obtida com auxílio de compressão com gaze estéril. No grupo 2 foi aplicado o composto de subgalato de bismuto com o auxílio de compressão com gaze estéril. O composto de subgalato de bismuto foi preparado diluindo-se 14 g de pó de subgalato de bismuto (O Formulário, Curitiba, Brasil) em 15 ml de solução fisiológica para obtenção de uma consistência de “creme dental”, como descrito por Cozzi et al. (1992).

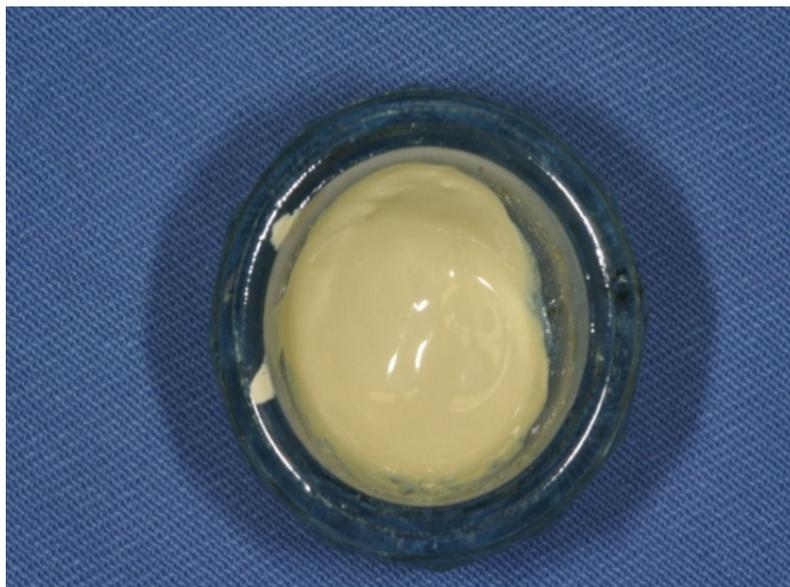


Figura 6 – Composto de Subgalato de Bismuto

Nos períodos de 3, 7, 15, 30 e 60 dias foram coletados os espécimes teciduais com um bisturi circular “*punch*” (Miltex Co, Lake Success, N.Y., USA) de cinco milímetros de diâmetro, também na região central do palato duro dos ratos, sendo uma ferida apenas por palato, seguindo a direção da ferida inicial na região da segunda pregapalatina. Durante o período de observação, todos os animais foram medicados, no pós-operatório imediato com 0,05mg/kg de Cloridrato de Buprenorfina (Temgesic®, Schering Plough, Bruxelas, Bélgica), via intra muscular, a cada 12 horas, por dois dias como analgésico.



Figura 7 - Tamponamento com gaze e soro fisiológico



Figura 8–Aplicação do Subgalato de Bismuto

Uma vez concluído o procedimento cirúrgico, os animais foram colocados isoladamente em suas gaiolas para a recuperação anestésica.

Permaneceram durante todo o período do experimento no Biotério da PUC/PR, com um mínimo de manipulação.

A cada data de coleta do material, para a remoção dos espécimes teciduais, os animais foram mortos com injeção intraperitoneal de pentobarbital (Nembutal®, Ovation Pharmaceutical Inc., Illinois, USA) na dose de 100 MG/kg de peso, sendo cinco animais do grupo 1 e cinco animais do grupo 2 em cada período.



Figura 9 -Demarcação da área de remoção dos espécimes teciduais



Figura 10 - Visualização do espécime tecidual com a ferida inicial no centro

Os espécimes teciduais coletados foram mantidos em solução de formol tamponado a 10% durante 72 horas e, então, lavados com água corrente por 24 horas. Em seguida, os espécimes teciduais receberam o processamento laboratorial de tal forma a permitir a microtomia no sentido transversal.

De cada peça foram obtidos seis cortes histológicos com espessura de cinco micrômetros. As peças foram coradas com azul de toluidina a 0.2% por 30 segundos para avaliação histológica.

Na avaliação histométrica os cortes foram analisados em relação à quantidade de mastócitos presentes em uma determinada área da ferida e assim avaliar comparativamente o grupo 1 e o grupo 2 nos períodos determinados.

Para a análise histométrica, as imagens dos cortes histológicos foram capturadas por meio de uma câmera de vídeo (*Sony CCD – IRIS, Japan*) que estava acoplada a um microscópio óptico (*Olimpus BX 50, Japan*). As imagens digitalizadas dos cortes foram levadas a um microcomputador com processador Intel Core 2 Duo e analisadas pelo programa Image-pro Plus 6.3 (*Media Cybernetics Inc., USA*) que avaliou quantitativamente os mastócitos.

Inicialmente foi capturada a imagem com aumento de 40 x para uma visão panorâmica da ferida. A partir desta visualização foi determinada a região central da ferida(figura 10).

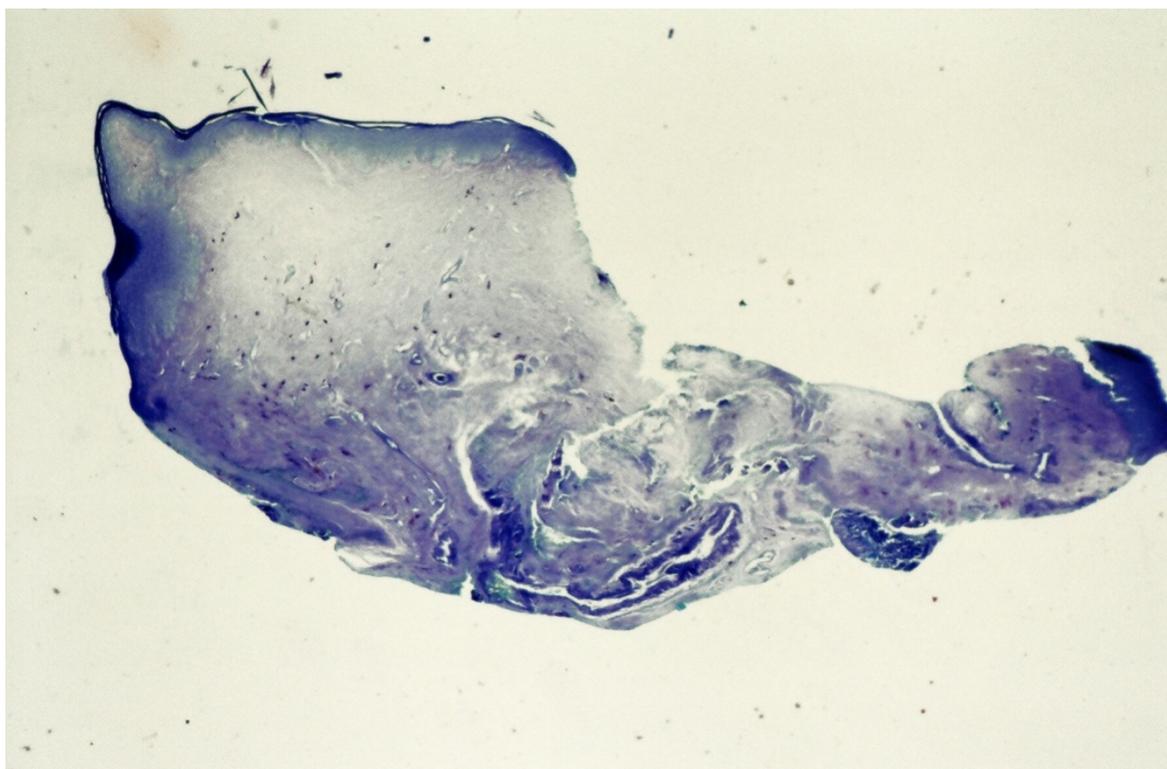


Figura 11 Fotomicrografia do corte do grupo 2 no período de 3 dias com aumento de 40 X.  
Área central da ferida

Após a delimitação do centro da ferida com o aumento de 40 x, a imagem foi capturada com um aumento de 100 x para delimitar o campo, focalizando o maior número de mastócitos. Esta imagem foi analisada no software Image Pro Plus 6.3 e foram delimitados 4 campos de  $400\mu^2$  (figura 11). Contou-se o número de mastócitos de cada campo e a partir destes dados realizou-se uma média de mastócitos de cada espécime tecidual. Com a média dos seis espécimes teciduais obteve-se uma média de cada animal. Juntando os dados dos 5 animais de cada grupo em um determinado período obteve-se o número médio de mastócitos de cada período para comparar com os outros períodos e entre os grupos.

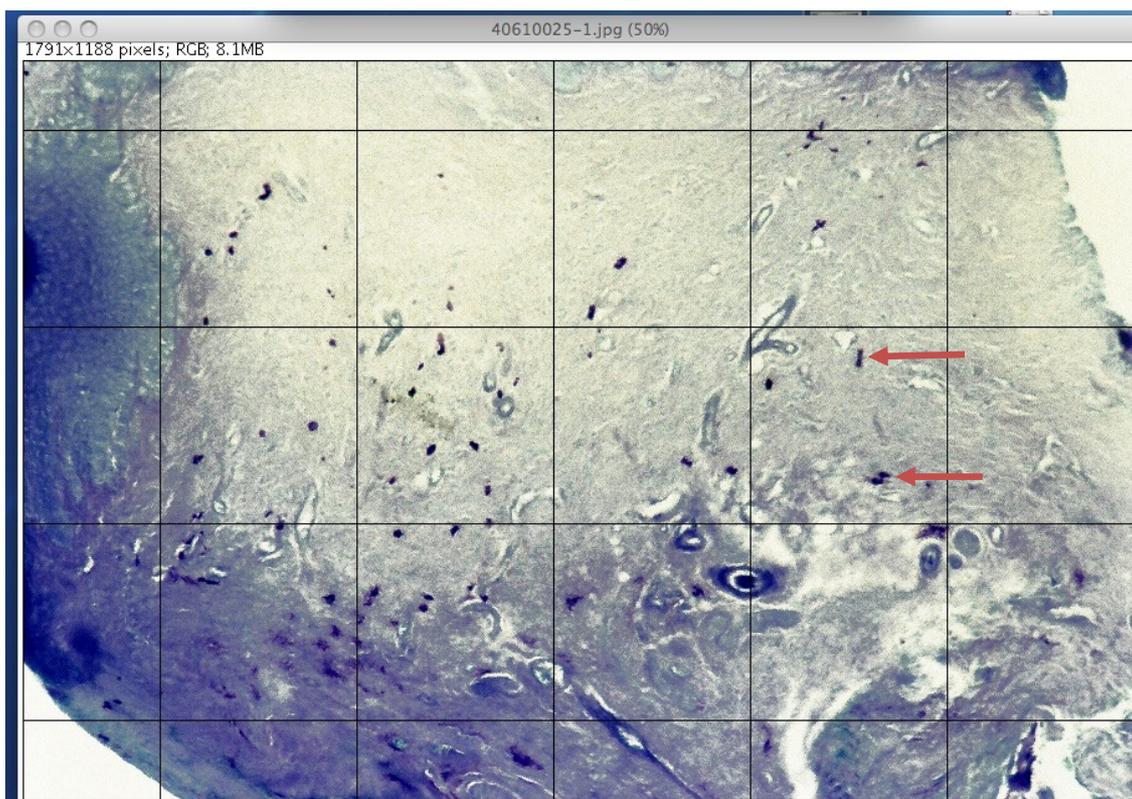


Figura 12–Fotomicrografia da imagem processada pelo software do corte do grupo 2 no período de 3 dias com aumento de 100 x evidenciando mastócitos (setas)

Inicialmente, visando comparar se existia diferença no número médio de mastócitos segundo grupo, tempo e a interação grupo x tempo, testou-se a normalidade dos dados para cada um dos 10 tratamentos (2 grupos x 5 tempos) e a homogeneidade de variância entre os mesmos utilizando o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov (apêndice) e o teste de homogeneidade de variâncias de Levene. O nível de significância adotado foi de 5%, uma vez que houve normalidade dentro dos grupos e homogeneidade de variâncias entre os grupos utilizou-se ANOVA a dois critérios modelo fatorial completo. Quando ANOVA indicou existir diferença estatisticamente significativa entre pelo menos 2 tratamentos, utilizou-se o teste de comparações múltiplas paramétricas de Tukey HSD, visando identificar quais tratamentos diferiam entre si. Em seguida, visando comparar no total dos 2 grupos e para cada um dos grupos isoladamente se existia diferença estatisticamente significativa no número de mastócitos no momento inicial em relação aos tempos 1, 2, 3, 4 e 5, uma vez que os dados apresentaram distribuição normal, utilizou-se o teste T de Student para amostras emparelhadas.

## 5 RESULTADOS

Para a análise histométrica, avaliou-se a área delimitada pelo software Image-pro Plus 6.3 (*Media Cybernetics Inc.*) nos períodos de 0 hora, 3 dias, 7 dias, 15 dias, 30 dias e 60 dias.

Os valores numéricos dos parâmetros histométricos avaliados com as análises de comparações múltiplas dos grupos 1 e 2 e de tempos avaliados são apresentados a seguir por meio de tabelas.

Divisão dos grupos 1 e 2 e períodos de avaliação são os seguintes:

- a) Grupo 1 (G1) – aplicação de solução fisiológica;
- b) Grupo 2 (G2) – aplicação de subgalato de bismuto;
- c) Tempo 0 (T0) – período de observação no momento inicial;
- d) Tempo 1 (T1) – período de observação de 3 dias;
- e) Tempo 2 (T2) – período de observação de 7 dias;
- f) Tempo 3 (T3) – período de observação de 15 dias;
- g) Tempo 4 (T4) – período de observação de 30 dias;
- h) Tempo 5 (T5) – período de observação de 60 dias.

Tabela 1 – Estatísticas descritivas do número de mastócitos segundo grupo

Grupo	n	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão
G1	25	13,80	5,24	1,05
G2	25	15,04	4,39	0,88

Fonte: dados da pesquisa, 2009

Os dados da Tabela 1 demonstram a média do número de mastócitos do total das 25 amostras de ambos os grupos.

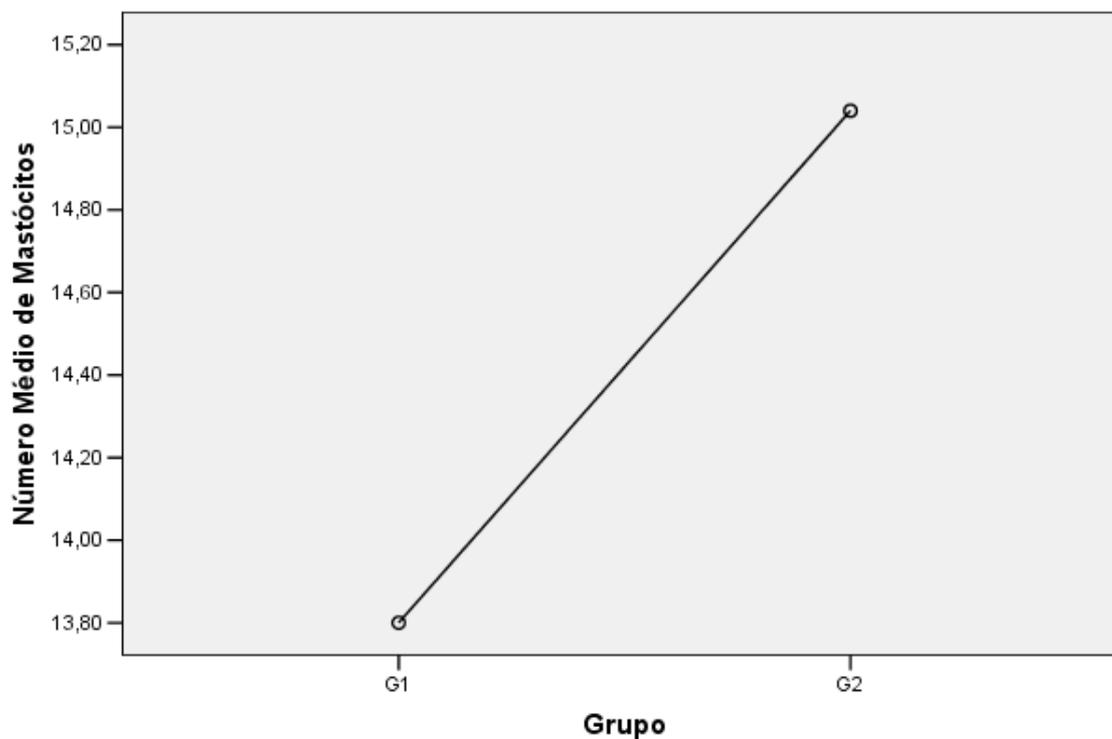


Gráfico 1 – Número médio de mastócitos segundo grupo

Fonte: dados da pesquisa, 2009.

No grupo 1 a média de mastócitos foi de 13.80 enquanto que no grupo 2 foi de 15.04.

Tabela 2 – Estatísticas descritivas do número de mastócitos segundo grupo x tempo

Grupo x Tempo	n	Média	Mediana	Desvio Padrão	Erro Padrão
G1 T1	5	7,40	7,00	1,14	0,51
G1 T2	5	10,80	10,00	1,64	0,73
G1 T3	5	12,60	12,00	0,89	0,40
G1 T4	5	16,40	17,00	1,82	0,81
G1 T5	5	21,80	21,00	1,92	0,86
G2 T1	5	9,40	10,00	1,52	0,68
G2 T2	5	15,40	14,00	3,44	1,54
G2 T3	5	13,20	13,00	1,48	0,66
G2 T4	5	16,40	16,00	3,21	1,44
G2 T5	5	20,80	21,00	1,10	0,49

Fonte: dados da pesquisa, 2009.

A Tabela 2 apresenta o número médio de mastócitos de cada grupo nos 5 diferentes tempos do experimento.

Tabela 3 – Teste de variância ANOVA a dois critérios, modelo fatorial completo

Fonte de Variação	Valor p
Grupo	0,0334
Tempo	0,0000
Grupo * Tempo	0,0307

Fonte: dados da pesquisa, 2009.

A Tabela 3 revelou que existiu diferença estatisticamente significativa no número médio de mastócitos entre pelo menos dois tratamentos.

Tabela 4 – Teste de Tukey HSD segundo grupo versus tempo

Grupo 1	Grupo 2
G1T1	G2T1
G1T2	G2T2*
G1T3	G2T3
G1T4	G2T4
G1T5	G2T5

Fonte: dados da pesquisa, 2009.

\* diferença estatisticamente significativa

Os dados da tabela 4 demonstram de maneira resumida a comparação com o teste de Tukey segundo grupo versus tempo. A tabela completa se encontra no Apêndice. Nos achados do estudo notamos a diferença estatisticamente significativa no tempo 2 do estudo quando comparados o número médio de mastócitos entre o G1 10,80 e G2 15,40.

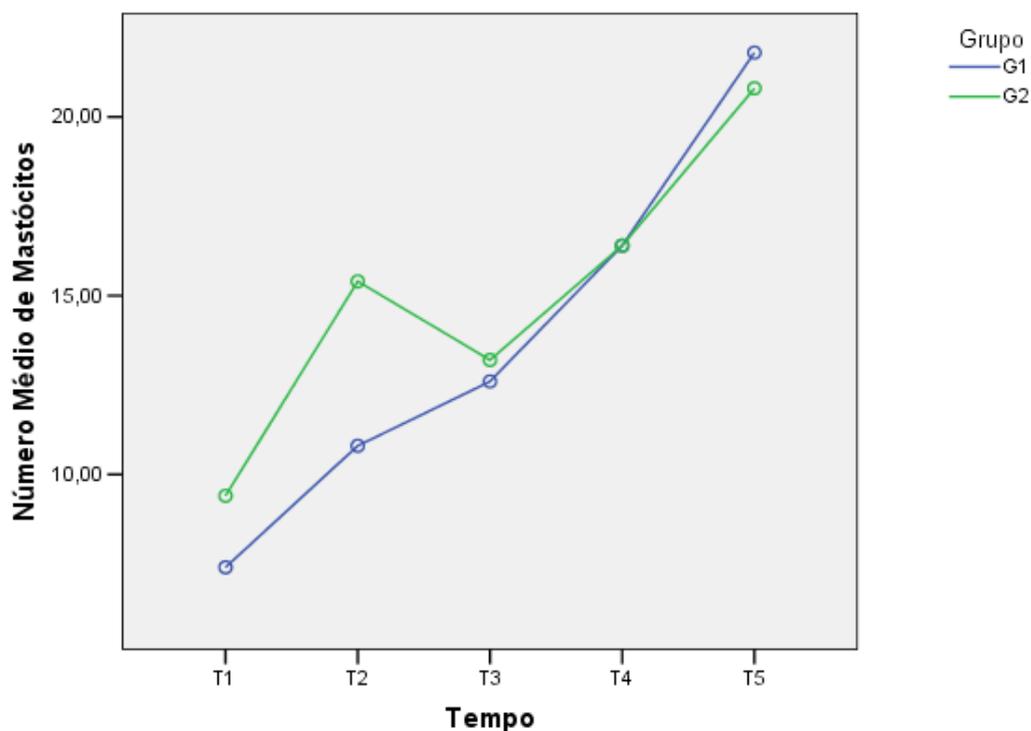


Gráfico 2 – Número médio de mastócitos segundo grupo x tempo

Fonte: dados da pesquisa, 2009

Gráfico 2 representa o número médio de mastócitos nos diferentes tempos do estudo para os dois grupos comparativamente.

Tabela 5 – Estatísticas descritivas do número médio de mastócitos em T0 de Ti segundo grupo

Variável	Grupo	n	Média	Desvio Padrão
Mastócitos em T0 de T1	G1	5	16,00	1,58
	G2	5	18,40	2,07
Mastócitos em T0 de T2	G1	5	15,60	1,82
	G2	5	19,40	1,52
Mastócitos em T0 de T3	G1	5	17,60	2,41
	G2	5	18,40	2,07
Mastócitos em T0 de T4	G1	5	17,60	1,95
	G2	5	18,80	1,30
Mastócitos em T0 de T5	G1	5	18,00	2,45
	G2	5	18,80	1,30

Fonte: dados da pesquisa, 2009

Os dados da Tabela 5 demonstraram as médias das amostras removidas no tempo 0 do estudo.

Tabela 6 – Teste de Levene para igualdade de variâncias

	Valor p
Mastócitos em T0 de T1	0,0736
Mastócitos em T0 de T2	0,0071
Mastócitos em T0 de T3	0,5889
Mastócitos em T0 de T4	0,2856
Mastócitos em T0 de T5	0,5372

Fonte: dados da pesquisa, 2009

O número médio de mastócitos em T0 de T2 apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Tabela 7 – Estatísticas descritivas do número médio de mastócitos em T0 de Ti e Ti para o grupo 1

Variável	n	Média	Mediana	Desvio Padrão
Mastócitos em T0 de T1	5	16,00	16,00	1,58
Mastócitos em T1	5	7,40	7,00	1,14
Mastócitos em T0 de T2	5	15,60	15,00	1,82
Mastócitos em T2	5	10,80	10,00	1,64
Mastócitos em T0 de T3	5	17,60	17,00	2,41
Mastócitos em T3	5	12,60	12,00	0,89
Mastócitos em T0 de T4	5	17,60	17,00	1,95
Mastócitos em T4	5	16,40	17,00	1,82
Mastócitos em T0 de T5	5	18,00	19,00	2,45
Mastócitos em T5	5	21,80	21,00	1,92

Fonte: dados da pesquisa, 2009

Tabela 8– Teste t de Student para amostras emparelhadas para o grupo 1

Amostras Emparelhadas		Valor p
Par 1	Mastócitos em T0 de T1 - Mastócitos em T1	0,00007
Par 2	Mastócitos em T0 de T2 - Mastócitos em T2	0,02615
Par 3	Mastócitos em T0 de T3 - Mastócitos em T3	0,00621
Par 4	Mastócitos em T0 de T4 - Mastócitos em T4	0,35846
Par 5	Mastócitos em T0 de T5 - Mastócitos em T5	0,02697

Fonte: dados da pesquisa, 2009.

O teste demonstrou que existe diferença estatisticamente significativa para os pares 1, 2, 3 e 5.

Tabela 9– Estatísticas descritivas do número médio de mastócitos em T0 de Ti e Ti para o grupo2

Variável	n	Média	Mediana	Desvio Padrão
Mastócitos em T0 de T1	5	18,40	18,00	2,07
Mastócitos em T1	5	9,40	10,00	1,52
Mastócitos em T0 de T2	5	19,40	20,00	1,52
Mastócitos em T2	5	15,40	14,00	3,44
Mastócitos em T0 de T3	5	18,40	19,00	2,07
Mastócitos em T3	5	13,20	13,00	1,48
Mastócitos em T0 de T4	5	18,80	19,00	1,30
Mastócitos em T4	5	16,40	16,00	3,21
Mastócitos em T0 de T5	5	18,80	19,00	1,30
Mastócitos em T5	5	20,80	21,00	1,10

Fonte: dados da pesquisa, 2009.

A Tabela 9 comparou as biópsias realizadas no tempo 0 com relação aos outros tempos com relação aos dados do grupo 2.

Tabela 10 – Teste t de Student para amostras emparelhadas do grupo 2

Amostras Emparelhadas		Valor p
Par 1	Mastócitos em T0 de T1 - Mastócitos em T1	0,000844
Par 2	Mastócitos em T0 de T2 - Mastócitos em T2	0,138781
Par 3	Mastócitos em T0 de T3 - Mastócitos em T3	0,003778
Par 4	Mastócitos em T0 de T4 - Mastócitos em T4	0,266499
Par 5	Mastócitos em T0 de T5 - Mastócitos em T5	0,061199

Fonte: dados da pesquisa, 2009

O resultado da análise estatística demonstrou que existe diferença estatisticamente significativa quando se considera o Grupo 2 para os pares 1, 3 e 5.

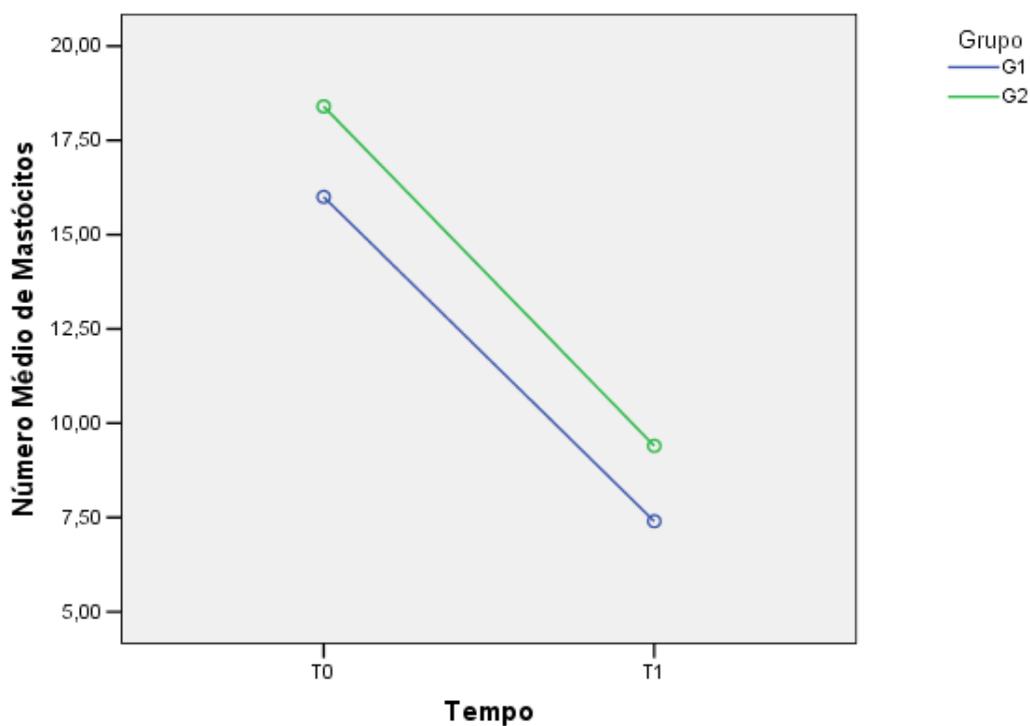


Gráfico 3 – Número médio de mastócitos segundo tempo 0 com tempo 1 e grupos

Fonte: dados da pesquisa, 2009

Para o grupo 1 o número médio de mastócitos para as 5 biópsias no T0 foi de 16.00 enquanto que no tempo 1 as 5 biópsias realizadas no mesmo animal apresentaram número médio de mastócitos de 7.40. No grupo 2, a média no T0 foi de 18.40 e no tempo 1 foi de 9.40.

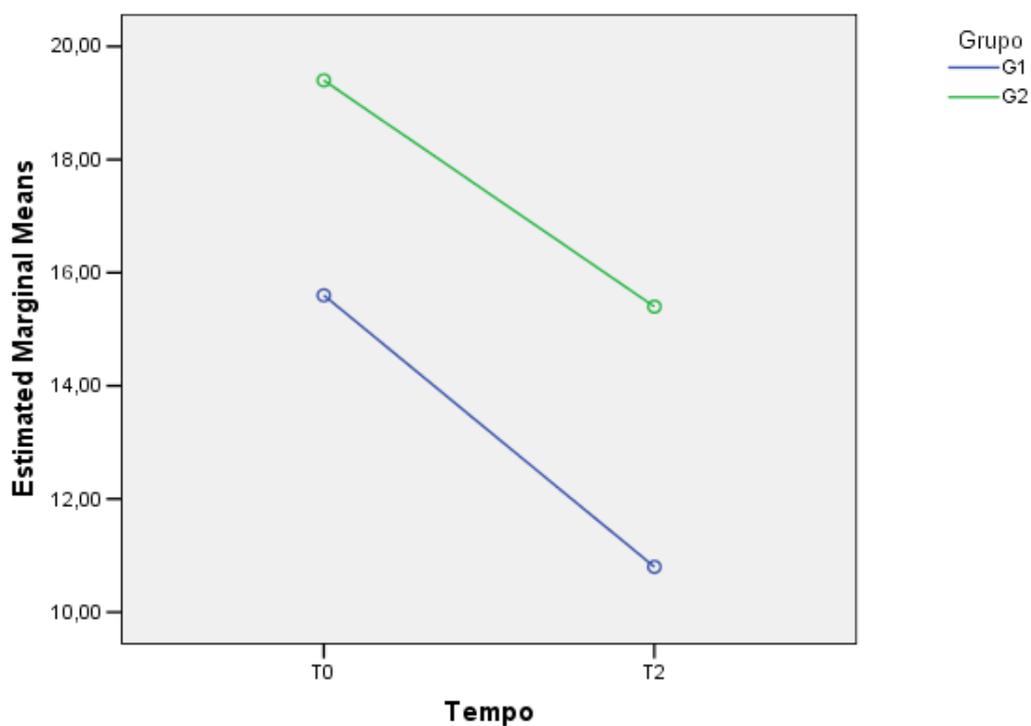


Gráfico 4 - Número médio de mastócitos segundo tempo 0 e tempo 2 e grupos

Fonte: dados da pesquisa, 2009

No grupo 1 o valor da média do número de mastócitos foi de 15.60 em T0 e reduziu para 10.80 em T2. Já no grupo 2 o número médio de mastócitos foi de 19.40 e reduziu para 15.40.

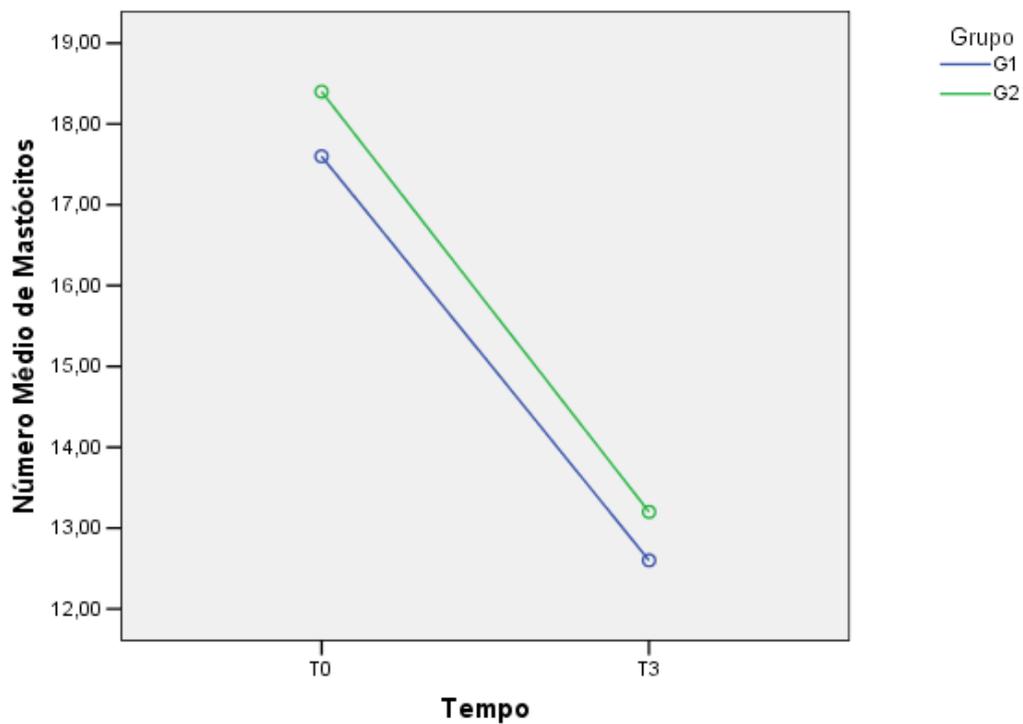


Gráfico 5 – Número médio de mastócitos segundo tempo 0 e tempo 3 e grupos

Fonte: dados da pesquisa, 2009

No grupo 1 o valor em T0 foi de 17.60 e reduziu para 12. 60 em T3. No outro grupo o valor em T0 foi de 18.40 e reduziu para 13.20.

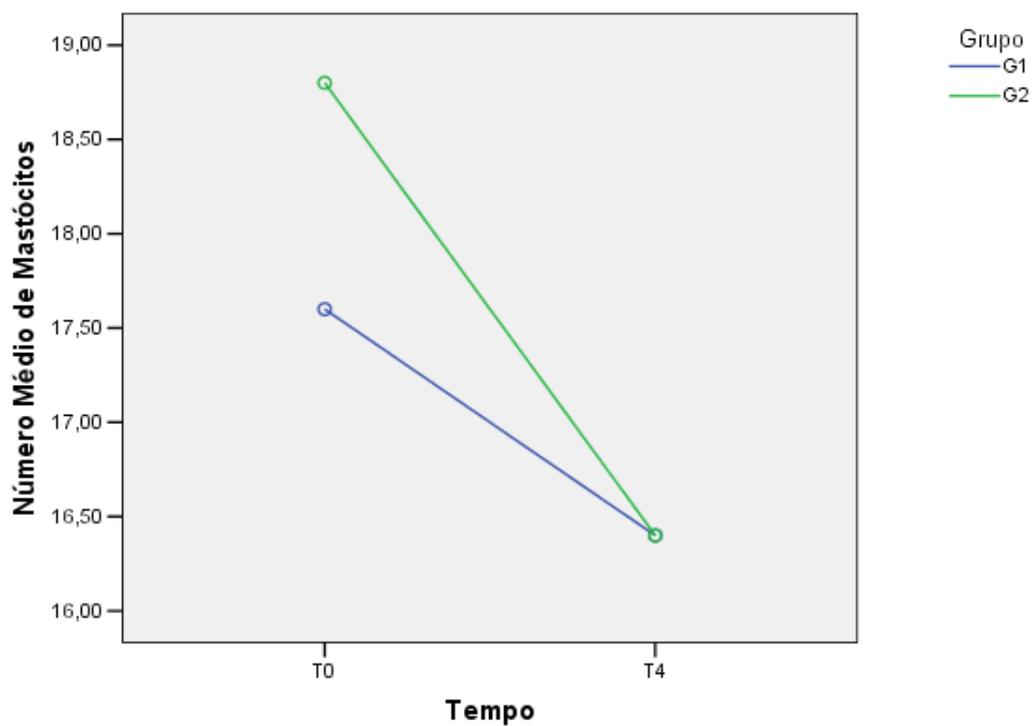


Gráfico 6 – Número médio de mastócitos segundo tempo 0 e tempo 4 e grupos

Fonte: dados da pesquisa, 2009

Ambos os grupos apresentaram o mesmo número médio de mastócitos em T4 que foi de 16,40 enquanto que os valores em T0 foram de 17,60 no grupo 1 e 18,80 no grupo 2.

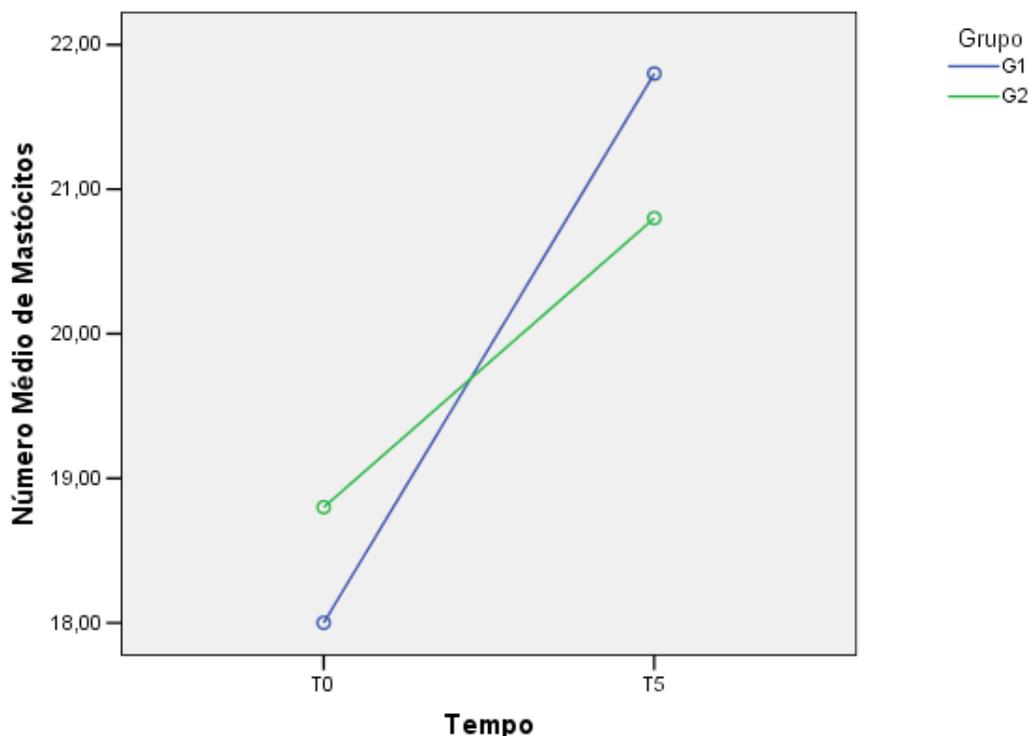


Gráfico 7 – Número médio de mastócitos segundo tempo e grupo

Fonte: dados da pesquisa, 2009

Comparando o T0 com o tempo 5 em ambos os grupos foram notados que o número médio de mastócitos sobe de 18,00 em T0 para 21,80 no grupo 1. Para o grupo 2 o valor em T0 para este grupo foi de 18,80 e subiu para 20,80 em T5.

Tabela 11- Teste de Tukey HSD segundo grupo x tempo

Grupo x Tempo		Diferença média	Desvio padrão	Valor p
G1 T1	G1 T2	-3,4	1,258570618	0,20767
	G1 T3	-5,2	1,258570618	0,00614
	G1 T4	-9	1,258570618	0,00000
	G1 T5	-14,4	1,258570618	0,00000
	G2 T1	-2	1,258570618	0,84547
	G2 T2	-8	1,258570618	0,00001
	G2 T3	-5,8	1,258570618	0,00151
	G2 T4	-9	1,258570618	0,00000
	G2 T5	-13,4	1,258570618	0,00000
	G1 T2	G1 T1	3,4	1,258570618
G1 T3		-1,8	1,258570618	0,91014
G1 T4		-5,6	1,258570618	0,00243

	G1 T5	-11	1,258570618	0,00000
	G2 T1	1,4	1,258570618	0,98050
	G2 T2	-4,6	1,258570618	0,02285
	G2 T3	-2,4	1,258570618	0,66454
	G2 T4	-5,6	1,258570618	0,00243
	G2 T5	-10	1,258570618	0,00000
G1 T3	G1 T1	5,2	1,258570618	0,00614
	G1 T2	1,8	1,258570618	0,91014
	G1 T4	-3,8	1,258570618	0,10767
	G1 T5	-9,2	1,258570618	0,00000
	G2 T1	3,2	1,258570618	0,27798
	G2 T2	-2,8	1,258570618	0,45762
	G2 T3	-0,6	1,258570618	0,99997
	G2 T4	-3,8	1,258570618	0,10767
	G2 T5	-8,2	1,258570618	0,00000
G1 T4	G1 T1	9	1,258570618	0,00000
	G1 T2	5,6	1,258570618	0,00243
	G1 T3	3,8	1,258570618	0,10767
	G1 T5	-5,4	1,258570618	0,00388
	G2 T1	7	1,258570618	0,00008
	G2 T2	1	1,258570618	0,99829
	G2 T3	3,2	1,258570618	0,27798
	G2 T4	0	1,258570618	1,00000
	G2 T5	-4,4	1,258570618	0,03451
G1 T5	G1 T1	14,4	1,258570618	0,00000
	G1 T2	11	1,258570618	0,00000
	G1 T3	9,2	1,258570618	0,00000
	G1 T4	5,4	1,258570618	0,00388
	G2 T1	12,4	1,258570618	0,00000
	G2 T2	6,4	1,258570618	0,00035
	G2 T3	8,6	1,258570618	0,00000
	G2 T4	5,4	1,258570618	0,00388
	G2 T5	1	1,258570618	0,99829
G2 T1	G1 T1	2	1,258570618	0,84547
	G1 T2	-1,4	1,258570618	0,98050
	G1 T3	-3,2	1,258570618	0,27798
	G1 T4	-7	1,258570618	0,00008
	G1 T5	-12,4	1,258570618	0,00000
	G2 T2	-6	1,258570618	0,00093
	G2 T3	-3,8	1,258570618	0,10767
	G2 T4	-7	1,258570618	0,00008
	G2 T5	-11,4	1,258570618	0,00000
G2 T2	G1 T1	8	1,258570618	0,00001
	G1 T2	4,6	1,258570618	0,02285
	G1 T3	2,8	1,258570618	0,45762
	G1 T4	-1	1,258570618	0,99829
	G1 T5	-6,4	1,258570618	0,00035
	G2 T1	6	1,258570618	0,00093
	G2 T3	2,2	1,258570618	0,76190
	G2 T4	-1	1,258570618	0,99829
	G2 T5	-5,4	1,258570618	0,00388
G2 T3	G1 T1	5,8	1,258570618	0,00151
	G1 T2	2,4	1,258570618	0,66454
	G1 T3	0,6	1,258570618	0,99997

	G1 T4	-3,2	1,258570618	0,27798
	G1 T5	-8,6	1,258570618	0,00000
	G2 T1	3,8	1,258570618	0,10767
	G2 T2	-2,2	1,258570618	0,76190
	G2 T4	-3,2	1,258570618	0,27798
	G2 T5	-7,6	1,258570618	0,00002
G2 T4	G1 T1	9	1,258570618	0,00000
	G1 T2	5,6	1,258570618	0,00243
	G1 T3	3,8	1,258570618	0,10767
	G1 T4	0	1,258570618	1,00000
	G1 T5	-5,4	1,258570618	0,00388
	G2 T1	7	1,258570618	0,00008
	G2 T2	1	1,258570618	0,99829
	G2 T3	3,2	1,258570618	0,27798
	G2 T5	-4,4	1,258570618	0,03451
G2 T5	G1 T1	13,4	1,258570618	0,00000
	G1 T2	10	1,258570618	0,00000
	G1 T3	8,2	1,258570618	0,00000
	G1 T4	4,4	1,258570618	0,03451
	G1 T5	-1	1,258570618	0,99829
	G2 T1	11,4	1,258570618	0,00000
	G2 T2	5,4	1,258570618	0,00388
	G2 T3	7,6	1,258570618	0,00002
	G2 T4	4,4	1,258570618	0,03451

---

Fonte: dados da pesquisa, 2009

## 6 DISCUSSÃO

Para contribuir com a avaliação da reparação tecidual em casos submetidos ao uso do subgalato de bismuto, este estudo avaliou através de cortes histológicos, o comportamento da população de mastócitos durante o tratamento de feridas na mucosa palatina de ratos Wistar. A falta de trabalhos que avaliaram o subgalato de bismuto relacionado ao processo de reparação, nos levou a avaliar histométricamente a resposta inflamatória, para indicação com segurança deste produto.

Para avaliar em animais de maneira similar a indicação proposta por Kim (1997) da utilização do subgalato de bismuto para hemostasia de áreas doadoras da mucosa palatina o estudo foi conduzido de maneira amplamente descrita na literatura com remoção de biópsias da mucosa palatina dos ratos para análise quantitativa dos mastócitos como no estudo de Lara (2007). De acordo com o estudo de Wilgus (2008) imediatamente após a injúria dos tecidos, as plaquetas entram na área da ferida para agregar e liberar mediadores químicos que iniciam a cascata de coagulação, assim como fatores de crescimento e citocinas envolvidos no recrutamento das células inflamatórias e imunes. Os mastócitos residentes na região da ferida degranulam após a injúria e liberam mediadores químicos do processo imunológico, desta forma foi proposto neste trabalho avaliar o número de mastócitos em cada fase do processo de reparação tecidual. Como citado por Walsh (2003) os mastócitos liberam mediadores inflamatórios armazenados em seus grânulos após estímulos que podem ser imunológicos ou não. Os grânulos secretores dos mastócitos apresentam propriedades metacromáticas corados por azul de toluidina apresentando características circulares quando analisados por microscopia óptica. Como a ferida foi realizada no tempo 0 do estudo, houve uma grande liberação dos mediadores químicos dos mastócitos frente ao estímulo físico reduzindo a evidência histológica dos mesmos quando corados com Azul de Toluidina corroborando com os achados desse estudo que demonstraram uma grande redução do número médio de mastócitos nos tempos iniciais.

Como sugerido no estudo de Weller (2006) realizado em ratos geneticamente modificados sem mastócitos comparados a ratos normais, foi verificado que no grupo dos ratos modificados houve uma cicatrização significativamente mais lenta e um número reduzido da proliferação de queratinócitos.

Analisando os dados apresentados por ambos os grupos nos diferentes tempos do experimento, notamos que o número médio de mastócitos no tempo 0 comparados

com o número médio de mastócitos no tempo 1 reduziu para ambos os grupos (gráfico 3). Embora os mastócitos sejam mais citados na literatura pelo papel que representam nas reações alérgicas, ao degranularem eles liberam uma variedade de mediadores pré armazenados em seus grânulos após uma injúria de acordo com o estudo de Puxxedu (2003). No mesmo ano outro estudo corrobora os resultados do estudo referente a redução do número médio de mastócitos frente a uma injúria BOYCE (2003). No caso do experimento ocorreu um trauma físico pela incisão realizada com o bisturi circular e conseqüentemente um trauma decorrente dos produtos liberados pelas bactérias presentes no meio bucal que ao se romper a barreira do epitélio, atuaram diretamente sobre o tecido conjuntivo exposto. Por causa destes traumas certamente houve uma ativação dos mastócitos presentes no tecido conjuntivo circundante para liberação dos mediadores químicos, isto explica em parte a redução no número médio de mastócitos quando comparado o T0 com o T1 para ambos os grupos. Ao compararmos o número médio de mastócitos entre os grupos em T1 não foi notada diferença estatisticamente significativa, o que se explica pela degranulação dos mastócitos para liberação dos mediadores químicos primários da inflamação responsáveis pelo desencadeamento da primeira resposta vascular exsudativa e indica que o material testado no G2 não interferiu na degranulação dos mastócitos quando comparado com o G1 (controle). Ao compararmos o número médio de mastócitos entre os grupos no tempo 1 não foi notada diferença estatisticamente significativa, pois em ambos os grupos ocorre uma redução do número médio de mastócitos pela sua degranulação para liberação dos mediadores químicos primários da inflamação responsáveis pelo desencadeamento da primeira resposta vascular exsudativa Bogliolo (1981).

Quando foi avaliado o tempo 2 para ambos os grupos, observou-se que houve um aumento no número médio de mastócitos quando comparados com o T1 (tabela 11). Ao compararmos o tempo 2 entre G1 e G2 notamos que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos com número médio de mastócitos maior em G2. Como documentado em estudo prévio de Tramontina (2002), que relatou uma maior resposta inflamatória no período inicial (primeiro ao quarto dia) caracterizado pelo aumento do número de macrófagos polimorfonucleares, sugeriu-se que foi devido a presença física do SB na ferida. Estes dados não corroboraram com nossos achados aonde o G2 apresentou média maior de mastócitos quando comparado a G1 demonstrando que o SB presente nos animais tratados do G2 não aumentou a

resposta inflamatória quando avaliada pela degranulação dos mastócitos. Como avaliamos o número médio de mastócitos, uma hipótese foi a do efeito antibacteriano do SB como demonstrado por Gorbach (1990), que resulta em uma menor degranulação dos mastócitos por uma menor agressão química pelas bactérias presentes na flora bucal dos animais. Para G2 houve um aumento do número médio de mastócitos o que corrobora com o estudo de Reynolds (1989) que relatou o efeito adstringente do subgalato de bismuto que cria uma camada protetora sobre o tecido conjuntivo exposto e desta forma mesmo controlando a dieta dos animais e a própria função normal do sistema estomatognático nossos resultados sugerem que houve um efeito protetor no grupo que utilizou SB. Pela evolução natural do processo inflamatório, naturalmente o padrão agudo inicial tornou-se crônico resultando em um aumento no número médio de mastócitos ao compararmos o T2 de ambos os grupos com o T1 menor no G1 e com diferença estatisticamente significativa com G2. Os resultados demonstraram que o grupo que utilizou o subgalato de bismuto (G2) interferiu no processo de inflamatório no T2 do estudo quando comparado ao grupo controle (G1).

De acordo com os resultados do nosso estudo, quando comparado T3 (tabela 11) com T2 para ambos os grupos notou-se um aumento na média de mastócitos sem diferença estatisticamente significativa entre G1 e G2. De acordo com os estudos realizados por Egozi (2003) e Weller (2006), podemos sugerir que os mastócitos tem um papel fundamental na infiltração dos neutrófilos na região da ferida cronificando o processo inflamatório.

Nossos resultados demonstraram que a média de mastócitos apresentou número semelhante ao tempo inicial do estudo quando chegamos em T4 (gráfico 2) no estudo. De acordo com os achados de Weller (2006) foi relatado a importância dos mastócitos na cicatrização normal dos tecidos e desta forma corroboramos nossos achados que o SB não interferiu no tempo de cicatrização das feridas criadas. Como em T4 ambos os grupos apresentaram número médio de mastócitos igual de 16,40. Esta média de mastócitos foi superior ao T3 em ambos os grupos. No grupo 1 o número médio de mastócitos era de 12,60 no tempo 3 e aumentou para 16,40 no tempo 4 (tabela 7). Enquanto que para o grupo 2 o número médio de mastócitos aumentou de 13,20 para 16,40 nos mesmos tempos (tabela 9). Nenhuma destas médias apresentou diferença estatisticamente significativa entre si, embora este aumento no número médio de mastócitos sugeriu que o tecido está em processo de

reparação retornando ao padrão inicial ou tempo 0. Quando comparado o tempo 4 com o tempo inicial em ambos os grupos, notou-se que não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os tempos. No grupo 1 o número médio de mastócitos caiu de 17,60 em T0 para 16,40 em T4 e para o grupo 2 o valor em T0 foi de 18,80 e reduziu para 16,40 em T4 (gráfico 6).

Ao avaliarmos o tempo 5 do estudo notou-se que o número médio de mastócitos aumentou em ambos os grupos quando comparados com o tempo 4. No grupo 1 aumentou de 16,40 no tempo 4 para 21,80 no tempo 5 (tabela 7) e no grupo 2 aumentou de 16,40 no tempo 4 para 20,80 no tempo 5 (tabela 9). Quando comparados com o tempo 4, ambos os grupos apresentaram diferença estatisticamente significativa no número médio de mastócitos no tempo 5. Quando se comparou o tempo 5 entre os grupos notou-se que não existiu diferença estatisticamente significativa e o número médio de mastócitos no período final do estudo foi semelhante ao inicial indicando uma cicatrização normal corroborando com o estudo de Serena, et al (2007). Também foi comparado o T5 com o T0 para ambos os grupos. No grupo 1 (tabela 8) houve diferença estatisticamente significativa com um aumento do número médio de mastócitos em T5 (21,80) quando comparado com T0 (18,00) (gráfico 7). Para a mesma comparação com o grupo 2 (tabela 10) não se notou diferença estatisticamente significativa, mas o grupo se comportou da mesma forma com um aumento do número médio de mastócitos em T5 (20,80) quando comparado com T0 (18,80) (gráfico 7). Os resultados do experimento corroboram com o estudo de Evans (1977) que relatou que os agentes hemostáticos como o subgalato de bismuto não devem retardar o processo de cicatrização, pois ambos os grupos se comportaram de maneira semelhante no tempo final do estudo.

Com a execução do presente trabalho, pode-se inferir que o subgalato de bismuto não demonstrou diferenças marcantes com relação ao número médio de mastócitos. Foi comprovado pela análise histométrica de imagens digitalizadas em computador de lâminas coradas com azul de toluidina que permitiu a avaliação numérica do tecido conjuntivo contando o número de mastócitos nos diferentes períodos do estudo.

A utilização da pasta de subgalato de bismuto como agente hemostático local na Odontologia ainda é um fato recente iniciado com o estudo de Kim, Tramontina e Grein (1977). Os resultados dos estudos revisados e do presente estudo demonstraram um parecer positivo em muito se assemelhando aos relatos na área

médicacomo os estudos de Nassif e Patrocinio (1978). Com os resultados obtidos no presente estudo, pode-se extrapolar que o agente hemostático de subgalato de bismuto não apresenta reação inflamatória, avaliada pelo número médio de mastócitos, diferente da encontrada no tecido conjuntivo quando se utilizou solução de soro fisiológico estéril. São necessários outros trabalhos, inclusive clínicos, para corroborar ou confrontar nossos resultados.

## **7 CONCLUSÃO**

Não houve diferenças histológicas relevantes com relação ao número médio de mastócitos entre as feridas tratadas com solução fisiológica e com subgalato de bismuto. Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos no tempo 2 do estudo. A reação inflamatória analisada pela contagem do número médio de mastócitos demonstrou características semelhantes comparando-se os tempos analisados entre os grupos.

## REFERÊNCIAS

1. ARANGO HE. **Bioestatística teórica e computacional**. 1ª Ed., Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2001.
2. BARNETT SE& VARLEY SJ The effects of calcium alginate on wound healing.**Ann R Coll Surg Engl**,England, v. 69, n. 4, p. 153-5, 1987.
3. BERNOIT PW& HUNT LMcomparison of a microcrystalline collagen preparation and a gelatin foam in extractions wounds.**J Oral Surg**, United States, v. 34, n. 12, p. 1079-83, 1976
4. Bjarnsholt, T., Kirketerp-Moller, K., Jensen, P.O., Madsen, K.G., Phipps, R., Kroghfelt, K., Hoiby, N. and Givskov, M. (2008) Why chronic wounds will not heal: a novel hypo- thesis. *Wound Repair Regen* 16, 2–10.
5. BLAIR SD,JARVIS P, SALMON M, et al. Clinical trial of calcium alginate haemostatic swabs. **Br J Surg**, England, v. 77, n. 5, p. 568-70, 1990.
6. BOGLIOLO, Luigi.**Patologia**. 3ª Ed., Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 1981.
7. BOYCE JA, Mast cells: Beyond IgE. **J Allergy Clin Immunol**; United States, v. 111, p.24-32, 2003.
8. CALLANAN V,CURRAN AJ, SMYTH DA, et al. The influence of bismuth subgallate and adrenaline paste upon operating time and operative blood loss in tonsillectomy.**J Laryngol Otol**, England, v.109, n. 3, p. 206-8, 1995.
9. Chi CH, Lin CY, Sheu BS, Yang HB, Huang AH, Wu JJ. Quadruple therapy containing amoxicillin and tetracycline is an effective regimen to rescue failed triple therapy by over- coming the antimicrobial resistance of *Helicobacter pylori*. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 18: 347–53.
10. CHUNG JW et al. Second-line *Helicobacter pylori* eradication: a randomized comparison of 1-week or 2-week bismuth-containing quadruple therapy *Helicobacter*. 2011 Aug;16(4):289-94. doi: 10.1111/j.1523-5378.2011.00844.x.

11. CONLEY SF & ELLISON MD, Avoidance of primary post-tonsillectomy hemorrhage in a teaching program. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**, United States, v. 125, n. 3, p.330-3, Mar, 1999.
12. COZZI LM, MEGERIAN CA, DUGUE C, et al. Pulmonary sequelae of intraparenchymal Bismuth Subgallate. **Laryngoscope**, United States, v.102, n.6, p.597-9, 1992.
13. Curso de manipulação de Animais de Laboratório. **Fundação Oswaldo Cruz – Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz**, 2005.
14. Davis, S.C., Ricotti, C., Cazzaniga, A., Welsh, E., Eaglstein, W.H. and Mertz, P.M. (2008) Microscopic and physiologic evidence for biofilm-associated wound colonization in vivo. **Wound Repair Regen** 16, 23–29.
15. Egozi EI, Ferreira AM, Burns AL, Gamelli RL, Dipietro LA. Mast cells modulate the inflammatory but not the proliferative response in healing wounds. **Wound Repair Regen** 2003; 11; 46-54
16. EVANS BE. Local haemostatic agents. **N. Y. J. Dent**, United States, v.47, n.4, p.109-14, 1977.
17. FARAHANI SS, NAVABAZAM A, ASHKEVARI FS. Comparison of mast cells count in oral reactive lesions. **Pathol Res Pract**. 2010 Mar 15;206(3):151-5. Epub 2010 Jan 21.
18. **FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil**. 2.ed., São Paulo, Siqueira, p.483-4, 1959.
19. FENTON JE, BLAYNEY AW, O'DWYER TP. Bismuth subgallate - its role in tonsillectomy. **J Lar Otol**, England, v.109, n. 3, p. 203-5, 1995.
20. GARCIA DE HOMBRE M.A. e PÉREZ PENÑATE A. Topic usage of bismuth subgallate as a haemostatic in tonsillectomy. **An Otorrinolaringol Ibero Am**, Espanhav.33, n. 3, p. 301-5, 2006.
21. GORBACH SL. Bismuth therapy in gastrointestinal diseases. **Gastroenterology** United States, v. 99, n. 3, p. 863-75, 1990.

22. HATTON RC, Bismuth subgallate-epinephrine paste in adenotonsillectomies, **Ann Pharmacother**, United States, v. 34, n. 4, p. 522-5, Apr, 2000.
23. Hsu PJ, Wu DC, Chen A, Peng NJ, Tseng HH, Tsay FW, Lo GH, Lu CY, Yu FJ, Lai KH. Quadruple rescue therapy for Helicobacter pylori infection after two treatment failures. Eur J Clin Invest. 2008 Jun;38(6):404-9. Epub 2008 Apr 22.
24. James, G.A., Swogger, E., Wolcott, R., Pulcini, E.D., Secor, P., Sestrich, J., Costerton, J.W. and Stewart, P.S. (2008) Bio- films in chronic wounds. *Wound Repair Regen* 16, 37–44.
25. JEFFERY DL, DRESSLER DP, ANDERSON JM & GALLAGHER MJ. Haemostatic and healing studies of sodium amylase succinate. **J Biomed Mater Res.**, United States, v.16, n.1, p.51-61, 1982.
26. KIM, S.H.; GREIN, R.L. & TRAMONTINA, V.A. Aplicação do Subgalato de Bismuto como hemostático em cirurgia periodontal. **J Bras Odont Clin**, Brasil, v. 1, n. 1, p. 31-4, 1997.
27. KRAMER, G.M. & POLLACK, R. Clinical application and histologic evaluation of microfibrillar collagen hemostat (Avitene\*) in periodontal surgery. **Int J Periodontics Restorative Dent**, United States, v. 2, n. 1, p. 8-16, 1982.
28. LAMBERT, J.R. Pharmacology of Bismuth-Containing Compounds. **Rev. Infect. Dis.**, United States, v.13, p. 1-5, 1991. [Supplement, 18]
29. LARA RN, DA GUERRA EN, DE MELO NS. Macroscopic and microscopic effects of GaAlAs diode laser and dexamethasone therapies on oral mucositis induced by fluorouracil in rats. **Oral Health Prev Dent**. 2007;5(1):63-71.
30. LIN CY, SHEN YH, WU SH, et al. Effect of bismuth subgallate on nitric oxide and prostaglandin E2 production by macrophages. **Biochem Biophys Res Commun**. United States, v. 315, n. 4, p. 830-5, Mar2004.
31. LOWE DJ. Adverse effects of bismuth subgallate. A further report from the Australian drug evaluation committee. **Med. J. Aust.**, Australia, v.2, n. 18, p.664-6, 1974.

32. MANIGLIA AJ; KUSHNER H; COZZI L. Adenotonsilectomia. A safe outpatient procedure. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**, United States, v. 115, n. 1, p. 92-4, Jan, 1989.
33. MAI LM, LIN CY, CHEN CY, et al. Synergistic effect of bismuth subgallate and borneol, the major components of Sulbogin, on the healing of skin wound. **Biomaterials**, England, v.24, n.18, p. 3005-12, Aug, 2003.
34. MATTHEW IR, BROWNE RM, FRAME JW, et al. Alginate fiber dressing for oral mucosa wounds. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.**, United States, v.77, n.5, p.456-60, 1994.
35. MURRAY AD, GIBBS SR, BILLINGS KR, et al., Respiratory difficulty following bismuth subgallate aspiration. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**. United States, v.126, n.1, p. 79-81, Jan, 2000.
36. NASSIF AC & PATROCINIO JA. O subgalato de bismuto nas amigdalectomias. **Ver Bras Med**, Brasil, v. 35, n. 8, p. 505-6, 1978.
37. PRATT LW & GALLAGHER RA. Tonsillectomy and adenoidectomy: incidence and mortality, 1968-1972. **Otolaryngol Head Neck Surg**, United States, v.87, n. 2, p. 159-66, Mar-Apr, 1979.
38. PUIA SA, RENO SJ, REY EA, et al. Effect of bismuth subgallate (a hemostatic agent) on bone repair; a histologic, radiographic and histomorphometric study in rats. **Int J Oral Maxillofac Surg**. 2009 Jul;38(7):785-9. Epub 2009 Apr 16.
39. Puxeddu I, Piliponsky AM, Bachelet I, Levi-Schaffer F. Mast cells in allergy and beyond. *Int J Biochem Cell Biol* 2003; 35: 1601-7
40. RATNOFF OD & CRUM, J.D. Activation of Hageman factor by solutions of ellagic acid. **J. Lab. Clin. Med.**, United States, v.63, n.3, p.359-77, 1964.
41. REYNOLDS JEF. **Martindale the extra pharmacopeia**. 29.ed., London, Pharmaceutical Press, p.777-1548, 1989.
42. ROGERSON KC. Hemostasis for dental surgery. **Dent Clin North Am**, United States, v. 39, n.3, p. 649-62, 1995.

43. SALO T, MÄKELÄ M, KYLMÄNIEMI M, et al. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 during early human wound healing. **Lab. Invest.**, v.70, n.2, p.176-82, 1994.
44. SAROFF SA, CHASENS AI, EISEN SF, et al. Free soft tissue. Hemostasis and protection of the palatal donor site with a microfibrillar collagen preparation. **J Periodont**, United States, 53 (7), 425-8, 1982.
45. SCHITTEK A, DEMETRIOU AA, SEIFTER E, et al. Microcrystalline collagen hemostat (MCCH) and wound healing. **Ann Surg**, United States, 184(6), p. 697-704, 1976.
46. SERENA T, PARNALL LK, KNOX C, et al. Bismuth subgallate/borneol (suile) is superior to bacitracin in the human forearm biopsy model for acute wound healing. **Adv Skin Wound Care**. Sep; 20(9 Pt 1), p. 485-92, 2007.
47. SILVERSTEIN ME & CHVAPIL M. Experimental and clinical experiences with collagen fleece as a haemostatic agent. **J. Trauma**, v.21, n.5, p.388-93, 1981.
48. SORENSEN WT, HENRICHSEN J, BONDING P, **Clin Otolaryngol Allied Sci**. Feb; 24(1), p. 72-4, 1999.
49. STEIN MD, SALKIN LM, FREEDMAN AL & GLUSHKO V. Collagen sponge as a topical haemostatic agent in mucogingival surgery. **J. Periodont.**, United States, v.56, n.1, p.35-8, 1985.
50. THORISDOTHIR H, RATNOFF OD & MANIGLIA AJ. Activation of Hageman factor (factor XII) by bismuth subgallate, a haemostatic agent. **J Lab Clin Med**, Brasil 112(4), 481-6, 1988.
51. TRAMONTINA VA, MACHADO MA, NOGUEIRA FILHO GDA R, et al. Effect of bismuth subgallate (local haemostatic agent) on wound healing in Rats. Histological and histometric findings. **Braz Dent J**, Brasil, 13(1), p. 11-6, 2002.
52. VISTNES LM, GOODWIN DA, TENERY JH, et al. Control of capillary bleeding by topical application of microcrystalline collagen. **Surgery**, v.76, n.2, p.291-4, 1974.
53. WALSH LJ. Mast cells and oral inflammation. **Crit Rev Oral Biol Med**. 2003;14(3):188-98.

54. WALSH LJ, SAVAGE NW, ISHII T, SEYMOUR GJ. Immunopathogenesis of oral lichen planus. **J Oral Pathol Med**. 1990 Oct;19(9):389-96.
55. WELLER K, FOITZIK K, PAUS R, et al. Mast cells are required for normal healing of skin wounds in mice. **FASEB J**. 2006 Nov;20(13):2366-8. Epub 2006 Sep 11.
56. WILGUS TA. Immune cells in the healing skin wound: influential players at each stage of repair. **Pharmacol Res**. 2008 Aug;58(2):112-6. Epub 2008 Aug 3.
57. WIRTHLIN MR, VERNINO AR & HANCOCK EB. The use of a new topical haemostatic agent. **J. Periodont.**, United States, v.51, n.4, p.225-7, 1980.
58. WORMALD PJ & SELLARS SL. Bismuth subgallate: a safe means to a faster adenotonsillectomy. **J Lar Otol**, England, 108 (9), 761-2, 1994.



## APÊNDICE

### APÊNDICEA - Teste de Normalidade de Kolmogorov-Smirnov- Número de Mastócitos segundo Grupo x Tempo

Variável	Grupo x Tempo	Estatística	G.L.	Valor p
Número de Mastócitos	G1 T1	0,237139507	5	0,2000
	G1 T2	0,286822819	5	0,2000
	G1 T3	0,347832523	5	0,0502
	G1 T4	0,229409247	5	0,2000
	G1 T5	0,261258482	5	0,2000
	G2 T1	0,253810366	5	0,2000
	G2 T2	0,258200074	5	0,2000
	G2 T3	0,2463692	5	0,2000
	G2 T4	0,172713322	5	0,2000
	G2 T5	0,328272525	5	0,1350

Fonte: dados da pesquisa, 2009.