

Avaliação dos efeitos do subgalato de bismuto na proliferação de miofibroblastos

Assessment of the effects of bismuth subgallate on proliferation of myofibroblasts: an experimental study in rats

Rubianne Ligório de Lima¹, Cláudia Paraguaçu Sampaio¹, Karin Caroline Seidel¹, Melina Branco¹,
Rafaela Mabile Sobreiro¹

Resumo

Contexto: O subgalato de bismuto é um metal pesado e insolúvel, utilizado por suas propriedades adstringentes e hemostáticas. **Objetivo:** Avaliar os efeitos do subgalato de bismuto na cicatrização mediante observação de miofibroblastos em pele de ratos. **Métodos:** Foram utilizados 60 ratos da linhagem Wistar, que receberam uma ferida no dorso da pele. Os animais foram divididos em dois grupos: controle (aplicação diária de cloreto de sódio a 0,9%) e experimental (aplicação diária de 0,5 mg de subgalato de bismuto). Cada grupo foi subdividido em três subgrupos, que foram reoperados para retirada da ferida em 3, 7 e 14 dias. Foi realizada coloração de hematoxilina eosina, picrosírius e imuno-histoquímica para avaliar contagem de miofibroblastos, resposta inflamatória e síntese de colágeno. **Resultados:** Não foi encontrada diferença entre os grupos controle e experimento com relação ao processo inflamatório – subgrupos 3 dias ($p = 1$), 7 dias ($p = 0,474$) e 14 dias ($p = 303$). A avaliação dos colágenos tipo I e III no grupo-controle não demonstrou benefícios de cicatrização – 3 dias ($p = 0,436$), 7 dias ($p = 0,853$) e 14 dias ($p = 0,436$); já no grupo experimental, houve aumento dos colágenos tipos I e III nos subgrupos 3 e 14 dias ($p = 0,005$). A imuno-histoquímica confirmou os resultados encontrados na coloração hematoxilina eosina, na qual a área de miofibroblastos entre os subgrupos, nos grupos experimental ($p = 0,4$) e controle ($p = 0,336$), foi indiferente. **Conclusão:** A utilização do subgalato de bismuto em ferida de pele de ratos não evidenciou benefícios na cicatrização, ou seja, não houve diferença na fibroplasia quando comparados os grupos experimental e controle.

Palavras-chave: cicatrização; miofibroblastos; otolaringologia.

Abstract

Background: Bismuth subgallate is an insoluble heavy metal that is used for its astringent and hemostatic properties. **Objective:** To evaluate the effects of bismuth subgallate on the healing process by observation of myofibroblasts in the skin of rats. **Methods:** A sample of 60 Wistar rats was used. Each rat was subjected to a dorsal skin wound and allocated to one of two groups: a control group, in which 0.9% sodium chloride was administered daily, or an experimental group, in which 0.5 mg of bismuth subgallate was administered daily. Each of these groups was further subdivided into three subsets, which were reoperated after 3, 7 and 14 days respectively for excision and collection of the skin wound specimens. Samples were treated with hematoxylin eosin, picrosirius, and immunohistochemical staining to enable assessment of myofibroblast counts, inflammatory response phase, and collagen synthesis. **Results:** No inflammatory process differences were detected between the control and experimental groups at 3 days ($p = 1$), 7 days ($p = 0.474$), or 14 days ($p = 303$). Evaluation of types I and III collagen in the control group did not demonstrate healing benefits at 3 days ($p = 0.436$), 7 days ($p = 0.853$), or 14 days ($p = 0.436$); whereas in the experimental group there were increases in types I and III collagen at 3 and 14 days ($p = 0.005$). Immunohistochemical analysis confirmed the results of hematoxylin eosin staining, since there were no differences between subsets in terms of area of myofibroblasts, in the experimental ($p = 0.4$) or the control ($p = 0.336$) groups. **Conclusions:** Administration of bismuth subgallate to skin wounds in rats did not result in any evidence of benefits to healing, i.e., no difference in fibroplasia was detected when experimental and control groups were compared.

Keywords: wound healing; myofibroblasts; otolaryngology.

¹Pontifícia Universidade Católica do Paraná – PUC-PR, Faculdade de Medicina, Curitiba, PR, Brasil.

Fonte de financiamento: Nenhuma.

Conflito de interesse: Os autores declararam não haver conflitos de interesse que precisam ser informados.

Submetido em: Março 28, 2016. Aceito em: Julho 28, 2016.

O estudo foi realizado na Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR), com utilização de ratos do Biotério Central da PUC-PR. O experimento foi realizado no Laboratório de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da PUC-PR, Curitiba, PR, Brasil.

■ INTRODUÇÃO

O subgalato de bismuto é uma substância de coloração amarelada que se apresenta na forma de pó inodoro e sofre descoloração na presença de luz solar¹. Vem sendo cada vez mais utilizado pelos profissionais relacionados à otorrinolaringologia e odontologia devido às suas propriedades adstringentes e hemostáticas. Entre as formas utilizadas estão o tratamento tópico de feridas abertas, o tratamento de úlceras gastroduodenais, como antidiarreico, para controle do odor em colostomias, em cirurgias odontológicas, manejo da epistaxe e, empiricamente, em adenotonsilectomias¹⁻³.

As maiores preocupações dos otorrinolaringologistas quanto a uma amidialectomia é diminuir o sangramento do transoperatório, reduzir o tempo cirúrgico e evitar as complicações pós-operatórias; ou seja, busca-se um procedimento seguro¹⁻³.

O subgalato de bismuto, metal pesado e relativamente insolúvel em água, apresenta qualidades adstringentes (que ativam o fator XII da cascata de coagulação), acelera a formação do coágulo sanguíneo e melhora a hemostasia⁴. Frente a isso, há uma necessidade de estudos controlados e randomizados, metodologicamente aceitos, para dar melhor sustento à sua utilização.

Alguns serviços de otorrinolaringologia não utilizam o subgalato de bismuto, alegando que o resultado do seu uso pós-operatório imediato não revela benefício, enquanto outros referem grande facilidade no controle de sangramento. Os trabalhos, de uma forma geral, enfocam seu uso referindo controle de sangramento pós-operatório imediato.

A literatura não é objetiva quanto ao benefício do subgalato na hemostasia ou no efeito cicatricial, havendo discordâncias. Além disso, não trabalha os possíveis efeitos pró-cicatriciais, deixando a desejar em se tratando de grupos comparativos ou controle.

Como a fibroplasia é uma das importantes fases cicatriciais, se o subgalato de bismuto induzir uma maior atividade fibroplásica, espera-se ter uma maior quantidade de miofibroblastos, os quais levariam a um processo de contração precoce, otimizando a cicatrização.

Os fibroblastos são os responsáveis pela síntese, remodelação e deposição da matriz, além de interagirem com a mesma. As moléculas estruturais que formam a nova matriz extracelular contribuem para a formação do tecido de granulação, o qual servirá de base para a migração celular. A formação do tecido de granulação começa próximo ao terceiro dia⁵.

O fibroblasto excreta um monômero denominado pró-colágeno. As fibras reticulares do colágeno tipo III

são mais delgadas que as do colágeno tipo I e possuem maior quantidade de carboidratos. A cicatrização das feridas é realizada inicialmente com o colágeno tipo III, que mais tarde será substituído pelo colágeno tipo I, mais resistente⁵.

O objetivo geral deste artigo foi avaliar se o subgalato de bismuto promove interferência em alguma das fases da cicatrização por meio de análise histológica e imuno-histoquímica e pela observação do desenvolvimento de miofibroblastos nas feridas em pele do dorso. Sendo um material de fácil manejo (pó) e custo reduzido, seu uso poderia beneficiar a população do ponto de vista cicatricial, caso os estudos indiquem essa correlação.

■ MÉTODOS

Após aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) (protocolo 780) e de acordo com as recomendações do Colégio Brasileiro em Experimentação Animal (COBEA), os experimentos foram realizados no Laboratório de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR) no mês de julho de 2013.

Foram utilizados 60 ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*) da linhagem Wistar, adultos jovens com idade de 110 dias e com peso médio entre 250 g e 300 g, provenientes do Biotério Central. Os animais foram mantidos com alimentação *ad libitum* e água. Os mesmos ratos deste estudo foram utilizados em conjunto com o projeto “Avaliação dos efeitos do subgalato de bismuto na angiogênese: estudo experimental em ratos”.

No Laboratório de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental, os animais foram anestesiados com 0,1 ml/100 g de peso do animal com uma mistura de 1 ml de ketamina (50 mg) com 1 ml de xilazina 2% (20 mg) por via intramuscular na porção posterior da coxa. Em seguida, foram posicionados em decúbito ventral, em um suporte de madeira, sendo fixados os membros anteriores e os posteriores. Foi realizada tricotomia na região dorsal de cada animal, em área de 24 cm² (seis centímetros de comprimento por quatro centímetros de largura), localizada a partir de uma linha imaginária traçada entre os membros anteriores, estendendo-se por seis centímetros em direção caudal. Logo depois, foi realizada antisepsia com polivinilpirrolidona-iodo e delimitação da área operatória com campo esterilizado fenestrado.

No centro da área tricotomizada, foi feita uma demarcação na pele de cada rato por rotação da borda cortante de um *punch* metálico, com dois centímetros de diâmetro. Foi ressecado o segmento de pele circular,

de acordo com a demarcação, sendo aprofundada a incisão até expor a fáscia muscular dorsal.

Após o término do ato operatório, os animais receberam diclofenaco de potássio na dose de 10 mg/kg, por via intramuscular, com finalidade analgésica e anti-inflamatória. Os animais foram encaminhados de volta ao Biotério Central.

Os animais foram aleatoriamente marcados e divididos. Foram três grupos experimentais e três grupos-controle. Cada grupo era composto por 10 animais. Os animais dos grupos experimentais foram submetidos a aplicação diária de 0,5 mg de subgalato de bismuto em suas feridas. Os grupos-controle tiveram suas feridas tratadas diariamente com solução de cloreto de sódio a 0,9%, conforme preconiza a literatura. A eutanásia ocorreu de acordo com os grupos 3, 7 e 14 dias de tratamento.

Os animais foram reoperados para a retirada da ferida de acordo com o seu grupo. Cada ato operatório foi realizado após a devida anestesia do animal (como descrito anteriormente). O fragmento foi retirado de cada ferida cirúrgica, com margem de um centímetro de pele íntegra em torno da lesão, com profundidade até a musculatura dorsal do rato.

Imediatamente após a reoperação de cada animal, foi realizada eutanásia por dose letal de tiopental sódico intraperitoneal (120 mg/kg), sendo este o método de eutanásia recomendado para roedores e outros pequenos mamíferos, contido na Resolução 714 do Conselho Federal de Medicina Veterinária de 20 de junho de 2002.

Não houve nenhuma perda de animal e material durante a realização da pesquisa.

Os segmentos destinados à histologia, após retirados do dorso do rato, foram estendidos sobre papel-cartão identificado. Na sequência, foram mergulhados em recipiente com formol a 10% por 24 horas, sendo cortados e colocados em cassetes para a montagem dos blocos de parafina. As lâminas foram coradas com hematoxilina eosina (HE) e picrosírus, e analisadas em microscópio óptico.

Na HE, foi realizada a contagem de células monomorfonucleares e polimorfonucleares e de vasos para a caracterização da fase do processo inflamatório de acordo com a seguinte classificação: Tabelas 1 e 2⁶.

Inicialmente, para cada momento de avaliação (3 dias, 7 dias e 14 dias), foi comparada a fase do processo inflamatório nos dois grupos, controle e experimental. Em seguida, considerando-se cada grupo, os momentos de comparação foram feitos dois a dois. Testou-se a hipótese nula de que a distribuição sobre as classificações da fase do processo inflamatório é igual nos dois momentos de avaliação comparados *versus* a hipótese alternativa de distribuições diferentes.

Tabela 1. Contagem celular do processo inflamatório.

Número de células	Polimorfonucleares	Monomorfonucleares
Até 50	-1	1
50-100	-2	2
> 100	-3	3

Tabela 2. Caracterização da fase do processo inflamatório de acordo com o escore final de cada grupo.

Fase do processo inflamatório	Escore final de classificação
Agudo	-9 a -3
Subagudo	-2,9 a 3
Crônico	3 a 9

A coloração picrosírus avaliou o colágeno através da birrefringênciça específica de cada tipo de colágeno, fazendo uso de um microscópio de luz polarizada. Com relação ao percentual de área de colágeno, a comparação dos grupos em cada momento de avaliação (3 dias, 7 dias e 14 dias) foi feita através do teste não paramétrico de Mann-Whitney. A comparação dos momentos de avaliação considerando-se cada grupo foi feita através do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Para a análise comparativa dos grupos e dos momentos de avaliação em relação à fase do processo inflamatório, foi usado o teste exato de Fisher. Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística. Os dados foram analisados com o programa computacional IBM SPSS Statistics v.20.

O material também foi encaminhado para processamento imuno-histoquímico, visando pesquisa com alfa-SMA, Fator 8 e CD34. Porém, apenas no alfa-SMA foi realizada a leitura, pois o Fator 8 e o CD34 apresentaram pouca especificidade com relação à coloração de musculatura lisa analisada.

Após a análise histológica e imuno-histoquímica, foi realizada análise estatística com métodos paramétricos e não paramétricos, sendo então elaborada a documentação final e o artigo para posterior publicação.

A análise dos resultados relativos à imuno-histoquímica foi feita em cima da área corada em castanho, que evidencia a área expressa pelos miofibroblastos, e da contagem de vasos para avaliação da angiogênese.

■ RESULTADOS

Avaliação do processo inflamatório com contagem de células monomorfonucleares e polimorfonucleares

Nas duas avaliações iniciais, com relação ao processo inflamatório, não houve diferença de cicatrização nos respectivos grupos – subgrupos 3 dias ($p = 1$), 7 dias ($p = 0,474$) e 14 dias ($p = 0,303$) (Figuras 1 e 2).

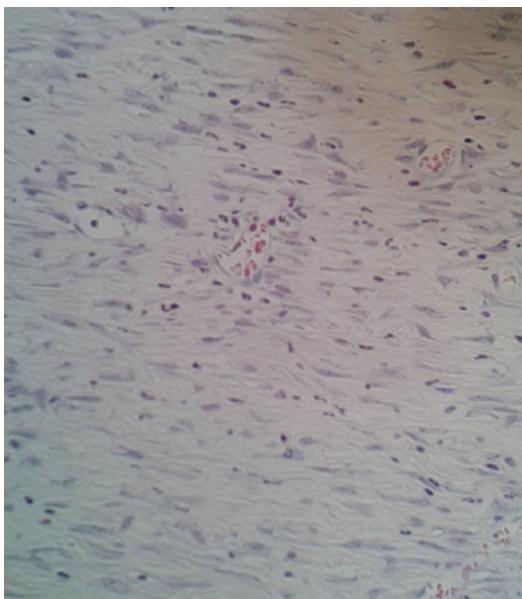


Figura 1. Coloração hematoxilina eosina no grupo-controle/ subgrupo 14 dias.

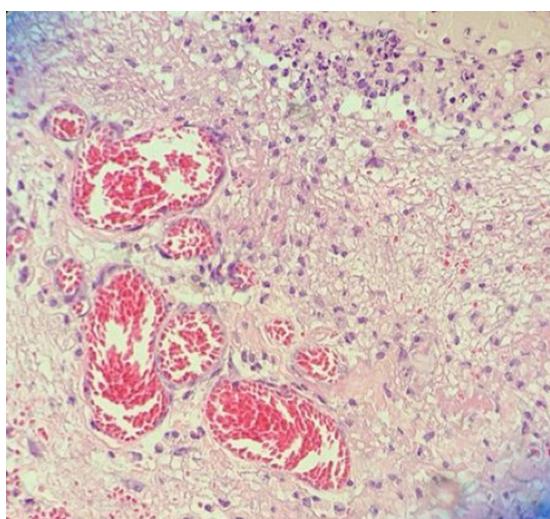


Figura 2. Coloração hematoxilina eosina no grupo experimental/ subgrupo 14 dias.

Avaliação do colágeno através da coloração picrosírius

A avaliação do colágeno tipo I foi feito entre os grupos experimental e controle, bem como intragrupo, comparando os dias entre si. A produção de colágeno tipo I foi semelhante entre os grupos experimental e controle, ou seja, não houve diferença quantitativa de colágeno tipo I entre os grupos ($p = 0,330$). Já no grupo experimental, houve aumento importante da produção de colágeno tipo I entre 3 e 14 dias, fato não observado no controle ($p = 0,024$) (Figura 3).

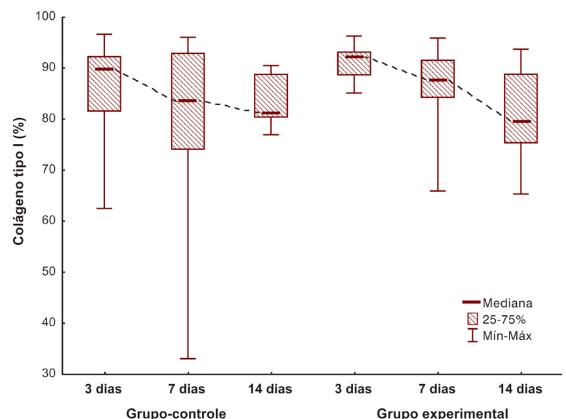


Figura 3. Comparação dos grupos com relação ao colágeno maduro.

Com relação aos resultados apresentados no colágeno tipo III, cuja análise foi realizada da mesma maneira que a análise do colágeno tipo I, os resultados foram também os mesmos (grupo-controle: $p = 0,330$; e grupo experimental: $p = 0,024$) (Figuras 4-6).

Processamento imuno-histoquímico com pesquisa de alfa-SMA

Na análise dos miofibroblastos, não houve diferença na fase cicatricial, bem como na análise dos vasos para a angiogênese (grupo controle: $p = 0,336$; e grupo experimental: $p = 0,400$) (Figuras 7 e 8).

DISCUSSÃO

Atualmente, estão sendo investigados métodos com o objetivo de diminuir e evitar a hemorragia trans e pós-operatória em adenoamigdalectomias. Por esse motivo, vários meios têm sido comparados. O método por criocirurgia é considerado inviável pelo seu alto custo e pela dificuldade de manipulação e armazenamento do nitrogênio líquido. Já o método a *laser* necessita de uma correta potência do raio, além de tempo de exposição e ângulo de enfoque precisos, para que a técnica seja promissora, com possibilidade de danos às estruturas adjacentes devido à alta temperatura do raio (750 a 900 °C)⁷.

Devido a essas dificuldades apresentadas pelos outros métodos, mesmo sem estudos que nos indiquem a real eficácia do subgalato de bismuto, este tem sido um método aceitável e muito difundido em todo o mundo como agente hemostático em operações de amígdalas.

A literatura não trabalha possíveis efeitos pró-cicatriciais do uso do subgalato de bismuto. Para obter melhores opções hemostáticas, buscamos

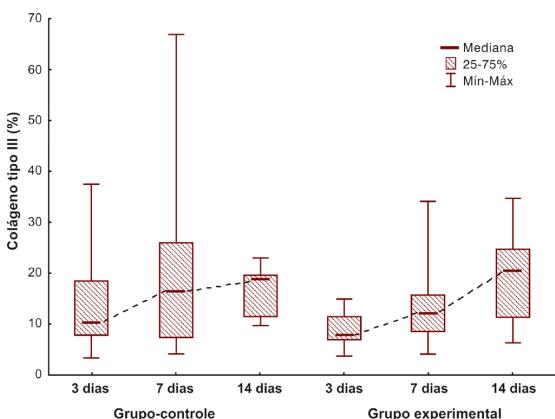


Figura 4. Comparação dos grupos com relação ao colágeno imaturo.

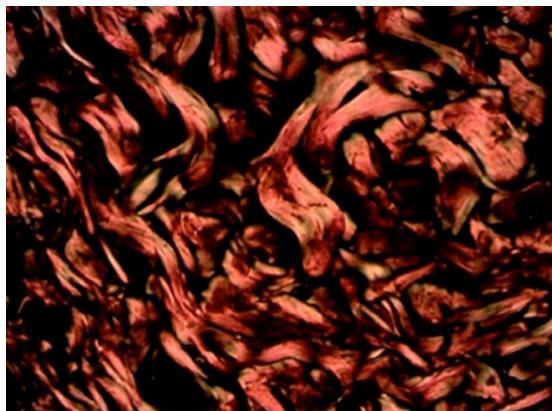


Figura 5. Coloração picrosírius no grupo-controle/subgrupo 14 dias.

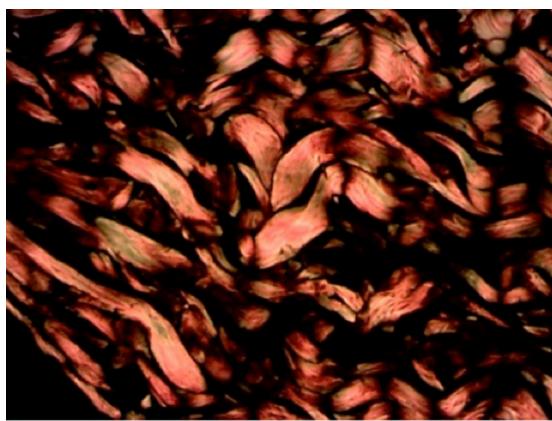


Figura 6. Coloração picrosírius no grupo experimental/subgrupo 14 dias.

compreender melhor as qualidades cicatricionais dessa substância.

Outros autores obtiveram excelentes resultados hemostáticos na área cruenta deixada após tonsilectomia palatina com uso de tampão de gaze embebido em

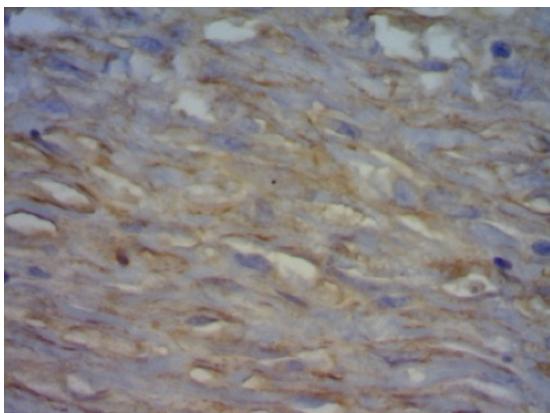


Figura 7. Imuno-histoquímica no grupo-controle/subgrupo 14 dias.

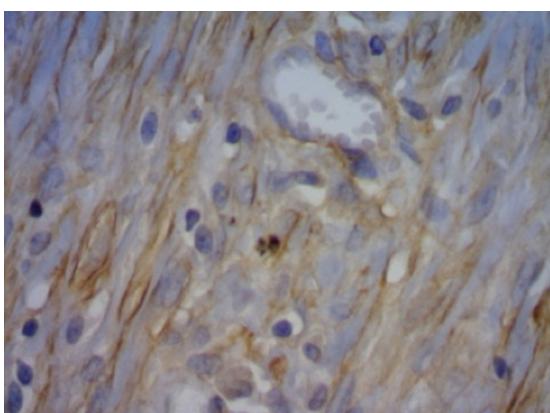


Figura 8. Imuno-histoquímica no grupo experimental/subgrupo 14 dias.

solução de subgalato de bismuto a 100%. Além disso, foi considerado um método de baixo custo e fácil realização, tendo sido rara a necessidade de sutura ou ligadura dos vasos da loja⁸.

Quando compararmos o grau de inflamação dos grupos experimental e controle, notamos que não há diferença significativa. O mesmo foi observado em um estudo que avaliou o processo inflamatório do uso de subgalato de bismuto em heptectomias em ratos⁹.

Outro estudo que avaliou a cicatrização também em dorso de ratos Wistar, porém utilizando períodos diferentes para os subgrupos (1, 4, 7, 11 e 18 dias), também concluiu que o subgalato de bismuto não interferiu na qualidade do processo de reparação, sendo biocompatível com os tecidos. Ele apresentou uma área maior de tecido de granulação pela presença física do material, podendo ser indicado como hemostático, sem efeito significativo no processo de reparação, o que demonstra que o efeito independe do tempo de aplicação da substância¹⁰.

No presente estudo, não foi visto benefício do uso da solução de subgalato de bismuto na cicatrização da pele, bem como na fibroplasia. Um estudo mostrou retardo na cicatrização e na fibroplasia em mucosas, mesmo com a diluição e a quantidade aplicada da substância em estudo sendo as mesmas¹¹.

Uma possível razão para a diferença de comportamento do subgalato de bismuto em mucosas e na pele são as propriedades individuais de cada um desses tecidos. Em comparação com a pele, a mucosa oral apresenta menor quantidade de tecido cicatricial, tanto sob aspecto clínico como histológico, por apresentar menor quantidade de fibras. Em termos de formação de tecido cicatricial, as diferenças entre a mucosa e a pele são vantajosas, tanto sob aspecto estético como funcional. Pesquisadores acreditam que essas diferenças devam estar relacionadas às origens embrionárias dos fibroblastos dos dois tecidos. Os fibroblastos da pele derivam do mesoderma, e os da mucosa oral, de células da crista neural¹².

A menor quantidade de fibras provenientes da crista neural pode ter permitido maior grau de absorção do subgalato, o qual, em função dessa maior quantidade absorvida, pode ter apresentado efeito tóxico, alterando a fibroplasia e, consequentemente, a cicatrização de forma geral.

Na pele, a maior quantidade de fibras provenientes do mesoderma pode ter servido de barreira, impedindo maior absorção e resultando em menor efeito tóxico. Não houve interferência na fibroplasia, e a cicatrização foi mantida sem alterações.

Com a realização da coloração picrosirius, foi evidenciado, no grupo experimental, um aumento importante da produção de colágeno tipo I entre 3 e 14 dias, fato não observado no controle ($p = 0,024$). Esse resultado não foi encontrado na imuno-histoquímica. Uma possível razão para tal fato coloca em questionamento a efetividade do marcador, uma vez que ele não é específico para ratos. Nesse caso, seria válido realizar novamente a pesquisa utilizando outro marcador para confirmar a imuno-histoquímica, mas, em função de custo e dificuldade, optou-se por não realizar outro marcador neste momento, ficando o bloco de parafina reservado para outras pesquisas.

CONCLUSÃO

A utilização do subgalato de bismuto em ferida de pele de ratos não evidenciou benefícios relativos à proliferação de miofibroblastos quando comparados os grupos experimental e controle.

REFERÊNCIAS

- Brasileiro HM, Lee IW, Rapoport A. Uso do subgalato de bismuto como agente hemostático em tonsiléctomia palatina: estudo de 201 casos. São Paulo: Atha; 2006. p. 181-5. ACTA ORL/Técnicas em Otorrinolaringologia.
- Kim SH, Grein RL, Tramontina VA. Aplicação do subgalato de bismuto em cirurgia periodontal. JBC J Bras Odontol Clin. 1997;1(1):31-4.
- Pillar RS, Brito EO. Aplicação do subnitrato de bismuto e do subgalato nas amigdaléctomias. Arq Otorrinolaringol. 2003;7(1):28-31.
- Padilla RM, Valdés CM, Asato JR, et al. Eficacia del subgalato de bismuto, como agente hemostático tópico, en el sangrado transoperatorio de la adenoamigdalectomía o amigdalectomía. An Orl Mex. 2012;57(2):65-8.
- Simões MJ, Cabral AC, Boyaciyan K, Kulay L Jr, Sasso WS. Aspectos ultra-estruturais dos fibroblastos e dos macrófagos durante o processo de reparação da pele de ratos. Rev Paul Med. 1986;104(3):132-5. PMID:3563265.
- Vizzotto AO Jr, Noronha L, Scheffel DL, Campos AC. Influência da cisplatina administrada no pré e pós-operatório sobre a cicatrização de anastomoses colônicas em ratos. J Bras Patol Med Lab. 2003;39(2):143-9. <http://dx.doi.org/10.1590/S1676-24442003000200009>.
- Hernández-Paz SH, Ortiz-Reyes A, García-Guzmán CM. Estudio comparativo de dos agentes hemostáticos adicionados con epinefrina en la adenoamigdalectomía. Rev Esp Med Quir. 2012;17(1):3-7.
- Brasileiro HM, Lee IW, Rapoport A. Relação entre as complicações hemorrágicas pós cirúrgicas e o volume das tonsilas palatinas. Rev Bras Otorrinolaringol. 2004;70(1):58-61. <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-72992004000100010>.
- Arroyo PC Jr, Silva RCMA, Santi D No, Santana D Jr, Ferreira FD, Silva RF. Uso do subgalato de bismuto para hemostasia local em hepectomias parciais em ratos. Rev Col Bras Cir. 2004;31(3):165-71. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-69912004000300005>.
- Tramontina VA. Efeito do subgalato de bismuto no processo de reparação de feridas em dorso de rato. Estudo experimental histológico, histométrico e fotográfico [dissertação]. São Paulo: Universidade Estadual de Campinas; 1997 [citado em 2016 mar 28]. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=vtls000118398>
- Seidel K, Sampaio CPP, Maeda CRS, et al. Avaliação dos efeitos do subgalato de bismuto na cicatrização: avaliação do processo inflamatório e da proliferação dos miofibroblástos. In: Anais do 43º Congresso Brasileiro de Otorrinolaringologia; 2013; São Paulo. São Paulo: Elsevier; 2013. p. 111.
- Fehrenbach MJ. Anatomia, histologia e embriologia dos dentes e estruturas orofaciais. Rio de Janeiro: Elsevier; 2012. p. 145-9.

Correspondência

Rubianne Ligório de Lima
Rua Alberto Potier, 50/33 - Boa Vista
CEP 82560-480 - Curitiba (PR), Brasil
Tel.: (41) 9941-6723
E-mail: rubillima@hotmail.com

Informações sobre os autores

RLL - Graduada em Medicina pela Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR).

CPS - Graduada em Odontologia pela Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG); Graduada em Medicina pela Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR); Mestre em cirurgia pela Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR).

KCS - Graduada em Medicina pela Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR); Atualmente residente do segundo ano de Otorrinolaringologia no Hospital Santa Casa de Misericórdia de Curitiba.

MB - Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR).

RMS - Graduada em Medicina pela Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR); Atualmente aluna de especialização do primeiro ano de Otorrinolaringologia no Hospital da Cruz Vermelha de Curitiba.

Contribuições dos autores

Concepção e desenho do estudo: RLL, CPS, MB, RMS

Análise e interpretação dos dados: RLL, CPS, KCS, RMS

Coleta de dados: RLL

Redação do artigo: RLL, CPS, RMS

Revisão crítica do texto: RLL, CPS, MB

Aprovação final do artigo*: RLL, CPS, KCS, MB, RMS

Análise estatística: RLL, CPS

Responsabilidade geral pelo estudo: RLL

*Todos os autores leram e aprovaram a versão final submetida ao J Vasc Bras.

Assessment of the effects of bismuth subgallate on proliferation of myofibroblasts: an experimental study in rats

Avaliação dos efeitos do subgalato de bismuto na proliferação de miofibroblastos

Rubianne Ligório de Lima¹, Cláudia Paraguaçu Sampaio¹, Karin Caroline Seidel¹, Melina Branco¹, Rafaela Mabile Sobreiro¹

Abstract

Background: Bismuth subgallate is an insoluble heavy metal that is used for its astringent and hemostatic properties. **Objective:** To evaluate the effects of bismuth subgallate on the healing process by observation of myofibroblasts in the skin of rats. **Methods:** A sample of 60 Wistar rats was used. Each rat was subjected to a dorsal skin wound and allocated to one of two groups: a control group, in which 0.9% sodium chloride was administered daily, or an experimental group, in which 0.5 mg of bismuth subgallate was administered daily. Each of these groups was further subdivided into three subsets, which were reoperated after 3, 7 and 14 days respectively for excision and collection of the skin wound specimens. Samples were treated with hematoxylin eosin, picrosirius, and immunohistochemical staining to enable assessment of myofibroblast counts, inflammatory response phase, and collagen synthesis. **Results:** No inflammatory process differences were detected between the control and experimental groups at 3 days ($p = 1$), 7 days ($p = 0.474$), or 14 days ($p = 303$). Evaluation of types I and III collagen in the control group did not demonstrate healing benefits at 3 days ($p = 0.436$), 7 days ($p = 0.853$), or 14 days ($p = 0.436$); whereas in the experimental group there were increases in types I and III collagen at 3 and 14 days ($p = 0.005$). Immunohistochemical analysis confirmed the results of hematoxylin eosin staining, since there were no differences between subsets in terms of area of myofibroblasts, in the experimental ($p = 0.4$) or the control ($p = 0.336$) groups. **Conclusions:** Administration of bismuth subgallate to skin wounds in rats did not result in any evidence of benefits to healing, i.e., no difference in fibroplasia was detected when experimental and control groups were compared.

Keywords: wound healing; myofibroblasts; otolaryngology.

Resumo

Contexto: O subgalato de bismuto é um metal pesado e insolúvel, utilizado por suas propriedades adstringentes e hemostáticas. **Objetivo:** Avaliar os efeitos do subgalato de bismuto na cicatrização mediante observação de miofibroblastos em pele de ratos. **Métodos:** Foram utilizados 60 ratos da linhagem Wistar, que receberam uma ferida no dorso da pele. Os animais foram divididos em dois grupos: controle (aplicação diária de cloreto de sódio a 0,9%) e experimental (aplicação diária de 0,5 mg de subgalato de bismuto). Cada grupo foi subdividido em três subgrupos, que foram reoperados para retirada da ferida em 3, 7 e 14 dias. Foi realizada coloração de hematoxilina eosina, picrosírius e imuno-histoquímica para avaliar contagem de miofibroblastos, resposta inflamatória e síntese de colágeno. **Resultados:** Não foi encontrada diferença entre os grupos controle e experimento com relação ao processo inflamatório – subgrupos 3 dias ($p = 1$), 7 dias ($p = 0,474$) e 14 dias ($p = 303$). A avaliação dos colágenos tipo I e III no grupo-controle não demonstrou benefícios de cicatrização – 3 dias ($p = 0,436$), 7 dias ($p = 0,853$) e 14 dias ($p = 0,436$); já no grupo experimental, houve aumento dos colágenos tipos I e III nos subgrupos 3 e 14 dias ($p = 0,005$). A imuno-histoquímica confirmou os resultados encontrados na coloração hematoxilina eosina, na qual a área de miofibroblastos entre os subgrupos, nos grupos experimental ($p = 0,4$) e controle ($p = 0,336$), foi indiferente. **Conclusão:** A utilização do subgalato de bismuto em ferida de pele de ratos não evidenciou benefícios na cicatrização, ou seja, não houve diferença na fibroplasia quando comparados os grupos experimental e controle.

Palavras-chave: cicatrização; miofibroblastos; otolaringologia.

¹Pontifícia Universidade Católica do Paraná – PUC-PR, Faculdade de Medicina, Curitiba, PR, Brazil.

Financial support: None.

Conflicts of interest: No conflicts of interest declared concerning the publication of this article.

Submitted: March 28, 2016. Accepted: July 28, 2016.

The study was carried out at Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR), using rats obtained from the PUC-PR's Central Animal House. The experiment was conducted at the Experimental Surgery and Operating Techniques Laboratory at PUC-PR, Curitiba, PR, Brazil.

INTRODUCTION

Bismuth subgallate is a yellowish substance that is presented in the form of an odorless powder and which undergoes discoloration in the presence of sunlight.¹ It is increasingly being used by professionals working in otorhinolaryngology and dentistry because of its astringent and hemostatic properties. Applications include topical treatment of open wounds, treatment of gastroduodenal ulcers, as an antidiarrheal agent, to control colostomy odor, during dental surgery, for management of epistaxis and, empirically, in adenotonsillectomies.¹⁻³

When performing an amygdalectomy, the otorhinolaryngologist's primary concerns are to reduce transoperative bleeding, reduce duration of surgery, and avoid postoperative complications; in other words, to achieve a safe procedure.¹⁻³

Bismuth subgallate is a heavy metal that is relatively insoluble in water and has astringent properties (via activation of factor XII of the coagulation cascade), accelerates formation of blood clots, and improves hemostasis.⁴ In view of its increasing use, there is a need for controlled and randomized studies with acceptable methodology to provide better support for its use.

Some otorhinolaryngology services do not employ bismuth subgallate, claiming that its administration during the immediate postoperative period is not beneficial, whereas others describe it as very useful for controlling bleeding. In general, studies have focused on its use to control bleeding during the immediate postoperative period.

There is no objective answer in the literature with relation to the benefits of subgallate for hemostasis or for healing and studies are contradictory. Additionally, its possible beneficial effects on healing have not been investigated and there is room for improvement in terms of use of comparison or control groups.

Fibroplasia is an important phase in healing and if bismuth subgallate does induce increased fibroplastic activity, it is to be expected that the number of myofibroblasts will be increases, leading to an early contraction process, optimizing healing.

Fibroblasts are responsible for synthesis, remodeling, and deposition of the matrix and also interact with the matrix. The structural molecules that make up the new extracellular matrix contribute to formation of granulation tissue, which in turn provides a foundation for cell migration. Formation of granulation tissue begins around the third day.⁵

Fibroblasts secrete a monomer called procollagen. The reticular fibers of type III collagen are narrower

than those of type I collagen and have larger quantities of carbohydrates. Wound healing initiates with type III collagen, which will later be substituted by the more resistant type I collagen.⁵

The overall objective of this article was to evaluate whether bismuth subgallate has effects on some of the phases of healing by histological and immunohistochemical analysis and by observation of myofibroblast development in dorsal skin wounds. Since it is a material that is easy to handle (in powder form) and is inexpensive, its use in healing could benefit the population, if studies indicate that such a correlation does exist.

METHODS

After approval was granted by the local Animal Research Ethics Committee (protocol 780), and in accordance with Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) recommendations, the experiments were conducted at the Experimental Surgery and Operating Techniques Laboratory at the Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR) during July of 2013.

A sample of 60 male Wistar rats (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*), all young adults aged 110 days and with mean weight from 250 g to 300 g, were obtained from the University's Central Animal House. These animals were provided with food and water ad libitum. The same sample of rats was also used in a project entitled "Evaluation of the effects of bismuth subgallate on angiogenesis: experimental study with rats".

At the Experimental Surgery and Operating Techniques Laboratory, the animals were anesthetized with 0.1 ml/100 g of body weight with a mixture of 1 ml of ketamine (50 mg) with 1 ml of 2% xylazine (20 mg) administered intramuscularly to the posterior thigh. They were then positioned in decubitus ventral on a wooden support to which front and hind legs were fixed. An area of 24 cm² (6 centimeters long by 4 centimeters wide) was shaved on the dorsal region of each animal, located with relation to an imaginary line between the front limbs and extending 6 centimeters in the caudal direction. Shortly afterwards, antisepsis was performed with povidone iodine and the operating area was delimited with a fenestrated sterile field.

In the center of the shaved area, a demarcation with a diameter of 2 centimeters was performed on the skin of each rat by rotating the cutting edge of a metal punch. This circular section of skin was resected following the demarcation, and the incision

was taken to a depth sufficient to expose the dorsal muscle fascia.

After the operation, each animal was given intramuscular potassium diclofenac at a dosage of 10 mg/kg with the objective of achieving analgesia and preventing inflammation. The animals were transported back to the Central Animal House.

The animals were marked and separated at random to form three experimental groups and three control groups of 10 animals each. Animals in experimental groups were administered 0.5 mg of bismuth subgallate to their wounds daily. The wounds of control animals were treated daily with 0.9% sodium chloride solution, as recommended in the literature. One control group and one experimental group each underwent euthanasia on day 3, day 7, and day 14.

The animals were reoperated to remove the wound specimens on the days scheduled for each group. Each operation was performed after anesthesia of the animal (as described above). The specimen removed included a margin of 1 cm of intact skin around each surgical wound and was to the depth of the dorsal musculature.

Immediately after reoperation, each animal was euthanized with a lethal dose of intraperitoneal sodium thiopental (120 mg/kg), which is the euthanasia method for rodents and other small mammals recommended in Federal Veterinary Medical Council Resolution 714 of June 20, 2002.

None of the animals or specimens were lost during the study.

After removal from the rats, the histology specimens were laid out on labeled cards. They were then immersed in a receptacle containing 10% formal for 24 hours and were then cut and placed in cassettes for mounting of the paraffin blocks. Slides were stained with hematoxylin eosin (HE) and picrosirius and analyzed under an optical microscope.

Monomorphonuclear and polymorphonuclear cells and vessels were counted on the HE slides to characterize the inflammatory process, which was scored as shown in Table 1 and then classified as shown in Table 2.⁶

Initially, inflammatory process phases were compared between the two groups, control and experimental, for each of the three assessment points (3 days, 7 days, and 14 days). Next, within each group, the assessment points were compared with each other, two by two. The null hypothesis that the distribution of inflammatory process phases was equal at the two different assessment times was tested against the alternative hypothesis that the distributions were different.

Table 1. Scores for inflammatory process cell counts.

Number of cells	Polymorphonuclear	Monomorphonuclear
Up to 50	-1	1
50-100	-2	2
> 100	-3	3

Table 2. Classification of inflammatory process phases by final score for each group.

Inflammatory process score	Final classification score
Acute	-9 to -3
Subacute	-2.9 to 3
Chronic	3 to 9

Picosirius staining was used to assess collagen by means of the birefringence specific to each type of collagen, using a polarized light microscope. The Mann-Whitney nonparametric test was used to compare the percentage collagen area in each group at each of the assessment times (3 days, 7 days, and 14 days). Intra-group comparisons of different assessment times against each other were performed using the Kruskal-Wallis nonparametric test. Fisher's exact test was used for the comparative analyses of groups and assessment times in terms of inflammatory process phases. P values < 0.05 were considered indicative of statistical significance. Data were analyzed with IBM SPSS Statistics v.20.

Specimens were also sent for immunohistochemical processing, with the intention of testing for alpha-SMA, Factor 8 and CD34. However, readings were only conducted for alpha-SMA, because the smooth muscle stain analyzed provided very little specificity for Factor 8 and CD34.

After histological and immunohistochemical analysis, statistical analysis was conducted using parametric and nonparametric methods, before compilation of the final documentation and writing of the article for publication.

Analysis of immunohistochemical results was based on the area stained a chestnut color, which indicates the area of myofibroblast expression, and on counting vessels to evaluate angiogenesis.

RESULTS

Evaluation of the inflammatory process by monomorphonuclear and polymorphonuclear cell counts

The two initial analyses of the inflammatory process revealed no differences in healing between the respective groups at 3 days ($p = 1$), 7 days ($p = 0.474$), or 14 days ($p = 0.303$) (Figures 1 and 2).

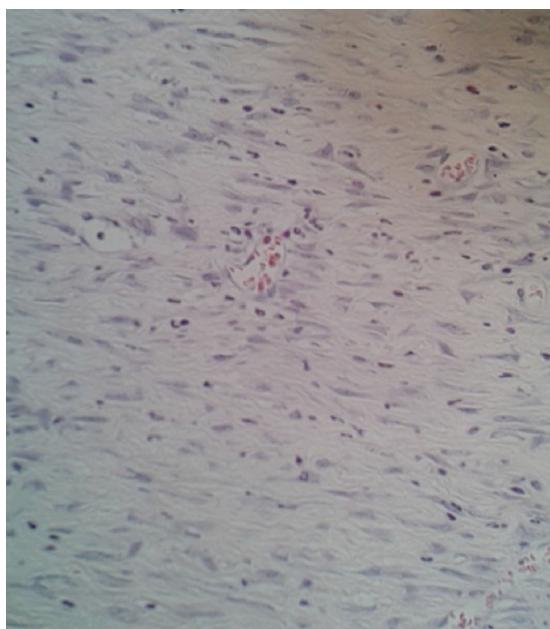


Figure 1. Hematoxylin eosin staining for control group/14 day subset.

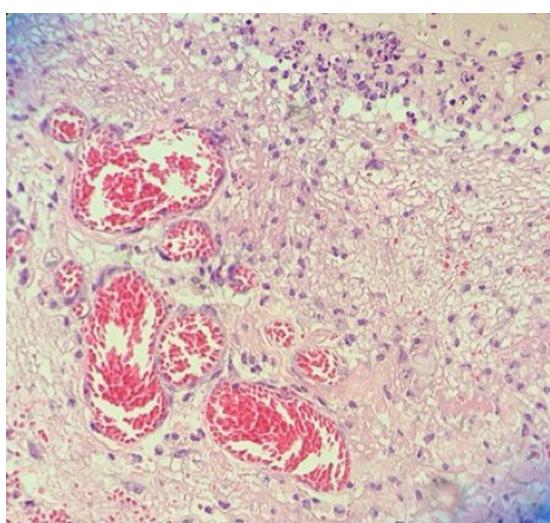


Figure 2. Hematoxylin eosin staining for experimental group/14 day subset.

Evaluation of collagen by picrosirius staining

Type I collagen was compared between experimental and control groups and intra-group analyses were conducted comparing the three different days against each other. Production of type I collagen in the experimental and control groups was similar, i.e. there was no quantitative difference in type I collagen between the groups ($p = 0.330$). In the experimental group, there was a considerable increase in type I collagen from 3 to 14 days, which was not observed in the control group ($p = 0.024$) (Figure 3).

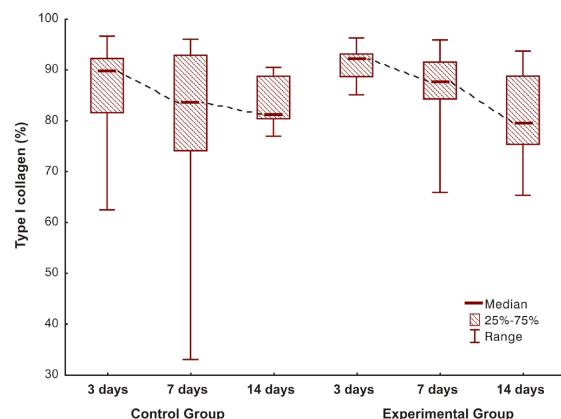


Figure 3. Comparison of groups for mature collagen.

Analysis of the results for type III collagen was performed in the same manner as analysis of type I collagen results and revealed the same results (control group: $p = 0.330$; and experimental group: $p = 0.024$) (Figures 4-6).

Immunohistochemical processing with alpha-SMA analysis

The analysis of myofibroblasts did not reveal any differences in terms of healing phase and analysis of vessels revealed no difference in angiogenesis (control group: $p = 0.336$; and experimental group: $p = 0.400$) (Figures 7 and 8).

DISCUSSION

Methods are currently being investigated that are intended to reduce and avoid transoperative and postoperative hemorrhages in adenotonsillectomies and several different approaches have been compared. Methods based on cryosurgery are considered unfeasible because of the high cost and the difficulties with handling and storage of liquid nitrogen. In turn, methods employing lasers demand the correct power beam, in addition to precise exposure time and focus angles if a technique is to be considered promising, and there is the possibility of damage to adjacent structures because of the high temperatures of the beam (750 to 900 °C).⁷

These problems related to other methods have resulted in worldwide acceptance and adoption of bismuth subgallate as a hemostatic agent for tonsil surgery, even in the absence of studies demonstrating its true efficacy.

The literature does not cover the possible benefits for healing of bismuth subgallate. With the intention of contributing to better options for hemostasis, we

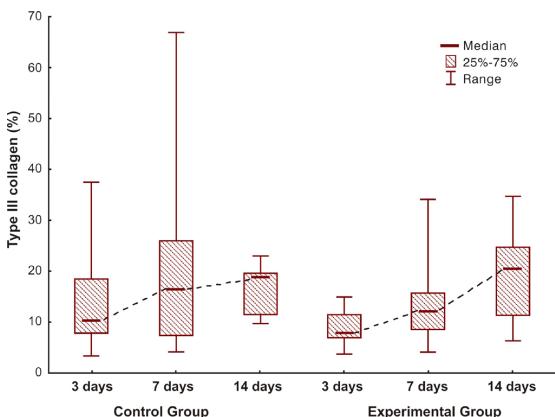


Figure 4. Comparison of groups for immature collagen.

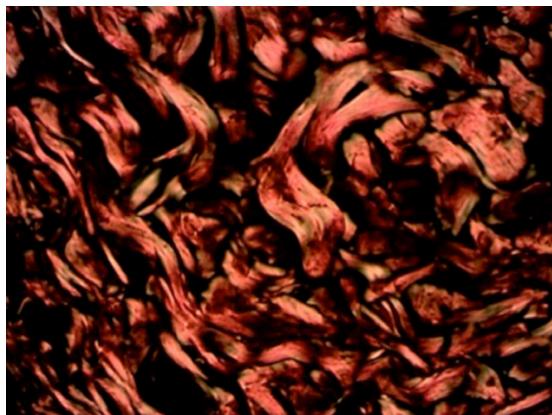


Figure 5. Picosirius staining for control group/14 day subset.

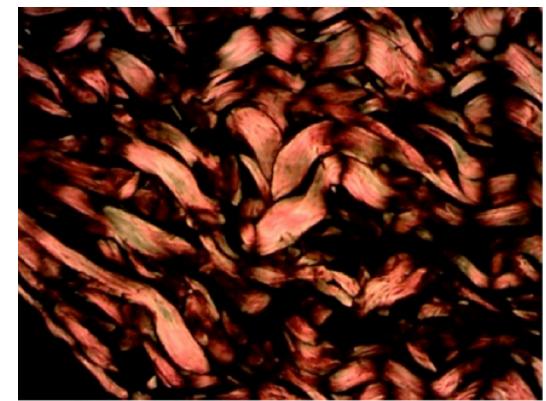


Figure 6. Picosirius staining for experimental group/14 day subset.

attempted to increase understanding of this substance's healing properties.

Other authors reported excellent hemostatic results in the area of bleeding left by tonsillectomy using a gauze dressing soaked in a 100% solution of bismuth subgallate. The method was also considered low

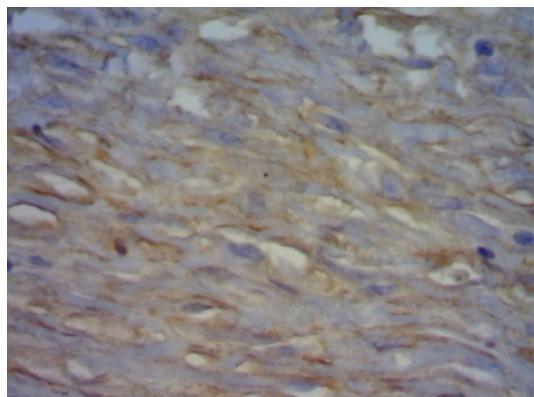


Figure 7. Immunohistochemical staining for control group/14 day subset.

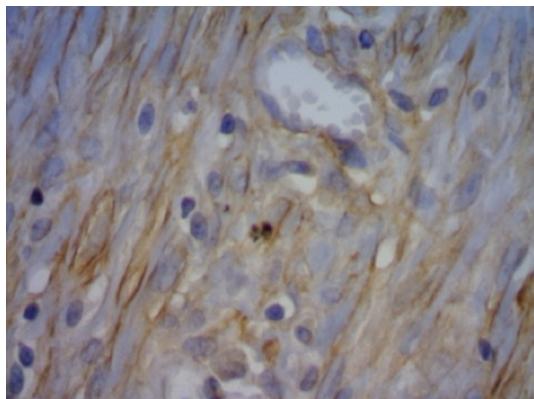


Figure 8. Immunohistochemical staining for experimental group/14 day subset.

cost and easily employed, and it is rare that suture or ligature of the vessels in the region is needed.⁸

When we compared the degree of inflammation between the experimental and control groups, we noted that there was no significant difference. The same was observed in a study that investigated the inflammatory process with use of bismuth subgallate in partial hepatectomies in rats.⁹

Another study assessed healing in the dorsal area of Wistar rats, but using different periods for the subsets (1, 4, 7, 11, and 18 days), and also concluded that bismuth subgallate did not impact on the quality of the healing process and was biocompatible with the tissues. That study observed a larger area of granulation tissue, due to the physical presence of the material, concluding that it can be prescribed as a hemostatic with no significant effect on the healing process, which demonstrates that this finding is independent of the duration of administration of the substance.¹⁰

In the present study, no beneficial effect on skin healing from use of the bismuth subgallate

solution was observed and there was also no effect on fibroplasia. A different study observed delayed healing and fibroplasia in mucosas, even though the dilution and quantity of the substance administered were the same in both studies.¹¹

One possible reason for the difference in the behavior of bismuth subgallate in mucosas and in skin is the individual properties of each of these tissue types. Compared with skin, oral mucosa exhibits smaller quantities of scar tissue, both clinically and histologically, because it has fewer fibers. In terms of formation of scar tissue, the differences between mucosa and skin are advantageous, both from esthetic and functional perspectives. Researchers believe that these differences are related to the embryonic origins of the fibroblasts in the two types of tissue. The fibroblasts in skin are derived from the mesoderm, and those in oral mucosa from cells of the neural crest.¹²

The smaller quantity of fibers originating from the neural crest may enable a higher degree of absorption of the subgallate, which may have had toxic effects because of the greater quantity absorbed, altering fibroplasia and, consequently, healing in general.

In the skin, the larger quantity of fibers originating from the mesoderm may have created a barrier, impeding greater absorption and resulting in reduced toxicity. There was no effect on fibroplasia, and healing was unaltered.

The picrosirius staining revealed a considerable increase in production of type I collagen from 3 to 14 days in the experimental group, which was not observed in the control group ($p = 0.024$). The immunohistochemical analysis did not detect this result. One possible explanation for this fact calls into question the effectiveness of the marker employed, since it is not specific for rats. In this case it would be interesting to conduct the test again with a different marker in order to confirm the immunohistochemical results, but, because of the costs and difficulties involved, the decision was taken not to use a different marker at this point and the paraffin blocks have been stored for future studies.

CONCLUSIONS

In rats, treating skin wounds with bismuth subgallate did not exhibit benefits in terms of myofibroblast proliferation when experimental and control groups were compared.

REFERENCES

- Brasileiro HM, Lee IW, Rapoport A. Uso do subgalato de bismuto como agente hemostático em tonsiléctomia palatina: estudo de 201 casos. São Paulo: Atha; 2006. p. 181-5. ACTA ORL/Técnicas em Otorrinolaringologia.
- Kim SH, Grein RL, Tramontina VA. Aplicação do subgalato de bismuto em cirurgia periodontal. JBC J Bras Odontol Clin. 1997;1(1):31-4.
- Pillar RS, Brito EO. Aplicação do subnitrito de bismuto e do subgalato nas amigdaléctomias. Arq Otorrinolaringol. 2003;7(1):28-31.
- Padilla RM, Valdés CM, Asato JR, et al. Eficacia del subgalato de bismuto, como agente hemostático tópico, en el sangrado transoperatorio de la adenoamigdalectomía o amigdalectomía. An Orl Mex. 2012;57(2):65-8.
- Simões MJ, Cabral AC, Boyaciyan K, Kulay L Jr, Sasso WS. Aspectos ultra-estruturais dos fibroblastos e dos macrófagos durante o processo de reparação da pele de ratos. Rev Paul Med. 1986;104(3):132-5. PMID:3563265.
- Vizzotto AO Jr, Noronha L, Scheffel DL, Campos AC. Influência da cisplatina administrada no pré e pós-operatório sobre a cicatrização de anastomoses colônicas em ratos. J Bras Patol Med Lab. 2003;39(2):143-9. <http://dx.doi.org/10.1590/S1676-24442003000200009>.
- Hernández-Paz SH, Ortiz-Reyes A, García-Guzmán CM. Estudio comparativo de dos agentes hemostáticos adicionados con epinefrina en la adenoamigdalectomía. Rev Esp Med Quir. 2012;17(1):3-7.
- Brasileiro HM, Lee IW, Rapoport A. Relação entre as complicações hemorrágicas pós cirúrgicas e o volume das tonsilas palatinas. Rev Bras Otorrinolaringol. 2004;70(1):58-61. <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-72992004000100010>.
- Arroyo PC Jr, Silva RCMA, Santi D No, Santana D Jr, Ferreira FD, Silva RF. Uso do subgalato de bismuto para hemostasia local em heptectomias parciais em ratos. Rev Col Bras Cir. 2004;31(3):165-71. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-69912004000300005>.
- Tramontina VA. Efeito do subgalato de bismuto no processo de reparação de feridas em dorso de rato. Estudo experimental histológico, histométrico e fotográfico [dissertação]. São Paulo: Universidade Estadual de Campinas; 1997 [citado em 2016 mar 28]. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=vtls000118398>
- Seidel K, Sampaio CPP, Maeda CRS, et al. Avaliação dos efeitos do subgalato de bismuto na cicatrização: avaliação do processo inflamatório e da proliferação dos miofibroblástos. In: Anais do 43º Congresso Brasileiro de Otorrinolaringologia; 2013; São Paulo. São Paulo: Elsevier; 2013. p. 111.
- Fehrenbach MJ. Anatomia, histologia e embriologia dos dentes e estruturas orofaciais. Rio de Janeiro: Elsevier; 2012. p. 145-9.

Correspondence

Rubianne Ligório de Lima
Rua Alberto Potier, 50/33 - Boa Vista
CEP 82560-480 - Curitiba (PR), Brazil
Tel: +55 (41) 9941-6723
E-mail: rubillima@hotmail.com

Author information

RLL - MD from Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR).
CPS - DDS from Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG); MD
from Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR); MSc in
Surgery from Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR).
KCS - MD from Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-
PR); Resident of Otorhinolaryngology at Hospital Santa Casa de
Misericórdia de Curitiba.
MB - Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR).
RMS - MD from Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR);
Board certification student of Otorhinolaryngology at Hospital da
Cruz Vermelha de Curitiba.

Author contributions

Conception and design: RLL, CPS, MB, RMS
Analysis and interpretation: RLL, CPS, KCS, RMS
Data collection: RLL
Writing the article: RLL, CPS, RMS
Critical revision of the article: RLL, CPS, MB
Final approval of the article*: RLL, CPS, KCS, MB, RMS
Statistical analysis: RLL, CPS
Overall responsibility: RLL

*All authors have read and approved of the final version of the
article submitted to J Vasc Bras.