

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, picrossirius 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, picrossirius, 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 amidalectomia 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 antissepsia 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 picrosírius, 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 picrosírius avaliou o colágeno através da birrefringência 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).

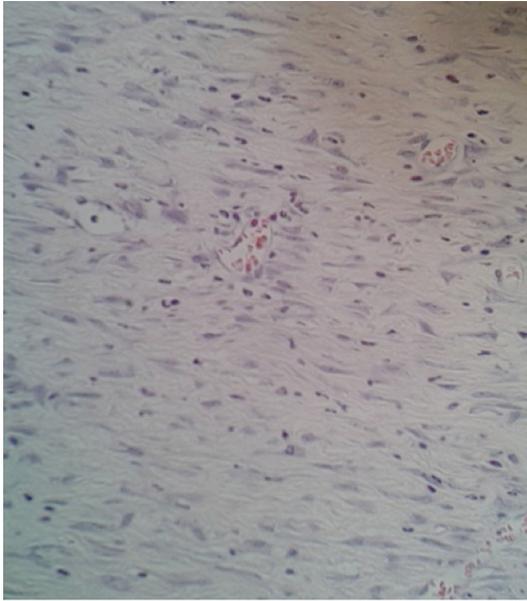


Figura 1. Coloração hematoxilina eosina no grupo-controle/ subgrupo 14 dias.

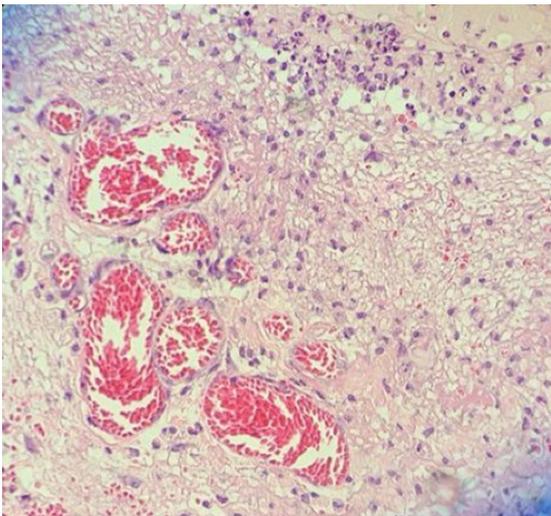


Figura 2. Coloração hematoxilina eosina no grupo experimental/ subgrupo 14 dias.

Avaliação do colágeno através da coloração picrosírius

A avaliação do colágeno tipo I foi feita entre os grupos experimental e controle, bem como intragrupos, 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).

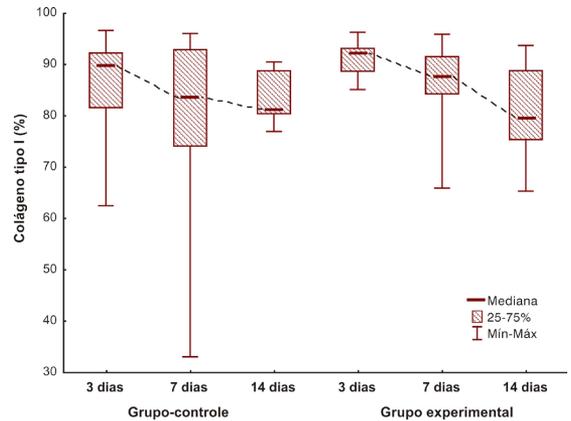


Figura 3. Comparação dos grupos com relação ao colágeno maduro.

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

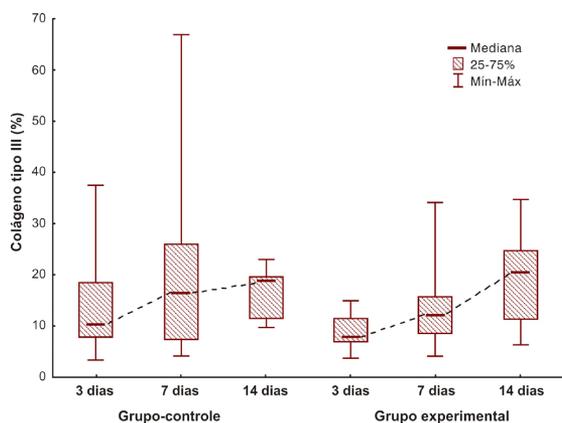


Figura 4. Comparação dos grupos com relação ao colágeno imaturo.

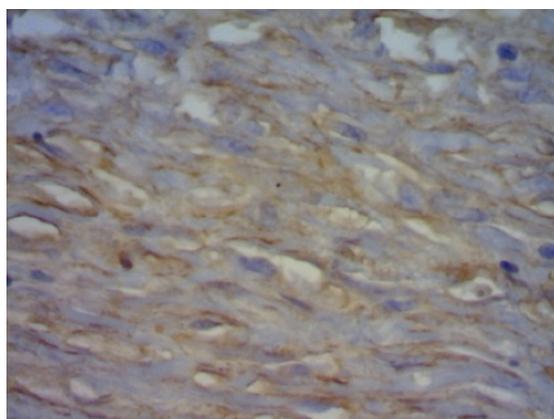


Figura 7. Imuno-histoquímica no grupo-controle/subgrupo 14 dias.

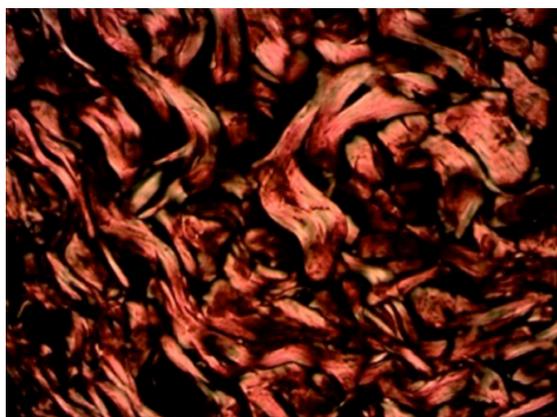


Figura 5. Coloração picrosirius no grupo-controle/subgrupo 14 dias.

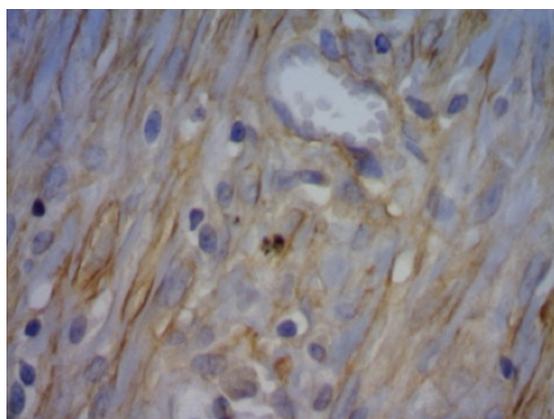


Figura 8. Imuno-histoquímica no grupo experimental/subgrupo 14 dias.

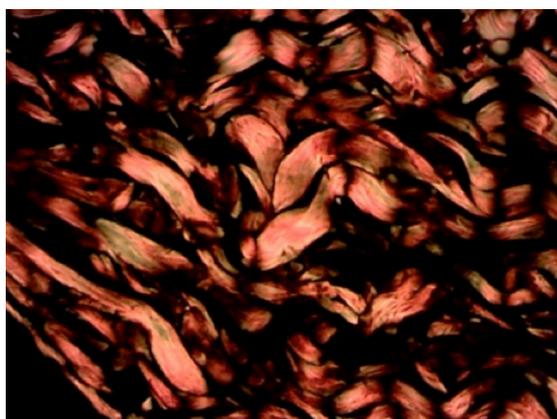


Figura 6. Coloração picrosirius no grupo experimental/subgrupo 14 dias.

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

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 comparamos 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 hepatectomias 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, conseqüentemente, 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 picrossirius, 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

1. Brasileiro HM, Lee IW, Rapoport A. Uso do subgalato de bismuto como agente hemostático em tonsilectomia palatina: estudo de 201 casos. São Paulo: Atha; 2006. p. 181-5. ACTA ORL/Técnicas em Otorrinolaringologia.
2. Kim SH, Grein RL, Tramontina VA. Aplicação do subgalato de bismuto em cirurgia periodontal. JBC J Bras Odontol Clin. 1997;1(1):31-4.
3. Pillar RS, Brito EO. Aplicação do subnitrito de bismuto e do subgalato nas amigdalectomias. Arq Otorrinolaringol. 2003;7(1):28-31.
4. 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 Oril Mex. 2012;57(2):65-8.
5. Simões MJ, Cabral AC, Boyaciyen 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.
6. 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>.
7. 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.
8. 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>.
9. Arroyo PC Jr, Silva RCMA, Santi D No, Santana D Jr, Ferreira FD, Silva RF. Uso do subgalato de bismuto para hemostasia local em hepatectomias parciais em ratos. Rev Col Bras Cir. 2004;31(3):165-71. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-69912004000300005>.
10. 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.biblioteca digital.unicamp.br/document/?code=vtls000118398>
11. 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 miofibroblastos. In: Anais do 43º Congresso Brasileiro de Otorrinolaringologia; 2013; São Paulo. São Paulo: Elsevier; 2013. p. 111.
12. 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.