

# **AValiação DO POTENCIAL INFLAMATÓRIO DE SUBSTÂNCIA HEMOSTÁTICA A BASE DE GELATINA LIOFILIZADA EM RELAÇÃO AO ESTRESSE OXIDATIVO**

Sarah Keiko Martinelli Hossokava<sup>1</sup>; Katia Cristina Ugolini Mugnolo<sup>2</sup>; Alberto Martins de Jesus<sup>3</sup>

Estudante do Curso de Odontologia; e-mail: sarah\_kmh@hotmail.com<sup>1</sup>  
Professora da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: katiac@umc.br<sup>2</sup>  
Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: albertojesus@umc.br<sup>3</sup>

Área de Conhecimento: Ciências Biológicas/Ciências da Saúde/Odontologia.

Palavras-chave: Hemorragia; Agentes Hemostáticos; Estresse Oxidativo; Reparação Tecidual.

## **INTRODUÇÃO**

O processo de hemostasia envolve numerosos eventos fisiológicos, sendo assim bastante complexo (PRADO, et al. 2014). O sangramento transoperatório prolonga os processos cirúrgicos e, quando não tratado de forma correta, pode conduzir à complicações secundárias (LEWIS, et al. 2013). Um estudo feito por Blinder, (1999), concluiu que as extrações dentárias em pacientes que fazem uso de anticoagulante oral podem ser tratadas sem a interrupção ou diminuição do tratamento. O uso de hemostático local com esponja e sutura parece ser suficiente. A esponja de gelatina liofilizada é um opcional dentre os agentes hemostáticos disponíveis no mercado sendo utilizada em prática de hemostasia das feridas cirúrgicas pós-exodônticas (SANT'ANNA, 2006). Esta é um produto de origem animal que promove uma barreira mecânica para hemorragia servindo como esqueleto onde as plaquetas se aderem simulando um processo de coagulação normal. A gelatina se adequa ao tamanho da ferida e se expande, reduzindo o fluxo sanguíneo, promovendo o tamponamento efetivo da lesão e a formação do coágulo estável. Após a aplicação, a gelatina é absorvida de quatro a seis semanas (PRADO, et al. 2014). Um dos produtos empregados na rotina odontológica que contém a gelatina liofilizada é o Hemospon®. É de origem porcina, indicado pelo fabricante para cirurgias orais pelo potencial hemostático e cicatrizante (GABRIELLI, et al. 2008). As esponjas a base de gelatina são insolúveis em água e biologicamente reabsorvíveis. A sua função é restringir a hemorragia dos vasos sanguíneos, cuja homeostase não foi obtida. Um grande número de estudos demonstrou que este material, inicialmente, provoca uma resposta inflamatória sem efeitos colaterais ao longo prazo sobre a formação óssea se for completamente removido. Segundo esses estudos, se os agentes hemostáticos são inadvertidamente deixados no local cirúrgico, podem induzir um processo inflamatório e afetar a reparação dos tecidos (ROSLINDO, et al. 2007). É necessário conhecer o processo de reparação alveolar nas mais diversas situações e a atenção deve ser grande quanto aos fatores que podem retardar esse reparo (MENEZES JÚNIOR, et al. 2009). Um dos fatores potencialmente envolvidos é a geração de radicais livres, espécies pró-inflamatórias que podem promover inflamação e retardar o processo reparativo tecidual. Esses são gerados em um cenário de oxido-redução. Lesões teciduais associadas a sangramentos, também podem liberar Hemoglobina (Hb) e ferro, favorecendo reações oxidorredutoras. A membrana é um dos mais atingidos pela ação das ERMO (Espécies Reativas do Metabolismo do Oxigênio) em decorrência da peroxidação de lipídeos (FERREIRA, A. L. A., MATSUBARA, L.

S., 1997). A ação dos radicais livres é reconhecidamente um fator indutor de processo inflamatório. Na prática clínica, observamos que o uso de alguns agentes hemostáticos promovem um retardo na reparação tecidual que pode estar associado a processo inflamatório induzido por geração de radicais livres. Face a esta observação, justifica-se este estudo que tem por objetivo geral verificar utilizando sistemas modelo de membrana biológica se um dos agentes hemostáticos utilizados, o baseado em gelatina liofilizada, promove a geração de espécies radicalares que induzam a peroxidação lipídica.

## **OBJETIVO**

**Objetivo Geral:** Avaliar o potencial inflamatório de agente hemostático à base de colágeno hidrolisado via determinação de sua capacidade lipoperoxidativa. **Objetivos Específicos:** Avaliar o efeito do agente hemostático à base de esponja de colágeno hidrolisado (gelatina) liofilizada na geração de radicais livres empregando sistemas biomiméticos de membrana; Demonstrar o potencial lipoperoxidativo da saliva sobre sistema biomimético de membrana.

## **METODOLOGIA**

Para o desenvolvimento do trabalho foram utilizados reagentes de qualidade analítica, de alto grau de pureza e procedência certificada disponíveis no Centro Interdisciplinar de Investigação Bioquímica – CIIB da Universidade de Mogi das Cruzes. Para o estudo utilizamos como hemostático o Hemospon, agente à base de colágeno liofilizado (gelatina), comercializado em lojas especializadas do ramo odontológico. O sistema biomimético criado para o teste de lipoperoxidação foi construído utilizando cardiolipina (Sigma), lipídio que predomina nas membranas biológicas. A geração de radicais livres e seus efeitos sobre lipídios foram determinados via quantificação de compostos derivados do ácido tiobarbitúrico (TBARS). Foram construídos lipossomos constituídos de cardiolipina a 1 mM em tampão fosfato de sódio 5 mM pH 7,4, na proporção que mimetiza a membrana mitocondrial interna, alvo preferencial de espécies radicalares. Foi empregado protocolo já estabelecido e disponível no Centro Interdisciplinar de Investigação Bioquímica – CIIB, onde os experimentos foram conduzidos. A formação de malondialdeído (MDA) decorrente da lipoperoxidação induzida pelo agente hemostático testado foi avaliado pelo protocolo de TBARS (Thiobarbituric acid-reactive substances) de Buege e Aust (BUEGE, 1978) com pequenas modificações. A expressão e análise dos resultados foram realizados utilizando software Origin 6.1 da Microcal. O teste utilizado foi o de lipoperoxidação, onde filme de cardiolipina foi reconstituído com tampão fosfato de sódio 5 mM pH 7,4 para concentração final a 1 mM dos lipossomos e mantido em sonificador por 30 minutos para que lipossomos fossem sendo formados por desprendimento da bicamada lipídica aderida à parede do tubo de vidro. O Hemospon foi previamente preparado por imersão da esponja contendo o colágeno liofilizado em solução tampão por 2 horas, sendo um dos tubos contendo este preparado mantido à temperatura ambiente e outro em banho-maria a 37°C. Após este tempo, de cada um dos tubos a solução tampão, agora contendo o colágeno desprendido da esponja, foi retirada e então a solução adicionada aos tubos de teste. Foram colocados 75 µL de lipossomos em cada tubo de teste, em seguida adicionada cada uma das amostras em volume suficiente para as concentrações desejadas e adicionado tampão fosfato de sódio 5 mM pH 7,4 para igualar o volume. Os tubos foram mantidos em banho maria a 37°C por 30 minutos. Foi adicionado 75µL de TBA 1% em NAOH 50 mM e levado ao vórtex para sua homogeneização. Em seguida adicionado 7,5 µL de NAOH 10M e 37,5 µL de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 20% e novamente

homogeneizado com o auxílio do vórtex. Após a segunda homogeneização, os tubos foram mantidos em banho maria a 85°C por 20 minutos e na sequência mantidos à temperatura ambiente até o resfriamento. Foram adicionados 1000µL de n-butanol a cada tubo sendo depois centrifugado a 1000xg por 2 a 3 minutos (à temperatura ambiente). A leitura de absorvância foi feita em 532 nm utilizando espectrofotômetro Shimadzu Multispec 1501.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os experimentos de lipoperoxidação foram conduzidos colocando-se lipossomos de cardioplipina a 1 mM em tampão fosfato de sódio 5 mM pH 7,4, preparados conforme técnica descrita anteriormente no item metodologia, em contato com diferentes concentrações do hemostático à base de colágeno liofilizado.

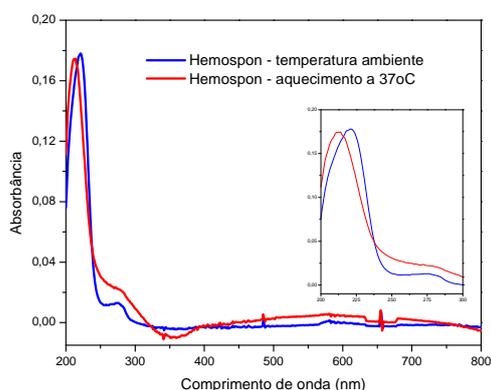


Fig. 1

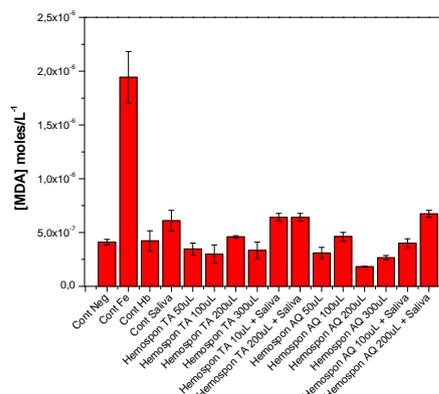


Fig. 2

**Figura 1** – Análise espectroscópica do Hemospon preparado por contato da esponja com tampão fosfato de sódio 5 mM pH 7,4 por 2 horas, sendo o traçado azul referente à amostra mantida em repouso à temperatura ambiente e o vermelho à amostra aquecida a 37°C. O inserto do gráfico mostra com mais detalhes as alterações espectrais.

**Figura 2** – Teste de lipoperoxidação utilizando diferentes amostras em contato com 1 mM de lipossomos de cardioplipina em tampão fosfato de sódio 5 mM pH 7,4 por 2 horas.

Os resultados apresentados nos gráficos demonstram que o Hemospon, na forma com que utilizados e sobre o sistema modelo de membrana escolhido não é um potencial gerador de espécies radiculares capazes de induzir a oxidação lipídica. Não há bases na literatura suficientes para a discussão especificamente da ação dos agentes hemostáticos testados como potenciais geradores de espécies radiculares, porém em testes realizados como parte de outro projeto, ainda em curso, constatou-se que outros agentes hemostáticos promovem peroxidação lipídica concentração dependente sobre o mesmo sistema modelo de membrana aqui empregado.

## CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstram que o Hemospon não tem potencial pró-oxidante sobre lipossomos de cardioplipina, não sendo possível, portanto, associá-lo a processos inflamatórios e retardo no processo de reparo tecidual observado in vivo, por uma via relacionada a estresse oxidativo. Trata-se, entretanto, de um estudo preliminar, cuja continuidade pode demonstrar que este agente hemostático tem como efeito secundário a ativação de processo inflamatório por outra via, lembrando-se, entretanto, que a indução deste processo não é, necessariamente, desfavorável ao reparo tecidual e não torna o produto inadequado ao uso a que se propõe.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

BLINDER, Daniele; MANOR, Yifat; MARTINOWITZ, Uri; TAICHER, Shlomo. Dental extractions in patients maintained on continue oral anticoagulant: Comparasion of local hemostatic modalities. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology**, v.88, p. 137-40, August 1999.

DO PRADO, Tales Dias; RIBEIRO, Rejane Guerra; DAMASCENO, Adilson Donizete; DE NARDIL, Andriago Braboza. Hemostasia e procedimentos anti-hemorrágicos. **Agrarian Academy, Centro Científico Conhecer**, Goiânia, v.1, n. 01, p. 210, 2014.

FERREIRA ALA, MATSUBARA LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista de Associação Médica Brasileira**, Botucatu, v.43, n. 1, p. 61-8, 1999.

GABRIELLI, Marisa Aparecida Cabrini; VIEIRA, Eduardo Hochuli; PALEARI, André Gustavo; CERRI, Paulo Sérgio; KLUPPEL, Leandro Eduardo. Avaliação histológica de agentes hemostáticos implantados em mandíbulas de coelhos. **Revista de Cirurgia e Traumatologia Buco Maxilo Facial**, Camaragibe, v. 9, n. 2, p. 97-106, abr./jun. 2009.

LEWIS, K. M., et al. Comparasion of regenerated and non-regenerated oxidized cellulose hemostatic agents. **European Surgery**, v.45, p. 213–220, July 2013.

MENEZES JÚNIOR, Laerte R.; GAUJAC, Cristiano; TRENTO, Cleverson L. Influência das alterações locais sobre o processo de reparo alveolar. **Revista Saúde e Pesquisa**, v.2, n. 3, p. 411-416, set./dez. 2009.

SANT'ANNA, Alexandre José. **Estudo histológico comparativo da influência dos hemostáticos Hemospon e Hemostop sobre o processo de reparo alveolar em ratos após exodontia**. 2006. 79 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Odontológica) – Universidade de Marília (UNIMAR), Faculdade de Ciências da Saúde, Marília, 2006.

ROSLINDO, Eleny Balducci; VIOLA, Naiana Viana; GASPARG, Ana Maria Minarelli. Effects of fibrina sealer and resorbable gelatin on the repair of osseous defects in rat tibia. **Brazilian Oral Research**, Araraquara, v. 21, n. 3, p. 222-7, 2007.