

JACKSON BRANDÃO LOPES

Prevenção de aderências pericárdicas  
pós-operatórias com uso de fator de crescimento  
de queratinócitos e carboximetilquitosana

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade  
de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em  
Ciências.

Área de Concentração: Cirurgia Torácica e Cardiovascular  
Orientador: Prof. Dr. Luís Alberto Oliveira Dallan

São Paulo

2008

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Lopes, Jackson Brandão

Prevenção de aderências pericárdicas pós-operatórias com uso de fator de crescimento de queratinócitos e carboximetilquitosana / Jackson Brandão Lopes. -- São Paulo, 2008.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.  
Departamento de Cardio-Pneumologia.

Área de concentração: Cirurgia Torácica e Cardiovascular.

Orientador: Luís Alberto Oliveira Dallan.

Descritores: 1.Aderências/prevenção & controle 2.Pericárdio 3.Animais  
4.Quitosana 5.Distribuição aleatória 6.Suínos 7.Fatores de crescimento de fibroblastos 8.Ceratinócitos

USP/FM/SBD-044/08

## DEDICATÓRIA

À minha avó Maria Amália dos Santos e à minha mãe Maria Luiza Brandão de Souza, matriarcas de uma modesta família, que objetivamente amputaram seus sonhos e desejos materiais para assegurar-nos um bem inestimável: o direito a uma boa educação.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por ter me dado o dom da vida e criado um mundo cheio de mistérios para que possamos tentar descobri-los no desejo de ajudar no bem-estar da humanidade..

À minha mãe, Maria Luiza Brandão de Souza, e ao meu pai, Onajar Andrade Lopes, pelos dons que herdei.

Ao Professor Dr. Luís Alberto Oliveira Dallan, por ter acreditado nas minhas idéias e por ter proporcionado a oportunidade para que eu pudesse dar mais um passo importante na minha vida. Eterna gratidão à confiança, depositada em mim, pelos ensinamentos, que se iniciaram na época da residência médica e que se perduram inabaláveis até os dias de hoje.

À Cláudia Fajkarz, que sempre vibrou com minhas idéias, e me apoiou nos momentos mais difíceis deste projeto através do seu carinho, amor e criatividade excepcionais.

À Iracema Brandão , minha tia, pela ajuda, em vários momentos da minha vida, que indubitavelmente contribuíram para este feito.

À mestra Célia Kruse, pela contribuição na revisão da tradução do artigo científico ,originado dessa Tese, a ser publicado em língua inglesa.

À Izabel Almeida e Mary Brandão, pela presença constante na minha vida.

Ao Professor Reinaldo Santos Leal, meu Mentor. Agradeço a este homem, que me pegou pela mão e me ensinou a dar os primeiros passos na Medicina. Além disso foi quem plantou a primeira semente deste trabalho em mim.

Ao Professor Mário Castro Carreiro, por incentivar-me ao desenvolvimento de pesquisas em cirurgia experimental.

À Universidade de São Paulo, por me acolher dentro do seu corpo discente desde 1999.

Ao Doutores Luiz Augusto Lisboa e Euclides Marques, pelo auxílio na elaboração deste projeto.

Aos Professores Doutores Aldo Junqueira Rodrigues Jr., Dário Birolini, Renato Sérgio Poggetti, Edvaldo Massazo Utyama, Belchor Fontes, Ruy Geraldo Bevilacqua, Angelita Harb-Gama, Fábio Pinatel Lopasso, Joaquim José Gama-Rodrigues, Marcel Cerqueira Cesar Machado, pelos ensinamentos em Cirurgia Geral e do Trauma.

Aos Professores Doutores Noedir Antonio Groppo Stolf, Luiz Boro Puig, Sérgio Almeida de Oliveira, Altamiro Ribeiro Dias; Miguel Barbero-Marcial, Pablo Alberto Maria Pomerantzeff, Marcelo Biscegli Jatene, Fábio Biscegli Jatene, Luis Felipe Pinho Moreira, Paulo Manoel Pêgo-Fernandes, Renato Samy Assad, Pedro

Carlos Piantino Lemos, Roberto Costa e os demais Cirurgiões Assistentes da divisão de Cirurgia Cardiovascular do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, e ao Professor José Ernesto Succi e ao Cirurgião Cardiovascular Renato Bauab Dauar, pelos ensinamentos que contribuíram para da minha formação cirúrgica.

Aos Doutores Paulo Sampaio Gutierrez e Luciano de Figueiredo Borges, pela orientação, na análise histopatológica, durante este projeto. Agradeço, também, a Doutora Nadia Vieira Sambiase e a Sra. Solange A. Consorti, dentre outros membros do Serviço de Patologia do Instituto do Coração da Universidade de São Paulo, pela colaboração.

Ao Departamento de Cardiopneumologia e suas funcionárias: Neusa Rodrigues Dini, Juliana Lattari Sobrinho e Eva M. Guiss de Oliveira.

À Usinas Siderúrgicas de Minas Gerais S/A e os seus dirigentes: Dr. Rinaldo Campos Soares – Presidente do Sistema Usiminas; Ronaldo Monteiro de Souza – Diretor Executivo da Fundação São Francisco Xavier (FSFX); Professor José Carlos de Carvalho Gallinari – Diretor do Hospital Márcio Cunha e Kleber Barbosa Carneiro – Gerente da Superintendência de Transferência de Tecnologia; por colaborarem no desenvolvimento desta pesquisa científica.

Ao Departamento de Físico-Química do Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, representado na figura do Professor Dr. Sérgio Paulo Campana Filho e dos seus assessores, pela colaboração científica na análise da carboximetilquitosana.

Ao Professor José Jerônimo de Moraes, pela minuciosa revisão gramatical e ortográfica a que foi submetida esta tese.

À Faculdade de Medicina do Vale do Aço e a seu Diretor Carlos Haroldo Piancastelli, por ceder o Laboratório de Técnica Operatória para os experimentos cirúrgicos e por incentivar o desenvolvimento da Iniciação Científica para os alunos da graduação.

À Flávia Luana Barbosa Rodrigues e Pedro de Castro Mendes, acadêmicos de medicina e meus alunos de Iniciação Científica, pela dedicação e esforço despendidos durante a execução deste trabalho.

À Diva Maria Almeida Oliveira, médica veterinária, pelo carinho, amor, dedicação e muito suor despendidos para o bem-estar dos animais utilizados neste trabalho.

À Darcy Maria Botelho, técnica responsável pelo Laboratório de Técnica Operatória da Faculdade de Medicina do Vale do Aço, pelo empenho, garra e amizade.

Ao Cleisson Pereira da Costa, pela ajuda na manutenção da plena atividade do Laboratório de Técnica Operatória da Faculdade de Medicina do Vale do Aço.

Aos tratadores Géssimo Geronimo da Silva e Edir Alves da Silva, pelo cuidado e dedicação aos animais.

À Gisele Boy Bicalho Rossi e Draumira Bicalho Rossi, pelo desprendimento material ao ceder, sem ônus, o local para manutenção dos animais, apenas por acreditarem que a ciência é uma arte que precisa ser incentivada.

Ao Laboratório Cristália, pela doação dos agentes anestésicos injetáveis.

Aos colegas de trabalho Petrônio Generoso Thomaz, Telço Tinelli, Luiz Renato Dias Daroz e outros, pela compreensão durante os momentos que estive ausente me dedicando a esta pesquisa.

À Taís Saraceno, que me apoiou e incentivou a iniciar esta jornada.

À Carlos Eduardo Tossuniam, Daniel Ruy Moreira, Daniel Macedo Brandão, Elida Carolina Furtado de Oliveira, Janaína Leite, Junaura Rocha Barreto, Karina da Silva Oliveira e Marcus Murilo Carneiro Tavares, pela amizade reconfortante.

Ao médico Raul Moraes da Franca Filho e os técnicos do Laboratório de Anato-mo-Patologia do Hospital Márcio Cunha: Franciene Oliveira Almeida, Sandra Cristina de Paula Ferreira e Sônia Ferreira Rocha.

À enfermeira Luciane Barbosa Pires de Almeida, supervisora da central de materiais esterilizados do Hospital Márcio Cunha, e ao técnico de enfermagem Paulo Joberto Patrício, pela colaboração na esterilização da carboximetilquitosana.

Aos funcionários do departamento de compras do Hospital Márcio Cunha: Joaquim de Castro Barroso, Adriana Leite Chaves e Luceni Vilela Teixeira; pelo auxílio na importação do fator de crescimento de queratinócitos.

Ao médico Salomão Maciel Dias Ferreira e aos Farmacêuticos Bioquímicos Lilian Akemi Pessoa Mitsunaga, Luiz Henrique Furbino DE Britto e Nislene Freire, pela receptividade e colaboração, quando foi necessário o uso do Laboratório Central do Hospital Márcio Cunha.

## EPÍGRAFE

“Palavras são símbolos: o melhor que elas podem fazer  
são se aproximar do que nós queremos dizer”

*Nigel Watts*

Esta tese está de acordo com:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors*  
(Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e  
Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias.*

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F.  
Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. São  
Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2004

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in  
Index Medicus*

## SUMÁRIO

Início

Sumário

Lista de abreviaturas

Lista de símbolos

Lista de tabelas

Lista de ilustrações

Resumo

Abstract

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	5
<b>3. OBJETIVO</b> .....	18
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	19
<b>4.1. Animais</b> .....	19
<b>4.2. Locais da pesquisa</b> .....	20
<b>4.3. Carboximetilquitosana</b> .....	20
<b>4.4. Fator de crescimento de queratinócitos</b> .....	21
<b>4.5. Preparo das soluções utilizadas no experimento</b> .....	22
<b>4.6. Experimento animal</b> .....	23
<b>4.7. Sacrifício</b> .....	25
<b>4.8. Estudo anatomopatológico</b> .....	28
<b>4.8.1. Avaliação morfométrica</b> .....	29
<b>4.9 Análise estatística</b> .....	33
<b>4.9.1. Análise descritiva</b> .....	33

<b>4.9.2. Análise comparativa</b> .....	33
<b>4.10. Análise de risco</b> .....	34
<b>5. RESULTADOS</b> .....	35
<b>5.1 Análise da carboximetilquitosana</b> .....	35
<b>5.1.1. Mensuração do potencial hidrogeniônico (pH)</b> .....	35
<b>5.1.2. Análise termogravimétrica</b> .....	35
<b>5.1.3. Espectroscopia de ressonância nuclear de hidrogênio (<sup>1</sup>H RMN)</b> .....	38
<b>5.1.4. Espectroscopia de infravermelho</b> .....	40
<b>5.2. Complicações pós-operatórias</b> .....	40
<b>5.3. Análise macroscópica</b> .....	42
<b>5.3.1. Parede anterior e sutura na aorta</b> .....	42
<b>5.3.2. Parede lateral</b> .....	49
<b>5.3.3. Parede inferior e sutura no átrio direito</b> .....	49
<b>5.3.4. Linha de sutura</b> .....	49
<b>5.4. Avaliação quantitativa do uso de dissecação cruenta</b> .....	50
<b>5.5. Avaliação do tempo de dissecação</b> .....	50
<b>5.6. Análise morfométrica das lâminas histológicas</b> .....	54
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	59
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	72
<b>8. REFERÊNCIAS</b> .....	74

**Apêndice**

## LISTA DE ABREVIATURAS

AA	área de aderência
bFGF-2	fator de crescimento fibroblástico básico
CMQ	carboximetilquitosana
CMQEst	carboximetilquitosana esterelizada
CMQNEst	carboximetilquitosana não esterelizada
D.A.	artéria descendente anterior
FGF-7	fator de crescimento fibroblástico-7
HGF	fator de crescimento de hepatócitos
KGF	fator de crescimento de queratinócitos
NS	sem significância estatística
PBS	solução de tampão fosfato
PTFE	poli(tetrafluoretileno)
PVC	poli(cloreto de vinila)
r-KGF	fator de crescimento de queratinócitos recombinante
VD	ventrículo direito
VE	ventrículo esquerdo
VS	versus

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\mu$	micrômetro
cm	centímetros
kD	kilodalton ( $1,66 \times 10^{-21}$ gramas)
kg	quilo
mg	miligrama
min.	minuto
ml	mililitros
ng	nanograma
°C	graus Célsius
$p$	probabilidade de erro alfa ou tipo I
pH	potencial hidrogeniônico
ppm	parte por milhão
$r^2$	coeficiente de determinação
seg.	segundos
v/v	volume do soluto / volume da solução
$\mu\text{g}$	micrograma

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sistema de classificação das aderências.....	27
Tabela 2 - Análise termogravimétrica. Variação da massa da amostra em função da temperatura .....	36
Tabela 3 - Classificação macroscópica das aderências.....	43
Tabela 4 - Avaliação cumulativa das aderências nos segmentos de análise macroscópica (Escore Total).....	43
Tabela 5 - Análise comparativa múltipla entre os grupos baseada no Escore Total .....	45
Tabela 6 - Medidas morfométricas do pericárdio parietal obtidas através do analisador de imagens (QUANTIMET). Coloração de Sirius Red .....	56
Tabela 7 - Medidas morfométricas da aderência obtidas através do analisador de imagens (QUANTIMET). Coloração de Sirius Red .....	57
Tabela 8 - Medidas morfométricas do epicárdio obtidas através do analisador de imagens (QUANTIMET). Coloração de Sirius Red .....	57

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Diagrama dos possíveis mecanismos de regeneração mesotelial .....	7
Figura 2 – Representação esquemática das unidades repetidas de carboximetilquitosana.....	12
Figura 3 – Representação esquemática das unidades repetitivas de quitina e ácido hialurônico.....	13
Figura 4 – Representação esquemática das unidades repetitivas de quitosana e heparina .....	17
Figura 5 – Área do pericárdio parietal .....	30
Figura 6 – Área da aderência.....	30
Figura 7 – Área do epicárdio .....	31
Figura 8 – Área de colágeno no pericárdio parietal.....	31
Figura 9 – Área de colágeno na aderência.....	32
Figura 10 – Área de colágeno no epicárdio .....	32
Figura 11 – Curvas termogravimétricas de CMQEst e CMQNEst .....	37
Figura 12 – Espectros <sup>1</sup> H RMN de CMQEst e CMQNEst capturados a partir de soluções das amostras em D <sub>2</sub> O/HCl (100/1 v/v) e adquiridos a 80°C. ....	39
Figura 13 – Espectros de CMQEst e CMQNEst na região de infravermelho .....	41
Figura 14 – Intensidade das aderências avaliada pelo Escore Total .....	44
Figura 15 – Comparação do Escore Total. Grupo Controle vs KGF+CMQ.....	46
Figura 16 – Comparação do Escore Total. Grupo Controle vs KGF.. ....	46

Figura 17 – Comparação do Escore Total. Grupo Controle vs CMQ. ....	47
Figura 18 – Comparação do Escore Total. Grupo KGF+CMQ vs KGF.. ....	47
Figura 19 – Comparação do Escore Total. Grupo KGF+CMQ vs CMQ. ....	48
Figura 20 – Avaliação quantitativa do uso de dissecação cruenta.....	51
Figura 21 – Correlação exponencial entre o escore total e a quantidade de dissecação cruenta. ....	52
Figura 22 – Análise do tempo de dissecação das aderências.....	53
Figura 23 – Correlação exponencial entre o escore total e o tempo de dissecação. ...	55

## RESUMO

Lopes JB. Prevenção de aderências pericárdicas pós-operatórias com uso de fator de crescimento de queratinócitos e carboximetilquitosana [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007. 82p.

**INTRODUÇÃO:** A lesão mesotelial é o fator central na formação da aderências. A proliferação destas células já foi obtida, in vitro, com o uso do fator de crescimento de queratinócitos (KGF). Neste estudo, investigamos a influência da associação do KGF com a carboximetilquitosana (CMQ) na redução das aderências pericárdicas. **MÉTODOS:** Em 24 porcos aplicou-se um modelo de indução de aderências pericárdicas. Seguindo a randomização, foram administradas as seguintes soluções no pericárdio: KGF, KGF+CMQ, CMQ e NaCl 0,9%. Após 8 semanas, as aderências foram analisadas através de um escore de severidade, do tempo e da quantidade de instrumentação cruenta necessários para liberação do coração das estruturas adjacente. Análises histomorfométricas foram realizadas em fragmento, de biópsia, do pericárdio, da aderência e epicárdio. **RESULTADOS:** Os escores de severidade, nos grupos de CONTROLE, CMQ, KGF e KGF+CMQ, expressos em mediana [min.–máx.], foram 17[15–18]; 12[9-14] ( $p>0,05$ ); 11,5[9-12] ( $0,01<p<0,05$ ) e 7[6-9] ( $p<0,01$ ), respectivamente. Todos os grupos de tratamento reduziram o tempo de dissecação ( $p<0,001$ ) e a quantidade de dissecação cruenta ( $p<0,001$ ). A proporção de colágeno na aderência foi menor no grupo KGF+CMQ ( $p<0,05$ ). **CONCLUSÕES:** A associação do KGF com a CMQ resulta num efeito sinérgico, que reduz, de forma altamente significativa, a intensidade das aderências pericárdicas pós-operatórias.

**Descritores:** 1.ADERÊNCIAS/prevenção & controle/ 2. PERICÁRDIO/ 3. ANIMAIS/ 4. QUITOSANA/ 5. DISTRIBUIÇÃO ALEATÓRIA/ 6. SUÍNOS/ 7. FATOR DE CRESCIMENTO 7 DE FIBROBLASTO

## ABSTRACT

Lopes JB. Reducing postsurgical pericardial adhesions with keratinocyte growth factor and carboxymethylchitosan [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007. 82p.

**INTRODUCTION:** Mesothelial injury is the pivot on the development of adhesions. An increase in the proliferation of mesothelial cells was verified through in vitro studies with the use of keratinocyte growth factor (KGF). This study investigated the influence of KGF associated with carboxymethylchitosan (CMQ) in the reduction of pericardial adhesions. **METHODS:** An induction model of pericardial adhesion was carried out in 24 pigs. Animals were randomly allocated to receive topical application of KGF, KGF+CMQ, CMQ and saline (control). After 8 weeks, the adhesions were evaluated by applying a severity score, measuring the dissection time and the amount of sharp instrument used during the heart dissection from surround structures. Histo-morphometric analysis was performed in a biopsy fragment, containing the pericardium, the adhesion and the epicardium. **RESULTS:** The severity scores in the groups of CONTROL, CMQ, KGF e KGF+CMQ, expressed in median[*min. – max.*] values, were 17[15–18]; 12[9-14] ( $p > 0.05$ ); 11.5[9-12] ( $0.01 < p < 0.05$ ) and 7[6-9] ( $p < 0.01$ ), respectively. In all treatment groups, the dissection time ( $p < 0.001$ ) was reduced and the amount of sharp dissection, necessary to free the heart, was lower ( $p < 0.001$ ). In the adhesion segment, a decreased collagen proportion was found in KGF+CMQ group ( $p < 0.05$ ). **CONCLUSIONS:** The use of KGF associated with CMQ result in a synergic action that decreases, in a highly significant way, the severity of the postoperative adhesions.

**Keywords:** 1.ADHESIONS/prevention & control/ 2.\*PERICARDIUM/ 3.ANIMALS/ 4.\*CHITOSAN/ 5.RANDOM ALLOCATION/ 6.SWINE/ 7.FIBROBLAST GROWTH FACTOR 7

## 1 INTRODUÇÃO

As aderências pericárdicas são formadas entre o epicárdio, o pericárdio parietal, a pleura e o esterno após intervenções cirúrgicas sobre o coração e os grandes vasos. Elas dificultam futuras abordagens, e adicionam maior morbidade e mortalidade às reoperações <sup>1</sup>.

Reoperações são freqüentes na atualidade e representam de 10 a 20% das operações cardíacas <sup>2, 3</sup>. Brandão <sup>4</sup> relatou que as reoperações compreenderam 22,8% das cirurgias valvares no período entre 1980 e 1999 no Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

As aderências tornam os procedimentos cirúrgicos mais demorados <sup>5</sup> e aumentam o risco das reoperações <sup>6, 7</sup>. Lesões do ventrículo direito, da artéria interventricular anterior, dos enxertos vasculares têm sido descritas em até 6% dos casos <sup>2, 3, 8</sup>. As iatrogenias podem levar a complicações graves. A mortalidade pode alcançar até 50% quando a lesão intra-operatória causa hemorragia maciça ou quando existe lesão de enxertos vasculares <sup>2, 9, 10</sup>.

Além dos inconvenientes intra-operatórios, as aderências pericárdicas levam à alteração da função do ventrículo direito <sup>3, 11</sup> e à redução da integridade dos enxertos aorto-coronarianos <sup>12, 13</sup>.

As aderências são formadas após a agressão física e/ou química da camada de células mesoteliais do pericárdio, criando neste uma superfície desnuda e fisiologicamente danificada <sup>14</sup>. A fibrina acumulada nesta área

forma conexões entre as superfícies cruentas das lâminas parietal e visceral do pericárdio. Estas ligações de fibrina são denominadas de bandas aderentes. No decorrer do processo de reparo tecidual estas bandas sofrem infiltração de fibroblastos, deposição de colágeno e neovascularização. Este processo resulta em aderências firmes e de difícil manipulação <sup>3</sup>.

O sítio mais empregado para o estudo sobre aderências pós-operatórias é o peritônio. A maioria dos conceitos foram testados inicialmente no abdome devido à simplicidade na abordagem dessa cavidade e à possibilidade de utilização de animais de pequeno porte, como o rato, para esses experimentos. Essa facilidade técnica permitiu que muitas teorias fossem testadas somente na cavidade peritoneal <sup>15-20</sup>. Comparativamente ao peritônio, é inexpressivo o número de trabalhos publicados onde o local de abordagem foram o pericárdio ou a pleura.

Muitos já foram os métodos testados para reduzir as aderências: membranas autólogas <sup>21</sup> e heterólogas <sup>22</sup> para substituir o pericárdio lesado; agentes anti-inflamatórios <sup>1</sup> e anti-histamínicos <sup>23</sup> para reduzir a atividade inflamatória exacerbada; agentes fibrinolíticos <sup>24</sup> com a finalidade de degradar a fibrina. Apenas após a utilização dos polímeros sintéticos ou dos biopolímeros é que os resultados se tornaram mais consistentes e reprodutivos. Estes polímeros funcionam como um método de barreira diminuindo o contato entre o pericárdio visceral e parietal e impedem a formação de pontes de fibrina entre as duas membranas <sup>2, 5, 25-28</sup>.

Objetivamente todos os métodos tentam reduzir a quantidade de pontes de fibrina impedindo assim, a união do pericárdio parietal com o

visceral nos primeiros 5 a 7 dias de reparo. É neste período que as áreas danificadas estarão sendo recobertas por novas células mesoteliais<sup>29, 30</sup> e estarão recuperando as suas propriedades funcionais.

O avanço atual da biologia celular e molecular está possibilitando, cada vez mais, controlar o desenvolvimento e a reprodução celular com o uso de citocinas<sup>31</sup>. Em 1996 Pierro<sup>32</sup>, trabalhando com ovários de coelhas, demonstrou que é possível aumentar a velocidade de proliferação das células mesoteliais. Esta possibilidade ainda não foi utilizada com o intuito de reconstituir mais rapidamente a integridade morfo-funcional da membrana pericárdica, assim recuperando sua capacidade fibrinolítica com maior brevidade e, possivelmente, diminuindo a intensidade das aderências pós-operatórias.

Um aumento na velocidade da proliferação das células mesoteliais foi conseguido com o uso de alguns fatores de crescimento, como: fator de crescimento de queratinócitos (KGF) e fator de crescimento de hepatócitos (HGF)<sup>33</sup>.

Diante da possibilidade de acelerar o crescimento das células mesoteliais, assim recuperando mais rapidamente a função fibrinolítica do pericárdio, surge a hipótese do uso do KFG como agente redutor das adesões pericárdicas.

Os resultados dos estudos prévios contudo, sugerem que qualquer método somente atingirá sua máxima efetividade, se o contato entre as superfícies cruentas for impedido enquanto elas ainda permanecerem

desnudas de seu mesotélio <sup>25, 26</sup>. Para isso ocorrer, uma barreira adequada deve ser interposta durante este período.

A carboximetilquitosana (CMQ) parece se adequar muito bem como método de barreira <sup>34, 35</sup>, a ser combinado com um fator modulador da proliferação mesotelial. A CMQ apresenta as vantagens de ser biodegradável, atóxica, hidrossolúvel em pH fisiológico; germicida; possuir alta massa molar; o que lhe permite persistir, no local aplicado, por 4 a 7 dias e ser degradada através da ação hidrolítica da lisozima, o que não desperta reação inflamatória durante o processo <sup>36, 37</sup>.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

O saco pericárdico é formado pela reflexão da serosa cardíaca sobre ela mesma. Isto cria um espaço quase virtual, chamado de cavidade pericárdica, que é delimitada pelas lâminas visceral e parietal <sup>38</sup>.

A membrana parietal é formada por três camadas: a primeira e mais interna é composta por uma única camada de células mesoteliais e sua membrana basal; a segunda é uma camada fibrosa composta de tecido conectivo com fibras colágenas de disposição compactada; e a terceira é conhecida como epipericárdica e contém tecido conectivo não compactado, adipócitos, elementos neurais, linfócitos, histiócitos e mastócitos <sup>39</sup>.

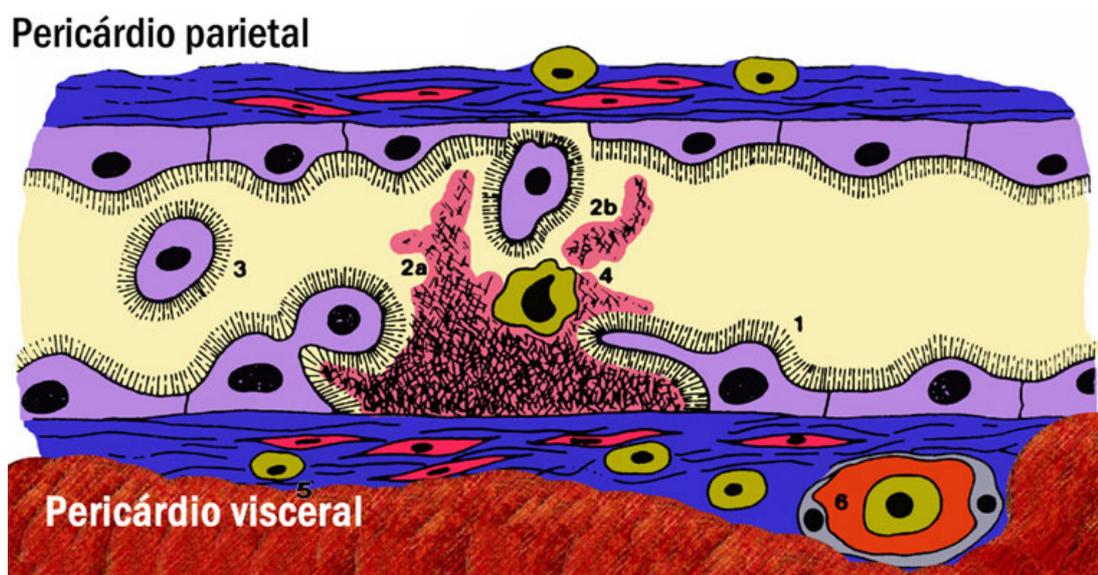
O pericárdio visceral é composto de uma camada de células mesoteliais, sustentada por tecido conjuntivo frouxo. As características estruturais do mesotélio epicárdico são semelhantes às do mesotélio do pericárdio parietal. A camada submesotelial contém tecido neural, vasos sanguíneos e linfáticos, além de fibras elásticas e colágenas, dispostas de forma variada. Uma camada de adipócitos, variável em espessura, pode ser encontrada separando o mesotélio do miocárdio <sup>40</sup>.

O pericárdio apresenta, além das suas funções anatômicas de barreira mecânica, uma atividade fisiológica significativa. Ele é responsável pela produção e transporte dos líquidos e das macromoléculas <sup>41</sup> que compõem o humor pericárdico. Têm sido bem descritas também certas funções exercidas pelas células mesoteliais, como as de produção de citocinas <sup>31</sup>, de apresentação antigênica <sup>42</sup> e da fibrinólise <sup>14, 43</sup>.

Dúvidas ainda existem sobre como acontece a regeneração do pericárdio, peritônio e pleuras. Em 1919 Hertzler, apud Mutsaers <sup>30</sup>, notou que defeitos de tamanhos diversos cicatrizavam no mesmo tempo. Johnson (1962), apud Holtz <sup>29</sup>, sugeriu que macrófagos presentes no líquido pericárdico pudessem se fixar nas áreas desnudas e posteriormente se transformarem nas células mesoteliais. Este conceito não mais prevalece nos dias de hoje. Raftery (1973), apud Holtz <sup>29</sup>, encontrou indícios de que as células mesoteliais poderiam surgir de células do tecido conectivo submesotelial e, posteriormente, sofrerem metaplasia. Recentemente, dois conceitos bem bastante aceitos são os de que as células mesoteliais se deslocam, em grupamentos, de regiões íntegras para repovoar as áreas desnudas, e se proliferam através do processo de divisão celular <sup>30</sup> (Figura 1). Devido a esta característica, o reparo do pericárdio não ocorre exclusivamente da periferia para o centro da lesão.

Devido às aderências geradas no processo de reparo tecidual do pericárdio, inúmeros estudos vêm pesquisando meios para preveni-las.

Entre estes substitutos estão os polímeros sintéticos. O politetrafluoretileno (PTFE) foi clinicamente utilizado como substituto pericárdico. Em 2002, Ozeren <sup>44</sup> publicou uma casuística de 7 pacientes reoperados, que fizeram uso de membrana de PTFE para fechamento do pericárdio. Neste trabalho foi evidenciada a formação de uma intensa membrana fibrosa que obscurecia o epicárdio e dificultava a dissecação do coração. Nesta mesma publicação o autor relata uma incidência de acidentes de aproximadamente 50%.



**Figura 1.** Diagrama dos possíveis mecanismos de regeneração mesotelial. (1) migração centrípeta das células mesoteliais; (2) migração de células mesoteliais maduras ou em proliferação de sítio (a) adjacente ou (b) distantes; (3) reserva de células pré-existentes no líquido pericárdico; (4) transformação de macrófagos residentes em células mesoteliais; (5) metaplasia de precursores mesenquimatosos submesotelial; e (6) células progenitoras da medula óssea circulante.

Autorizada a reconfiguração e reprodução por Mutsaers SE.  
Arte gráfica por Claudia Fajkarz.

Em 2003 um grupo da Universidade de Kyushu <sup>45</sup> testou em animais uma membrana sintética composta por três camadas: uma interna, de poliéster, interposta entre duas externas de silicone-uretano. Esta membrana apresentou um menor nível de aderências, em relação à membrana de PTFE, utilizada como controle.

O silicone, também, já foi utilizado. Na tentativa de reduzir a deposição de proteínas e plaquetas, Amanpour <sup>46</sup> aplicou ao silicone um tratamento com laser de CO<sub>2</sub> para diminuir a tensão superficial. Este estudo experimental foi concluído em 2004, referindo resultados satisfatórios, mas ainda não existe relato da sua aplicação clínica. Uma maior tendência a infecções, relacionadas ao uso de materiais não absorvíveis, é o maior questionamento aplicado a este método de barreira.

Vários biopolímeros têm sido testados na prevenção das aderências pericárdicas. Estes compostos químicos são sintetizados por seres vivos e participam da estrutura e do funcionamento da matéria viva. São, na sua maioria, elementos formados principalmente por átomos de carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio. Ou seja, as proteínas, glicídios, DNA são considerados como biopolímeros.

Teoricamente, o biopolímero ideal para utilização na prevenção das adesões deve contar com características bioquímicas que lhe permitam ser biocompatível, bioreabsorvível e atóxico <sup>47-49</sup>. A abundância, na natureza, a fácil extração e conservação, e a capacidade de permanecer na cavidade desejada por no mínimo de 5 dias são detalhes decisivos.

Nesse caminho, Robison<sup>26</sup> testou, no pericárdio, o dextran 70, que é um polissacarídeo de alta massa molar e que tem como uma das suas propriedades a inibição da agregação plaquetária. Apesar de resultados satisfatórios neste estudo experimental, nenhum ensaio clínico surgiu na literatura utilizando esta substância no pericárdio. Em 2007, a Biblioteca Cochrane publicou uma revisão sistemática de que não foram encontradas evidências de benefício do uso do dextran 70 na prevenção de aderências peritoneais<sup>50</sup>.

Duncan<sup>2</sup> descreveu uma redução significativa na severidade das aderências com o uso de outro polímero hidrofílico, a polivinilpirrolidona. Entretanto, o autor questionou-se sobre os efeitos desta substância a longo prazo, quando utilizada por via parenteral. Novos estudos não surgiram após esta publicação para definir melhor este último, aspecto ou corroborar os resultados relatados.

Um hidrogel tendo como base o poli(etileno glicol), utilizado primariamente como selante para anastomoses vasculares e que é reabsorvido dentro de aproximadamente 4 semanas, foi utilizado por Bennett<sup>6</sup> em animais para verificar a redução de aderências pericárdicas. Este estudo explorou exatamente o conceito da separação mecânica temporária entre o pericárdio visceral e o parietal, criado pela interposição de um polímero biodegradável, e encontrou uma redução estatisticamente significativa na incidência das adesões. Marc Hendrikx<sup>51</sup> avaliou experimentalmente na cavidade pericárdica o CoSeal®, uma composição farmacêutica de dois polímeros do poli(etileno glicol), e encontrou diferença

significativa entre o grupo de tratamento e o grupo de controle. Clinicamente, ainda não foram encontradas evidências conclusivas sobre a sua utilização na prevenção de aderências pós-operatórias <sup>50</sup>.

A carboximetilcelulose, um derivado hidrossolúvel da celulose, e o hialuronato sódico, uma glicosamina constitucional humana, foram testados por Seeger <sup>5</sup> em animais. Este autor demonstrou haver melhores resultados com a utilização do hialuronato, do que com a carboximetilcelulose. Contudo, esta última apresentou melhores resultados que o grupo controle. A inconveniência da utilização do ácido hialurônico é a dificuldade de sua obtenção e conseqüente custo.

Mitchell <sup>52, 53</sup>, em dois trabalhos experimentais, demonstrou a eficácia do ácido hialurônico na redução das aderências pericárdicas.

Alguns biopolímeros também têm sido testados em forma de filme, como a polilactida <sup>54</sup>. Em 2006, Tsukihara <sup>55</sup> utilizou uma membrana composta por três camadas (colágeno + ácido hialurônico) e evidenciou uma redução nas aderências. Contudo, o autor não realizou o protocolo de indução de aderências habitualmente utilizado na literatura. Este fato criou uma grande dificuldade na comparação destes resultados com os publicados anteriormente sobre o mesmo tema.

Não há dúvida que os biopolímeros são, contemporaneamente, os agentes de primeira linha para prevenção das aderências pós-operatórias.

Os novos estudos, agora, tentam identificar qual é o biopolímero mais efetivo e em que estado físico-químico deve ser utilizado, além de avaliar métodos combinados de terapêutica <sup>24, 56</sup>.

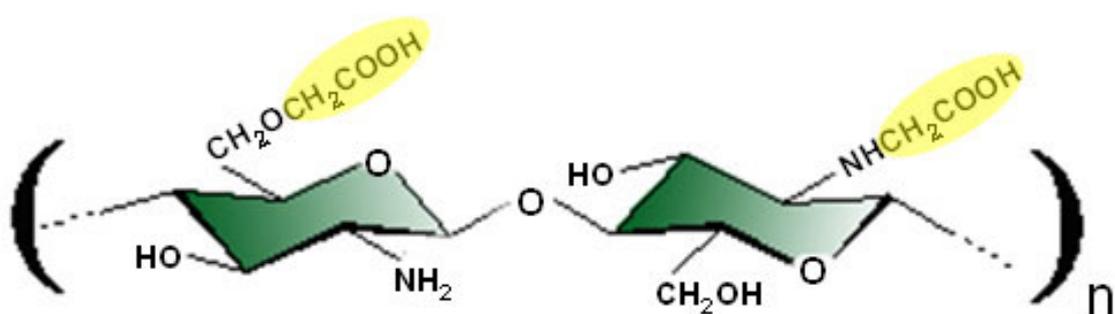
A carboximetilquitosana (Figura 2), um biopolímero hidrossolúvel, parece ser promissora, por possuir inúmeras das características que são importantes para o uso na área biomédica como: bioreabsorvível, atóxica, baixa imunogênicidade, apirética, germicida <sup>49, 57-60</sup>. Krause TJ <sup>61</sup>, em 2001, descreveu, pela primeira vez, o uso deste derivado da quitosana na prevenção das aderências pericárdicas.

A quitosana é um derivado deacetilado da quitina. Esta, por sua vez, é um polissacarídeo abundante na natureza, e é parte integrante dos tecidos de sustentação de crustáceos, insetos e fungos. Diferente do seu derivado, a quitina não é hidrossolúvel e necessita, para sua solubilização, de outros solventes, como: ácido clorídrico, ácido sulfúrico, N,N-dimetilacetamida/LiCl. Esta característica química dificulta o uso da quitina em algumas áreas, tais como a biológica e de alimentos <sup>37, 62</sup>.

A quitina e a quitosana são formadas pelas moléculas dos açúcares glicosamina e acetilglicosamina. A glicosamina existe como metabólito natural nos animais vertebrados e está presente de forma significativa na matriz extracelular do tecido conjuntivo, compondo o que denominamos de glicosaminoglicanos e proteoglicanos <sup>37, 63</sup>. Participa, também, da formação do exoesqueleto dos crustáceos, artrópodes e alguns fungos.

A presença da acetilglicosamina e outras glicopiranoses confere uma semelhança na estrutura primária do ácido hialurônico e da quitosana (Figura 3) que pode estar relacionada com o compartilhamento de algumas propriedades físico-químicas e biológicas <sup>36</sup> destes mucopolissacarídeos, como a capacidade na redução das aderências pós-cirúrgicas <sup>61</sup>.

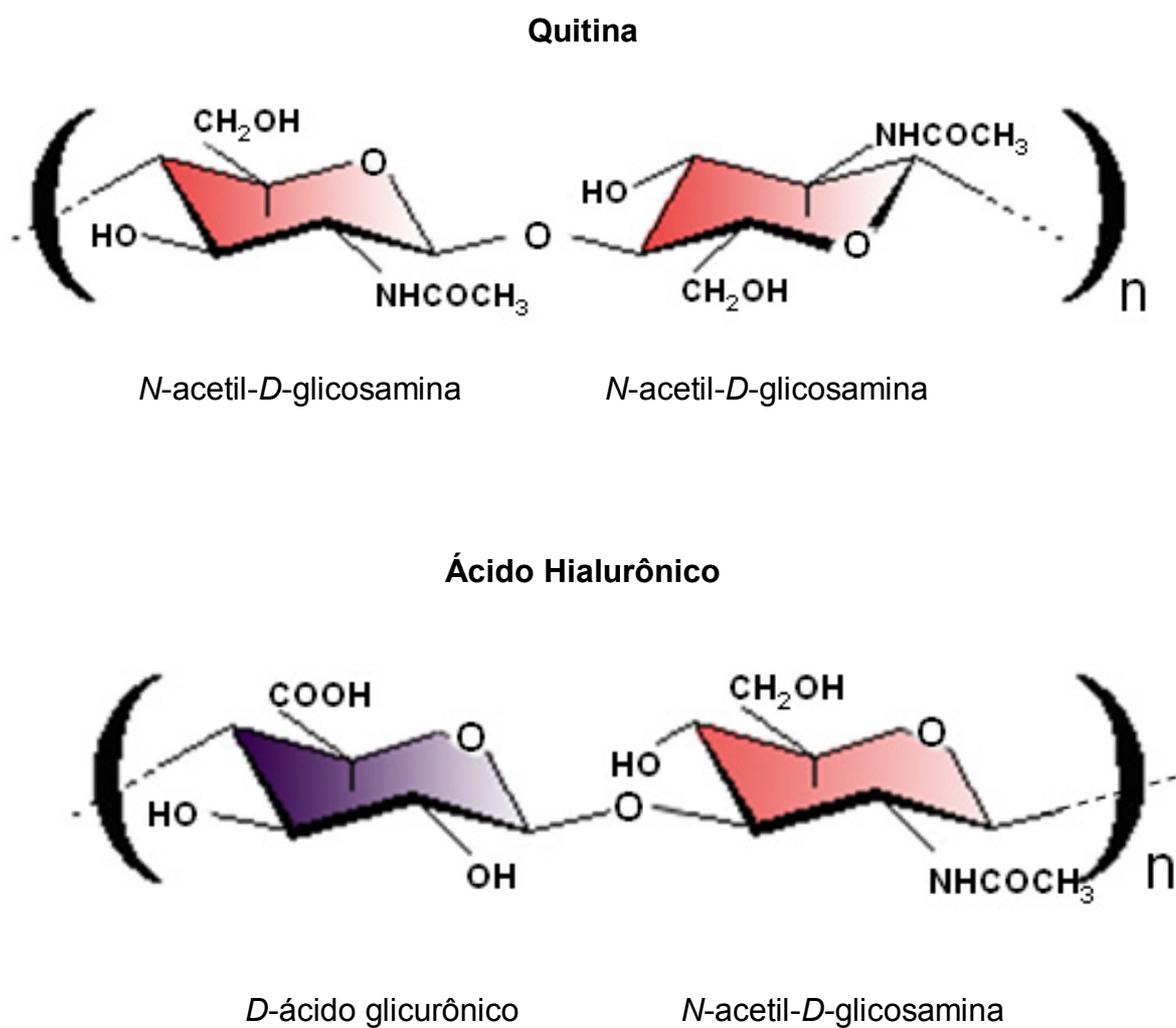
**O,N-carboximetilquitosana**



O-carboximetil-*D*-glicosamina

*N*-carboximetil-*D*-glicosamina

**Figura 2.** Representação esquemática das unidades repetitivas de carboximetilquitosana.



**Figura 3.** Representação esquemática das unidades repetitivas de quitina e ácido hialurônico.

Algumas propriedades biológicas da quitosana impulsionaram sua utilização como biopolímero. As atividades anti-bacterianas e anti-fúngicas favorecem a sua utilização em atividades cirúrgicas. Esta propriedade germicida da quitosana foi demonstrada em um amplo espectro de microorganismos, incluindo *Escherichia Coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* <sup>37, 59, 60</sup>. Foi também demonstrado que a massa molar tem influência nesta propriedade. O mecanismo suposto de ação é o bloqueio da nutrição dos germes secundário à barreira criada pela quitosana no exterior da parede bacteriana<sup>37</sup>.

Por sua elevada massa molar e por ser caracterizada como um polímero hidrodispersível <sup>64</sup>, a quitosana e seus derivados têm sido amplamente empregados em associação com outros fármacos, para liberação sustentada e prolongada destes <sup>57, 65-67</sup>. Esse efeito também tem sido evidenciado com macromoléculas, como a enzima L-asparaginase que é utilizada no tratamento da leucemia linfoblástica aguda <sup>49</sup>. Recentemente, alguns artigos relatam efeito semelhante para com alguns membros da família dos fatores de crescimento ligados a heparina – *heparin-binding growth factors* (HBGF) <sup>57, 68, 69</sup>, sugerindo que na associação da quitosana ou de outros glicosaminoglicanos com estes fatores possam surgir efeitos positivos.

Um dos constituintes da família dos HBGF é o fator de crescimento de queratinócitos (KGF), também conhecido como fator de crescimento fibroblástico-7 (FGF-7). Originalmente este fator foi identificado em cultura

de fibroblastos pulmonares <sup>70</sup>, e a transcrição do seu gene gerou uma cadeia polipeptídica de 24 kD <sup>71</sup>, contendo 194 aminoácidos <sup>72</sup>.

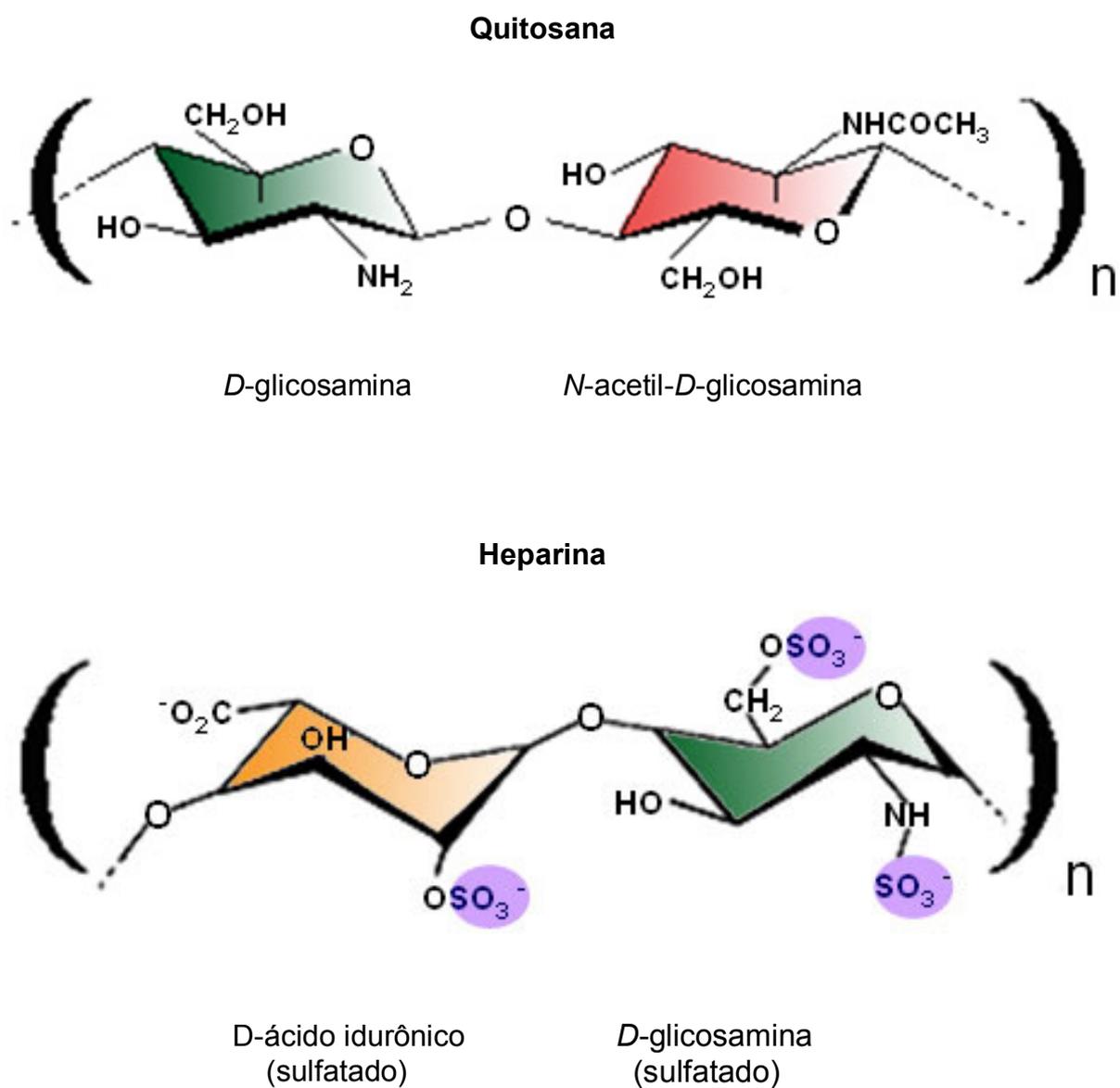
O KGF é conhecido pela sua ação sobre as células de tecidos de linhagem ectodérmica, como a epiderme, glândula mamária, endométrio, epitélio gastrintestinal e respiratório, vesícula seminal e próstata <sup>73</sup>. O KGF/FGF-7 também se mostrou efetivo no aumento da proliferação mesotelial <sup>33</sup>. Adamson<sup>33</sup> demonstrou esta atividade nas doses de 5,15 e 30 ng/ml, e constatou que este efeito é dose-dependente.

Alguns indícios sugerem que a utilização do KGF pode-se dar de forma cruzada entre espécies. No estudo de Adamson<sup>33</sup>, realizado em ratos, o autor não descreveu de qual espécie é derivado o KGF, mas pode-se inferir, pela procedência da substância, que o fator foi recombinante humano ou bovino, já que a R&D Systems, empresa fornecedora da substância, somente comercializa fator de crescimento de queratinócitos dessas duas espécies. Existe um outro estudo que demonstra a atividade do r-KGF humano em porcos <sup>74</sup>, reafirmando a atividade cruzada desse fator, entre espécies de mamíferos.

A instabilidade do KGF é outro assunto que vem sendo estudado <sup>75-78</sup>. Esta labilidade é compartilhada com outros fatores de crescimento dessa família, *heparin-binding growth factors*, como o fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF-2). A heparina vem demonstrando ser papel importante para estabilização do bFGF-2 <sup>79, 80</sup>. Tem-se atribuído este efeito à neutralização de segmentos com cargas positivas, dentro da cadeia peptídica dos HBGFs <sup>76</sup>. Masuoka demonstrou que a quitosana tem também

a capacidade de estabilizar o bFGF-2 e de reduzir sua degradação <sup>81</sup>. Essa função estabilizadora parece estar ligada à similaridade da estrutura primária da heparina e da quitosana (Figura 4).

Devido a bFGF-2 ter sua estabilidade aumentada através da interação com a heparina ou com a quitosana, e partilhar com o KGF das mesmas peculiaridades nas cargas elétricas <sup>76</sup>, existe uma grande probabilidade que a associação da quitosana com o KGF possa diminuir a sua labilidade. Outro dado que corrobora com essa hipótese é o fato de que o dermatan sulfato, uma glicosaminoglicana semelhante na estrutura primária com à heparina e à quitosana, é capaz de estabilizar e potencializar o KGF <sup>82</sup>.



**Figura 4.** Representação esquemática das unidades repetitivas de quitosana e heparina.

### **3. OBJETIVO**

Avaliar a eficácia da associação do fator de crescimento de queratinócitos com a carboximetilquitosana na redução das aderências pericárdicas.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Foram utilizados 24 porcos, da raça Large White, machos, orquiectomizados, com pesos entre 15 e 20 kg, provenientes de uma mesma suinocultura na região do Vale do Aço-MG.

Os animais foram tratados e operados de acordo com os princípios éticos na experimentação animal estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, e com os conceitos do *NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals* publicado em 1996.

Previamente às intervenções cirúrgicas, os suínos foram submetidos a 12 horas de jejum.

Os animais foram alocados em quatro grupos através de uma randomização estratificada gerada pelo programa SISA (Simple Interactive Statistical Analysis)\*.

No grupo controle foi utilizado o NaCl a 0,9% na intenção de avaliar sua influência na formação das aderências pericárdicas. Os outros grupos foram compostos de: um grupo que recebeu carboximetilquitosana isoladamente (CMQ), outro que recebeu fator de crescimento de queratinócitos isoladamente (KGF) e um terceiro grupo recebeu uma associação de fator de crescimento de queratinócitos com carboximetilquitosana (KGF+CMQ).

---

\*em <http://home.clara.net/sisa/order.htm>

## **4.2 Locais da pesquisa**

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Técnica Operatória da Faculdade de Medicina do Vale do Aço/Ipatinga-MG.

O pós-operatório (PO) dos animais se iniciou no laboratório onde ocorreu a recuperação anestésica, a retirada da cânula orotraqueal e do dreno pleural. Após esta fase inicial os porcos foram transferidos para a clínica veterinária e ficaram isolados até o 5º dia de pós-operatório, quando, então, foram liberados para a convivência em bando.

Após o sacrifício, os corpos dos animais foram encaminhados para o aterro sanitário da empresa Queiroz-Galvão em Santana do Paraíso-MG.

A análise histopatológica da aderência foi realizada no Laboratório de Anatomia Patológica do InCor - FMUSP.

A amostra de carboximetilquitosana foi analisada por meio de colaboração científica com o Departamento de Físico-Química do Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.

## **4.3 Carboximetilquitosana**

Uma quantidade de 500 g de carboximetilquitosana com 63% de acetilação foi adquirida da Dayang Chemicals CO./China na forma de pó. A substância foi dividida em alíquotas de 4 g e submetida a esterilização em autoclave da marca BAUMER. O processo consistiu em 5 min. de pré-vácuo, 9 min. de aquecimento até 134 °C, 15 min. de esterilização com calor úmido,

na pressão de 2,1 kgf/cm<sup>2</sup>, e posterior secagem por 10 min. com calor seco na mesma temperatura.

A carboximetilquitosana, esterilizada e não esterilizada, foram submetidas a análises físico-químicas:

- mensuração do potencial hidrogeniônico;
- análises termogravimétricas;
- espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (<sup>1</sup>H RMN);
- espectroscopia no infravermelho.

Os processos seguiram os métodos descritos nos estudos realizados por Campana-Filho e cols.<sup>62, 83</sup>.

Um gel de carboximetilquitosana a 4% foi preparado através da dissolução da carboximetilquitosana estéril em água bidestilada estéril. Este gel foi mantido em agitador rotacional, em temperatura de 25 °C, durante 24 horas.

#### **4.4 Fator de crescimento de queratinócitos**

O KGF foi adquirido da Sigma-Aldrich Corporation/Estados Unidos da América e foi armazenado a uma temperatura de -20 °C até a sua reconstituição. A preparação do KGF recombinante humano se deu através da dissolução do preparado liofilizado, contendo 10 µg, com solução de tampão fosfato (PBS) filtrada através de membrana com porosidade de 0,2 µ. Alíquotas de 3 ml contendo 111 ng/ml foram separadas e armazenadas a -20 °C.

#### 4.5 Preparo das soluções utilizadas no experimento

No preparo das amostras foram utilizadas, além da CMQ e do KGF , solução de cloreto de sódio a 0,9% estéril (Halex Istar Farmacêutica/Brasil) e água bidestilada estéril (Fresenius Kabi/Brasil).

As amostras utilizadas em cada grupo foram preparadas como se segue abaixo:

- Controle: foi utilizado 15 ml de NaCl a 0,9%.
- KGF+CMQ: no momento da utilização, a alíquota de KGF a ser utilizada foi trazida a temperatura ambiente e dissolvido em 12 ml do gel de carboximetilquitosana a 4%, constituindo-se uma nova preparação (15 ml) contendo 22 ng/ml de KGF + carboximetilquitosana a 3,2% (KGF+CMQ).
- KGF: no momento da utilização a alíquota de KGF a ser utilizada foi trazida a temperatura ambiente e dissolvida em 12 ml de água bidestilada, constituindo-se uma nova solução contendo 22 ng/ml de KGF.
- CMQ: no momento da utilização 12 ml do gel de carboximetilquitosana a 4% foi dissolvido com 3 ml de água bidestilada, constituindo-se uma nova preparação contendo carboximetilquitosana a 3,2%.

#### 4.6 Experimento animal

Os porcos foram pré-medicados com quetamina (10 mg/kg) e atropina (0,05 mg/kg). Receberam, por via intramuscular, em dose preconizada para o peso, uma solução veterinária contendo benzilpenicilina potássica, benzilpenicilina procaína, penicilina benzatina e estreptomicina. Foi puncionada uma veia marginal na face dorsal do pavilhão auricular do animal e instalada uma linha venosa para hidratação e administração de medicamentos. Os animais foram posicionados em decúbito dorsal e monitorizados com eletrocardiografia contínua. A anestesia geral foi induzida com tiopental sódico (10mg/kg). Através de laringoscopia direta a fenda glótica foi visibilizada e anestesiada com lidocaína spray a 10% para evitar laringo-espasmo. Após o posicionamento da cânula orotraqueal o animal foi conectado ao dispositivo de ventilação mecânica (CALGIMED – ANTARES), que foi programado para oferecer um volume corrente de 10ml/kg e fração inspirada de oxigênio de 100%. A manutenção da anestesia foi feita com isoflurano 0,5-2%, fentanil (0,05 µg/kg) e tiopental.

O suíno foi reposicionado para decúbito lateral esquerdo e o hemitorax direito tricotomizado.

Após antissepsia com clorexedina degermante a 4% e clorexedina alcoólica a 2%, a região operatória foi delimitada com campos estéreis.

Após toracotomia ântero-lateral direita, o pericárdio foi identificado e aberto anteriormente ao nervo frênico. Seis pontos, de algodão 2-0, foram

aplicados nas bordas da incisão do pericárdio para melhor exposição da cavidade pericárdica.

Uma sutura em bolsa foi realizada na aurícula direita, no átrio direito próximo à veia cava inferior e na aorta ascendente; em todas as suturas foi utilizado fio de poliéster 2-0. O epicárdio e a superfície interna do pericárdio parietal foram submetidos a abrasão mecânica, através de 10 movimentos consecutivos nas seguintes regiões do coração: átrio direito; faces anterior e inferior do ventrículo direito (VD); e faces anterior, lateral e inferior do ventrículo esquerdo (VE). O agente abrasivo consistiu-se numa lixa d'água (NORTON/ADALOX® T 223), com granulometria 280, montada sobre a extremidade de uma espátula de madeira com área de 1,5 x 1,0cm. O conjunto lixa-espátula foi previamente montado e levado à autoclave para esterilização.

Vinte centímetros cúbicos de sangue autólogo, adquiridos através de punção da aurícula direita, foram aplicados na cavidade pericárdica permanecendo nesta durante 30 minutos sendo, então, posteriormente aspirados.

Um cateter multi-fenestrado de PVC foi implantado, por contra-abertura, na cavidade pericárdica e posicionado de modo que os orifícios estivessem em contato com as superfícies de todas as faces do coração.

O pericárdio foi fechado mediante uma linha de sutura única, em chuleio contínuo, com fio de polipropileno 4-0.

Antes do fechamento da toracotomia as soluções foram injetadas pelo cateter, de acordo com a randomização. Ao final da administração das

substâncias o cateter foi retirado e seu orifício suturado de forma que não houvesse escape significativo da solução aplicada. O hemitórax direito foi drenado a dois espaços intercostais abaixo da incisão, com um dreno tubular de diâmetro de 18 French, e conectado a um dispositivo de selo d'água. As atelectasias foram desfeitas através da insuflação manual dos pulmões. O espaço intercostal utilizado foi aproximado com 3 fios de algodão 2. A musculatura seccionada foi suturada com fio de Catgut cromado 0. A pele foi fechada com sutura intradérmica de fio de nylon 2.0.

O animal foi identificado e o plano anestésico superficializado até que ocorresse o despertar e em seguida foi realizada a retirada da cânula orotraqueal. O dreno torácico foi sacado após 20 min da cessação da saída de bolhas de ar no selo d'água.

O animal foi alimentado 6 horas após o fim do procedimento e recebeu doses intermitentes de morfina intramuscular como analgésico.

#### **4.7 Sacrifício**

O sacrifício ocorreu após 8 semanas do experimento. A abordagem anestésica foi idêntica ao experimento excetuando-se a administração dos antibióticos.

Em decúbito dorsal os animais foram tricotomizados. Procedeu-se a anti-sepsia da pele com solução de clorexedina alcoólica a 2% e delimitação do campo cirúrgico, com panos estéreis, para a toracotomia mediana.

As aderências existentes foram classificadas de acordo com a sua intensidade, através de critérios já utilizados por outros autores<sup>24, 45, 55, 56</sup> (Tabela 1). Os locais para análise macroscópica foram: (I) face anterior do VD e VE, (II) face lateral do VE, (III) face inferior do VD e VE, (IV) linha de sutura do fechamento do pericárdio, (V) sutura inferior no átrio e (VI) sutura na aorta.

Um escore de severidade, denominado escore total, foi calculado somando-se o escore de cada segmento analisado.

O tempo, desde a abertura do pericárdio até o fim da lise das aderências foi contado em cronômetro digital.

Duas câmeras foram posicionadas, para gravação das imagens e posterior quantificação do número absoluto de vezes que foi utilizado um instrumento cortante na lise das aderências. A primeira câmera (*webcam* - ELGIN CVC 2300) foi posicionada perpendicularmente ao tórax do animal adquirindo as imagens no sentido antero-posterior. A segunda câmera digital (FUJI FINEPIX S9600) foi colocada na porção mais caudal da mesa cirúrgica, apoiada em um tripé, de modo a obter as imagens do tórax no sentido caudo-cranial.

Após a lise das aderências, o sacrifício do animal era realizado com a administração de tiopental sódico, na dose já descrita, seguido de 20 ml de cloreto de potássio 19,1% em bolus.

**Tabela 1.** Sistema de classificação das aderências.

<b>Escore de aderência</b>	<b>Características</b>
<b>0</b>	Sem aderências.
<b>I</b>	Aderências frouxas: são facilmente desfeitas com dissecação romba, têm um plano espumoso característico entre as superfícies e apresentam pouco sangramento.
<b>II</b>	Aderências intermediárias: são desfeitas com dissecação romba mais agressiva ou com utilização de pouca dissecação cortante, têm um plano identificável entre as superfícies e resulta em sangramento moderado.
<b>III</b>	Aderências firmes: só se desfazem com dissecação cortante, não têm um plano bem definido entre as superfícies e que sangram facilmente.

O coração e o pericárdio eram retirados em bloco. Em local separado foi obtido um segmento, onde as aderências não foram desfeitas, localizado entre a sutura em bolsa da região inferior no átrio, e a sutura em bolsa do apêndice auricular. As estruturas da biópsia representam, do exterior para o interior, o pericárdio parietal, a aderência e a parede do átrio direito. Esse fragmento foi fixado em solução tamponada de formol a 10%, durante 48 horas.

#### **4.8 Estudo anatomopatológico**

Após processamento histológico habitual, foram confeccionados os blocos de parafina contendo o fragmento da biópsia. Posteriormente, dois cortes de 5  $\mu$  de espessura foram obtidos e corados com hematoxilina/eosina e Sirius Red<sup>84, 85</sup>.

As lâminas foram recodificadas de maneira que o observador não reconhecesse o grupo ao qual o animal pertencia a fim de evitar *bias* durante a análise.

A coloração com hematoxilina/eosina foi utilizada para uma visibilização geral do tecido. Os fragmentos corados com o Sirius Red foram utilizados para análise morfométrica semi-quantitativa. Avaliaram-se as lâminas através de microscopia óptica, utilizando-se uma objetiva com capacidade de magnificação de 5x. As imagens foram digitalizadas, em uma resolução de 768 x 576 (vertical x horizontal) pixels, com uma câmera de vídeo digital (JVC KY-F55B, JAPÃO) conectada ao microscópio. O tamanho

do pixel, foi convertido em micrômetros e a análise da imagem foi realizada empregando-se um software (Quantimet-Leica, Leica Cambridge Ltd., Cambridge, Reino Unido).

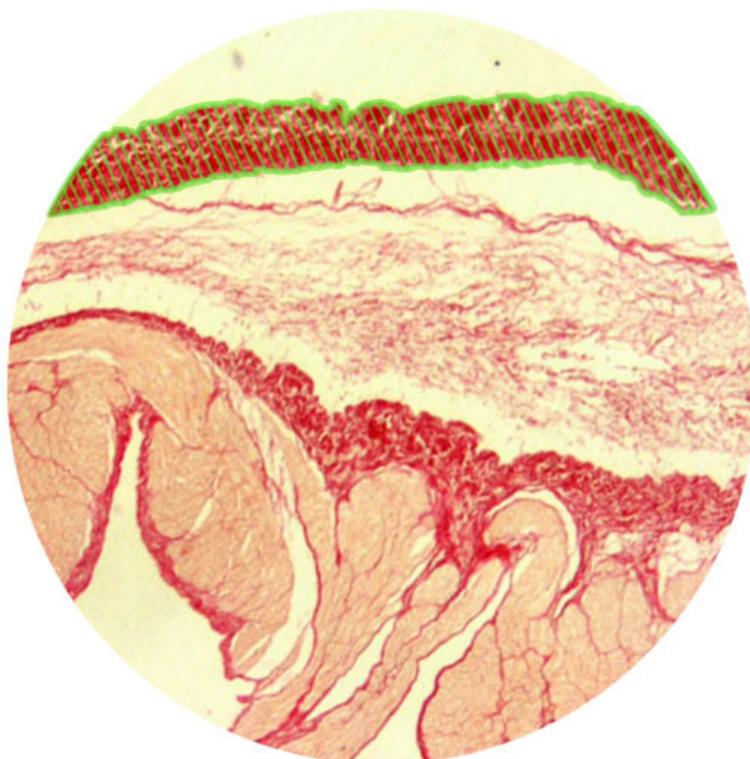
#### 4.8.1 Avaliação morfológica

Três segmentos foram o foco da análise morfológica: o pericárdio parietal, a aderência e o epicárdio. Os limites dos dois primeiros estavam óbvios. Para melhor padronização, o epicárdio foi definido como o espaço compreendido entre a margem externa do miocárdio e o início da aderência.

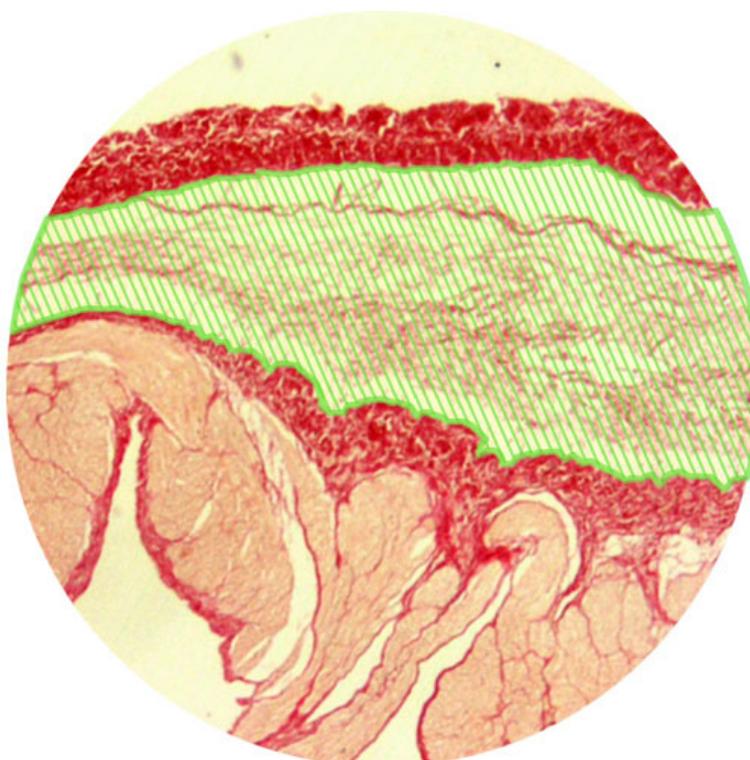
A área de cada um desses segmentos foram calculadas separadamente, através de uma ferramenta do programa de computador utilizado (Figuras 5, 6, 7).

Sendo a coloração Sirius Red específica para fibras colágenas, foi possível, medir, através da análise digital de cores, a área ocupada por estas fibras no pericárdio parietal, aderência e epicárdio (Figuras 8, 9, 10).

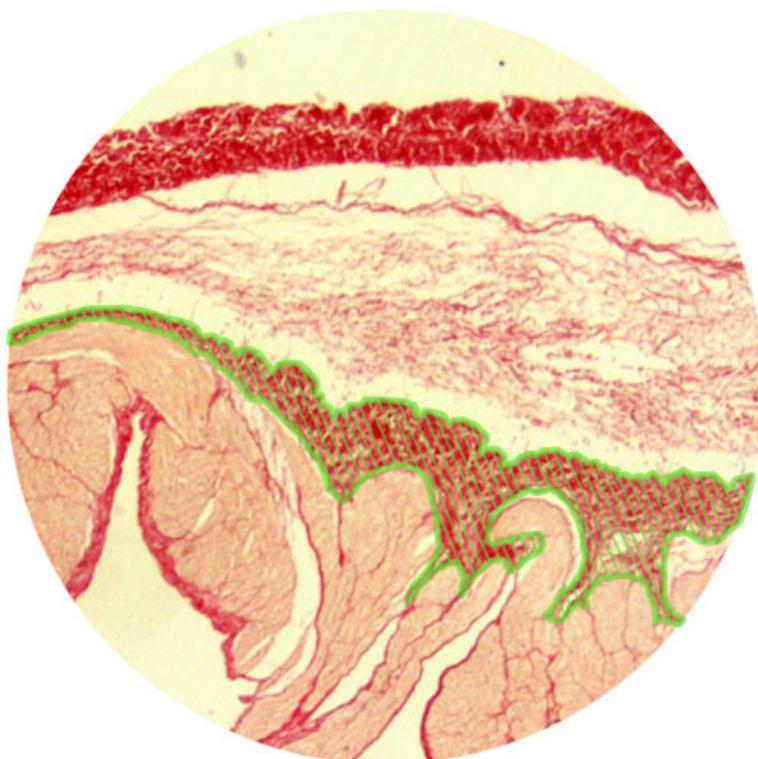
A proporção de colágeno foi inferida matematicamente mediante a divisão da área de fibras colágenas dentro do segmento pela área do segmento analisado.



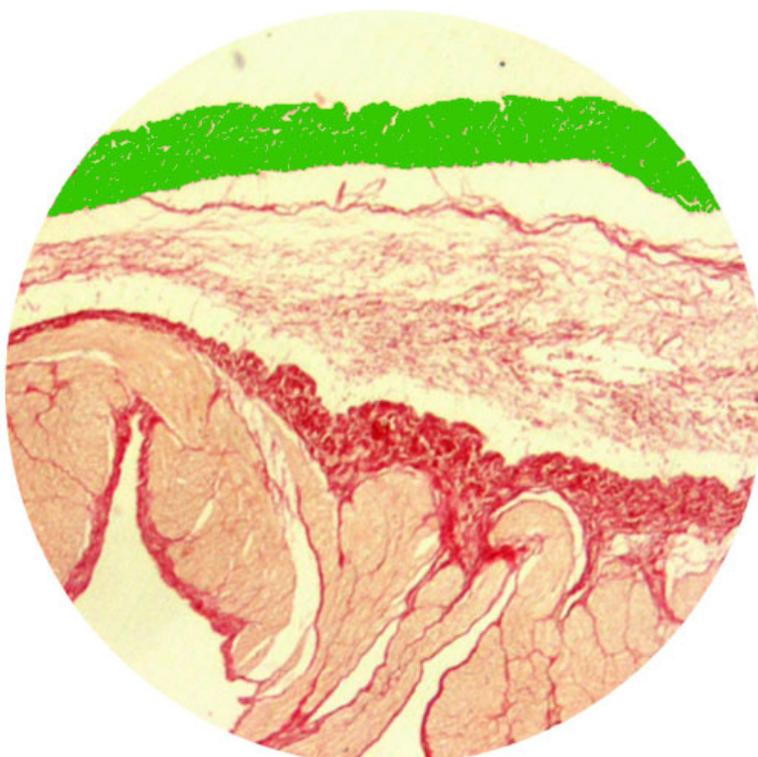
**Figura 5.** Área do pericárdio parietal. Coloração de Sirius Red. (x5)



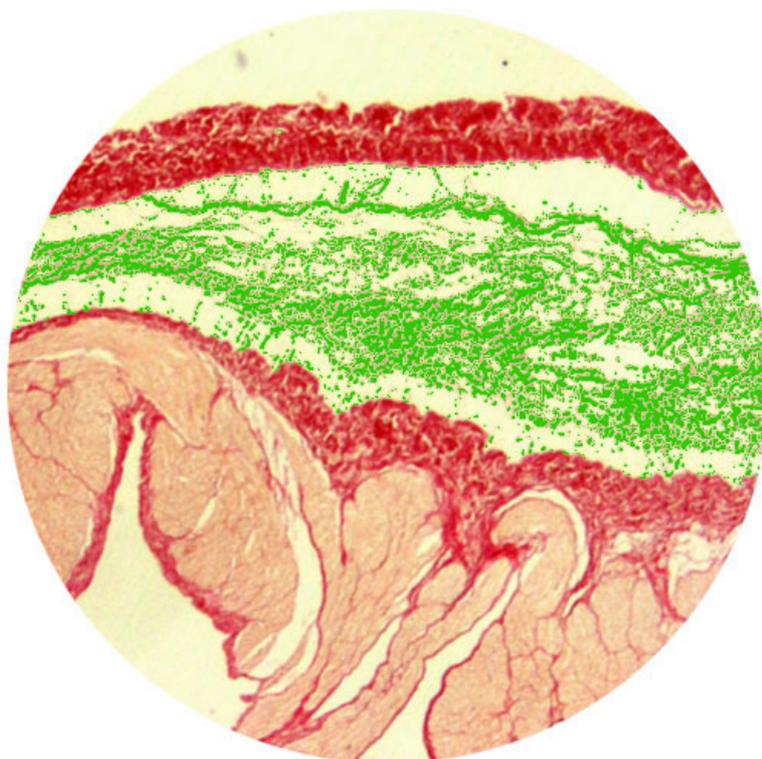
**Figura 6.** Área da aderência. Coloração de Sirius Red. (x5)



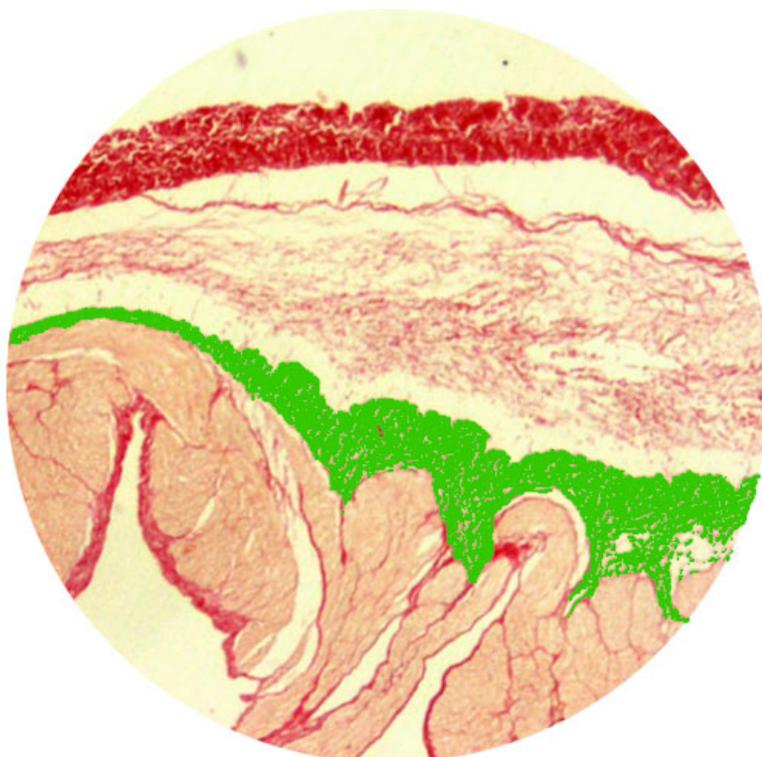
**Figura 7.** Área do epicárdio. Coloração de Sirius Red. (x5)



**Figura 8.** Área de colágeno no pericárdio parietal. Coloração de Sirius Red. (x5)



**Figura 9.** Área de colágeno na aderência. Coloração de Sirius Red. (x5)



**Figura 10.** Área de colágeno no epicárdio. Coloração de Sirius Red. (x5)

## 4.9 Análise estatística

### 4.9.1 Análise descritiva

Para as variáveis categóricas esta análise foi realizada através da observação dos valores da mediana, mínimo e máximo. Nas variáveis contínuas foram expressos os valores da média e desvio-padrão.

### 4.9.2 Análise comparativa

Para se testar a homogeneidade dos grupos em relação às variáveis categóricas foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis para amostras independentes. Após a aplicação do teste Kruskal-Wallis, foi utilizado o teste de Dunn para comparações múltiplas.

Para a comparação dos quatro grupos em relação às variáveis quantitativas foi utilizado o teste *one-way* ANOVA para análise de variância, com posterior utilização do teste de Bonferroni para comparações múltiplas.

Foi estabelecido o coeficiente de determinação ( $r^2$ ) para analisar a correlação entre o escore total e o tempo de dissecação das aderências, e entre o escore total e a quantidade de dissecação cruenta empregada na lise das aderências.

Todos os testes foram realizados no software GraphPad Prism, versão 5.01. Foi admitido como limite para significância estatística um erro alfa (tipo I) de 5%.

#### **4.10 Análise de risco**

A prevenção de riscos, em relação à segurança envolveram o trato com animais e a manipulação de agentes biológicos e reagentes químicos. Um médico veterinário acompanhou todo o processo de experimentação animal, para avaliação da saúde do animal e para controle de zoonoses. Foram utilizados EPIs (equipamento de proteção individual) em todas as tarefas, durante a pesquisa. Os resíduos biológicos foram acondicionados conforme os riscos. Os resíduos possivelmente contaminantes, como instrumentos perfuro-cortantes, foram incinerados.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Análise da carboximetilquitosana

#### 5.1.1 Mensuração do potencial hidrogeniônico (pH)

As medidas do pH foram realizadas após agitação magnética da CMQ 4% durante 3 dias, à temperatura ambiente. Após esse período foi observado que a solução não esterilizada (CMQNEst) apresentava cor amarelo e a esterilizada (CMQEst), cor marrom claro. Em ambas observou-se a presença de material insolúvel em suspensão. Foi utilizado pHmetro para as medidas. Os resultados não diferiram nas amostras, estando o pH igual a 8,9.

#### 5.1.2 Análise termogravimétrica

Os valores e as curvas resultantes são mostrados na [Tabela 2](#) e na [Figura 11](#), respectivamente.

As amostras se comportaram de forma muito semelhante, diferindo somente quanto ao teor de umidade. As amostras submetidas à esterilização tinham um teor maior de água.

A partir desse resultado, não se podem distinguir as amostras esterilizadas e não-esterilizadas, quanto à decomposição e estabilidade térmica.

**Tabela 2.** Análise termogravimétrica. Variação da massa da amostra em função da temperatura.

	Temperatura (°C)			
	25-100	100-310	310-550	550-750
<b>CMQNEst</b>	13,6	27,6	12,1	25,2
<b>CMQEst</b>	16,6	28,0	12,1	25,9
<b>CMQEst</b>	16,6	28,4	14,8	25,5

Os valores representam perda de massa (%)

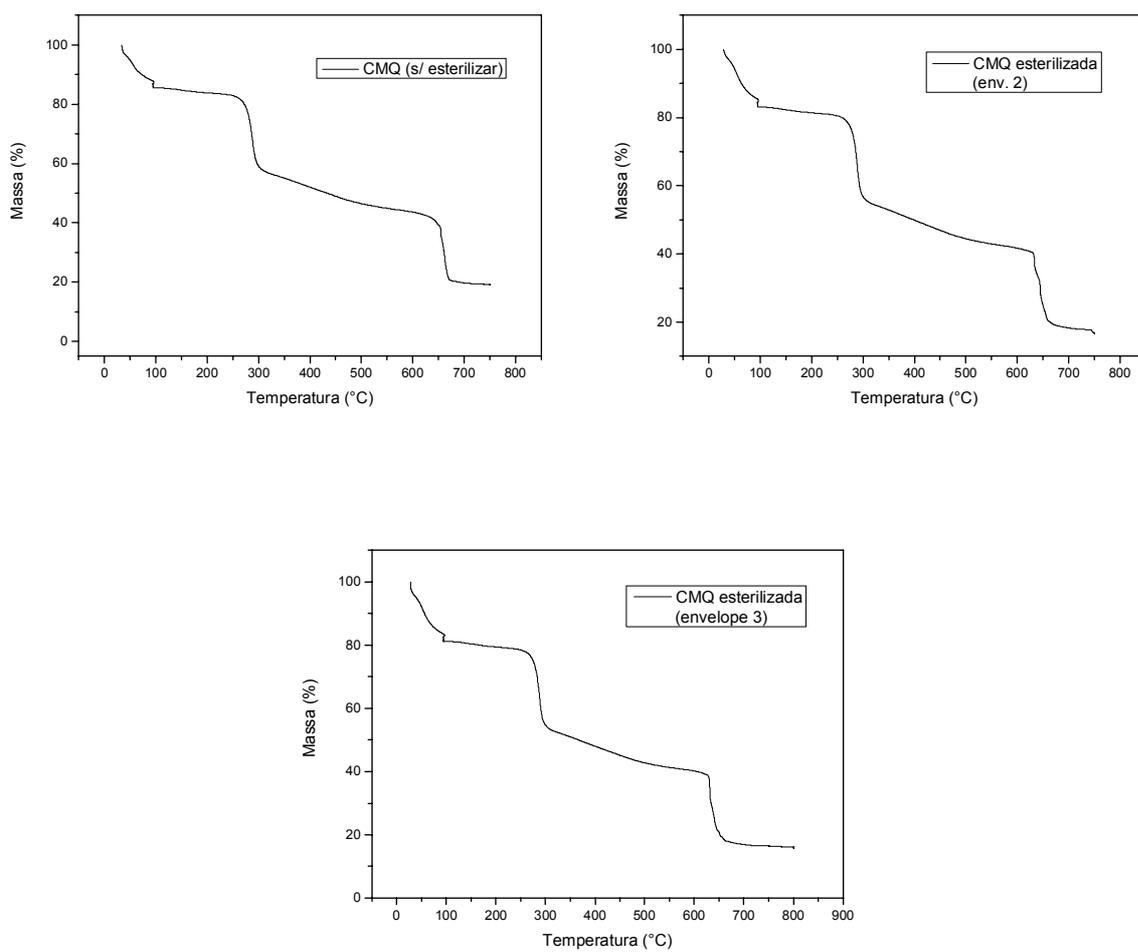


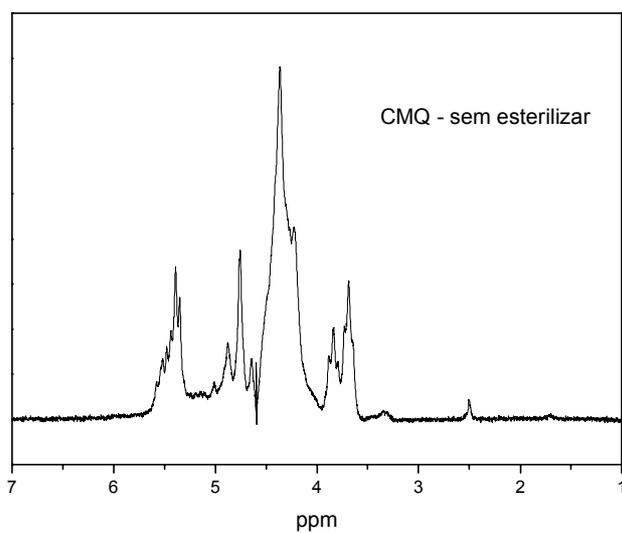
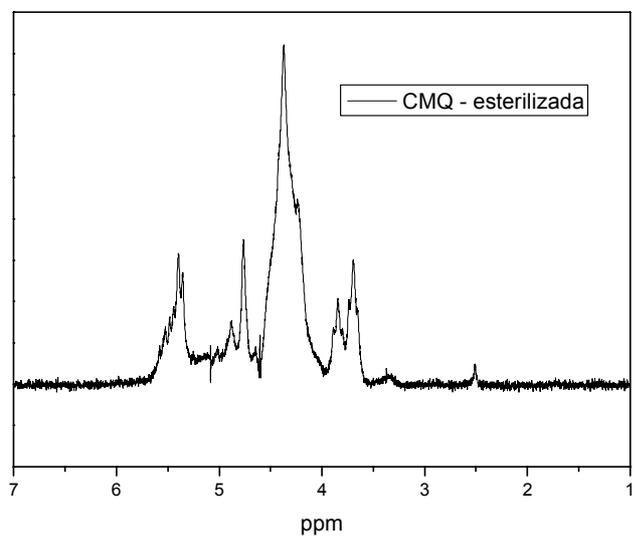
Figura 11. Curvas termogravimétricas de CMQEst e CMQNEst

### 5.1.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio ( $^1\text{H}$ RMN)

A comparação dos espectros das amostras CMQEst e CMQNEst (Figura 12) não revela diferenças importantes. Os espectros das amostras, também, exibem semelhança com as amostras de Campana-Filho e cols.<sup>62</sup>.

Ainda na mesma figura, o sinal mais à direita ( $\approx 2,5$  ppm) é bem pouco intenso e deve ser atribuído aos três átomos de hidrogênio dos grupos metila da acetamida, indicando que a quitosana empregada para preparar as amostras de CMQ é consideravelmente desacetilada.

Entre 3,5 ppm e 4,0 ppm estão os sinais atribuídos à introdução de um ou dois grupamentos de carboximetila em radicais amino da quitosana. Os sinais são devidos à introdução de grupamento carboximetila nas hidroxilas da quitosana de partida aparecem acima de 4,0ppm e se superpõem a outros sinais, dificultando a identificação. Apesar disso é possível caracterizar a amostra utilizada como O,N-carboximetilquitosana.



**Figura 12.** Espectros  $^1\text{H}$  RMN de CMQEst e CMQNEst capturados a partir de soluções das amostras em  $\text{D}_2\text{O}/\text{HCl}$  (100/1 v/v) e adquiridos a  $80^\circ\text{C}$ .

#### 5.1.4 Espectroscopia de infravermelho

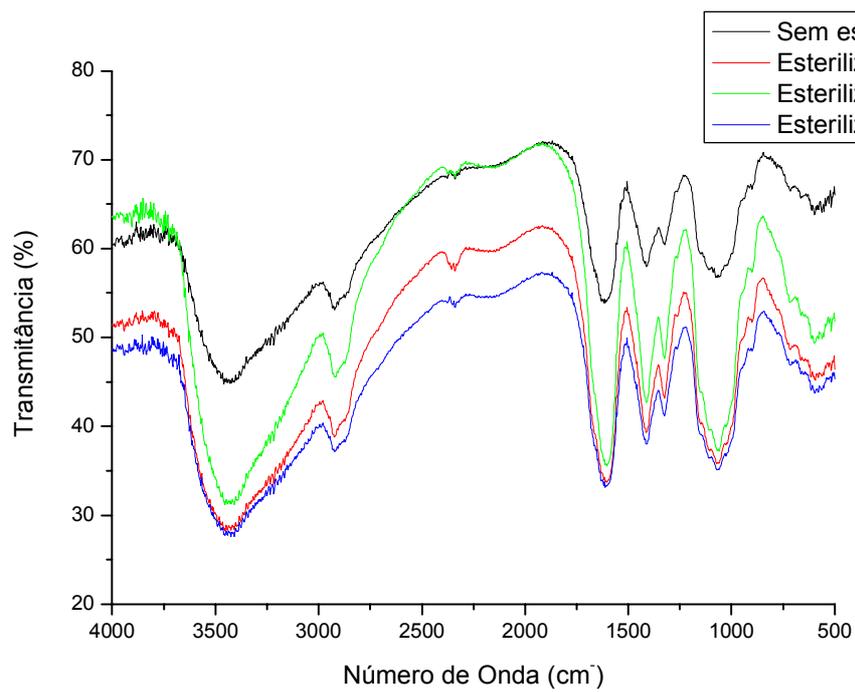
Observa-se, também, nesse caso, que os espectros são muito semelhantes entre as amostras, indicando que a esterilização não provocou alterações importantes na estrutura das amostras (Figura 13).

Em comparação com as amostras preparadas por Campana-Filho e cols.,<sup>62</sup> pode-se afirmar que as amostras da Dayang Chemicals estão na forma sódica, o que é evidenciado pelas bandas intensas localizadas em, aproximadamente,  $1410\text{cm}^{-1}$  e  $1600\text{cm}^{-1}$ .

Em todos os espectros há uma banda muito intensa em aproximadamente  $1100\text{cm}^{-1}$  que se refere às ligações glicosídicas, entre as unidades constituintes do polímero.

## 5.2 Complicações pós-operatórias

Ocorreu um óbito, antes do sacrifício, em um animal do grupo CMQ, devido à infecção respiratória. Dois animais, um do grupo CMQ e outro do grupo KGF, apresentaram infecção e deiscência da ferida cirúrgica, necessitando desbridamento e curativo. Um animal do grupo controle apresentou laceração extensa do ventrículo direito durante a esternotomia mediana, e conseqüentemente a aquisição de dados, nesse animal foi prejudicada.



**Figura 13.** Espectros de CMQEst e CMQNEst na região de infravermelho.

### 5.3 Análise macroscópica

Os resultados da análise da intensidade das aderências, baseada nas especificações da [Tabela 1](#), foram expressos os resultados de acordo com cada sítio avaliado em valores de mediana, valor mínimo e máximo ([Tabela 3](#)). Para todas as regiões foi encontrada uma diferença significativa entre os escores dos grupos (teste de Kruskal-Wallis com  $p < 0,01$ ).

A magnitude da redução das adesões em cada grupo, descrita através do escore total ([Tabela 4](#)), está demonstrada na [Figura 14](#). Quando comparada ao controle, a associação KGF+CMQ se mostrou altamente significativa ( $p < 0,01$ ) ([Tabela 5](#)) ([Figura 15](#)) na redução do escore das aderências. O KGF também se mostrou efetivo ( $0,01 < p < 0,05$ ) ([Figura 16](#)). A CMQ não alcançou nível de significância estatística, mas a análise do gráfico ([Figura 17](#)) sugere efetividade da substância em relação ao controle. Na comparação da solução de KGF+CMQ, com o KGF ([Figura 18](#)) e a CMQ ([Figura 19](#)) nota-se uma diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,01$ ), sugerindo um efeito aditivo entre as duas substâncias.

#### 5.3.1 Parede anterior e sutura na aorta

O teste de Dunn para comparações múltiplas foi utilizado, após aplicação do teste de Kruskal-Wallis, para avaliar cada região em relação ao tratamento aplicado. Na parede anterior, em comparação com o controle, a combinação KGF+CMQ mostrou-se efetiva ( $p < 0,01$ ). O KGF utilizado isoladamente também foi eficaz ( $0,01 < p < 0,05$ ). Não houve diferença, estatisticamente significativa, entre o controle versus a CMQ, entre o KGF+CMQ versus os grupos KGF ou CMQ e entre o KGF versus a CMQ ([Tabela 3](#)).

**Tabela 3.** Classificação macroscópica das aderências.

GRUPO	Face anterior	Face lateral	Face inferior	Linha de sutura	Sutura no átrio	Sutura na aorta
Controle	3,0 (2-3)	2,0 (2-3)	3,0 (2-3)	3,0 (3-3)	3,0 (3-3)	3,0 (2-3)
KGF + CMQ	1,0 (1-2)**	1,0 (1-1)*	1,0 (1-1)*	2,0 (1-2)**	1,0 (1-1)*	2,0 (1-2)**
KGF	1,5 (1-2)***	1,5 (0-2)***	2,0 (1-2)	3,0 (2-3)	2,0 (2-3)	2,0 (1-2)***
CMQ	2,0 (1-2)	1,0 (1-2)	2,0 (1-2)	3,0 (2-3)†	2,0 (1-3)	2,0 (1-2)

Dados apresentados em mediana (min. – máx.)

$p < 0,01$  - Teste de Kruskal-Wallis

Teste de Dunn:

\* $p < 0,001$  versus controle; \*\* $p < 0,01$  versus controle; \*\*\*  $p < 0,05$  versus controle

† $p < 0,05$  versus KGF+CMQ

**Tabela 4.** Avaliação cumulativa das aderências nos segmentos de análise macroscópica (Escore Total)

		Controle	KGF+CMQ	KGF	CMQ
Escore Total	Mediana	17,0	7,0	11,5	12,0
	Máximo	18,0	9,0	12,0	14,0
	Mínimo	15,0	6,0	9,0	9,0

$p = 0,0003$  - Teste de Kruskal-Wallis

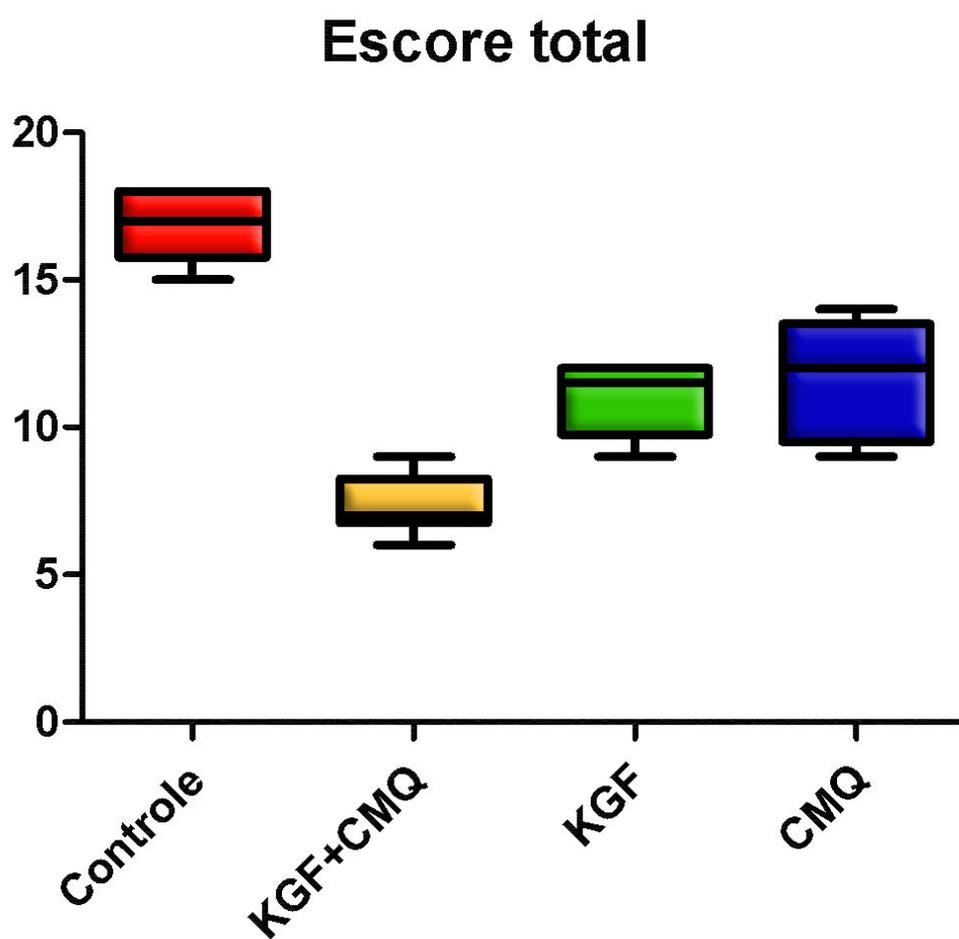


Figura 14. Intensidade das aderências avaliada pelo Escore Total

**Tabela 5.** Análise comparativa múltipla entre os grupos baseada no Escore Total

	<b>Controle</b>	<b>KGF+CMQ</b>	<b>KGF</b>	<b>CMQ</b>
<b>Controle</b>	–	$p < 0,01$	$p < 0,05$	NS
<b>KGF+CMQ</b>	$p < 0,01$	–	$p < 0,01$	$p < 0,01$
<b>KGF</b>	$p < 0,05$	$p < 0,01$	–	NS
<b>CMQ</b>	NS	$p < 0,01$	NS	–

Teste de Dunn

NS – Sem significância estatística

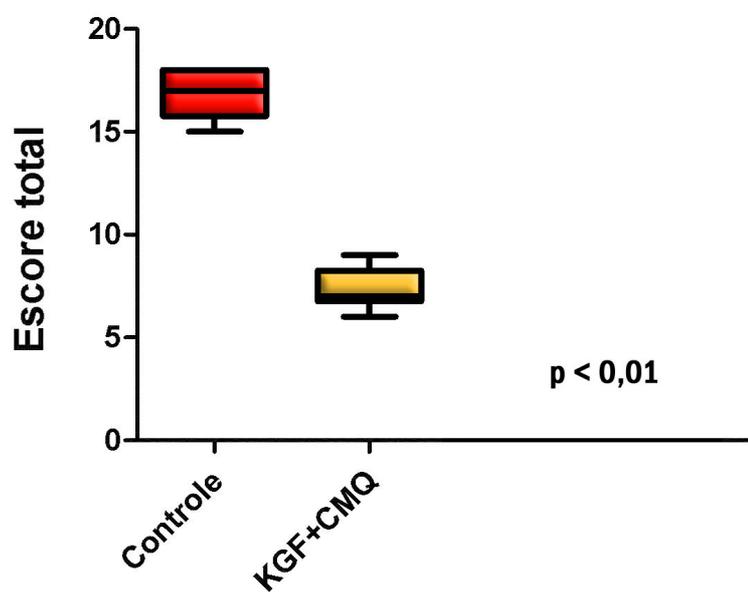


Figura 15. Comparação do Escore Total. Grupo Controle vs KGF+CMQ.

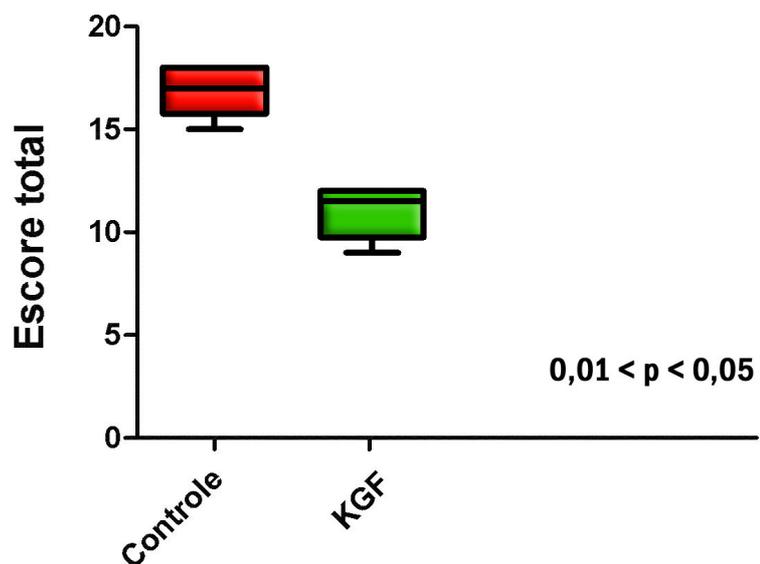


Figura 16. Comparação do Escore Total. Grupo Controle vs KGF.

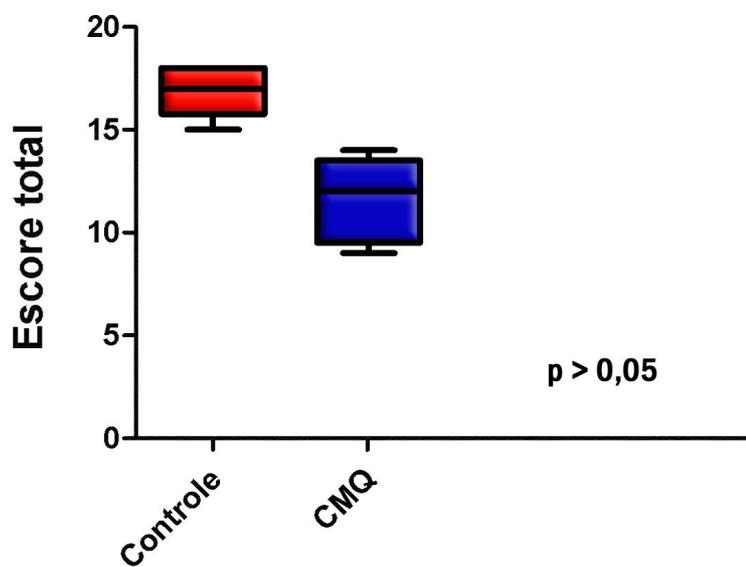


Figura 17. Comparação do Escore Total. Grupo Controle vs CMQ.

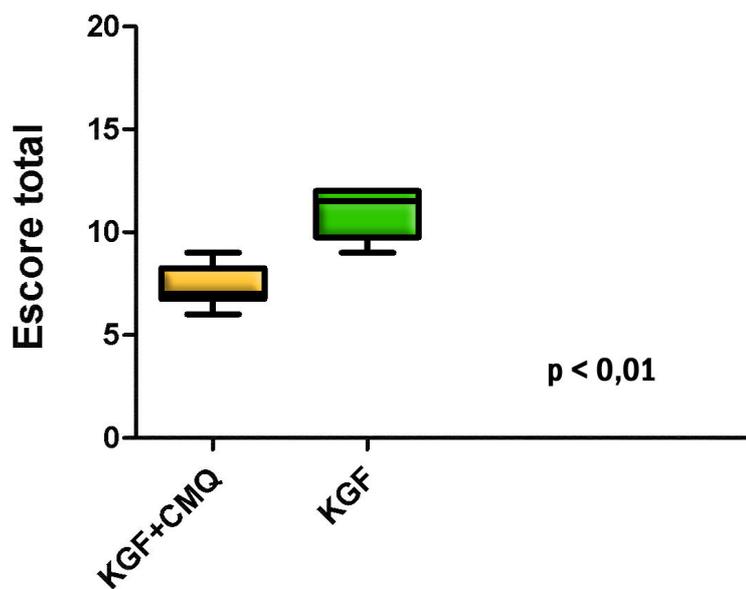
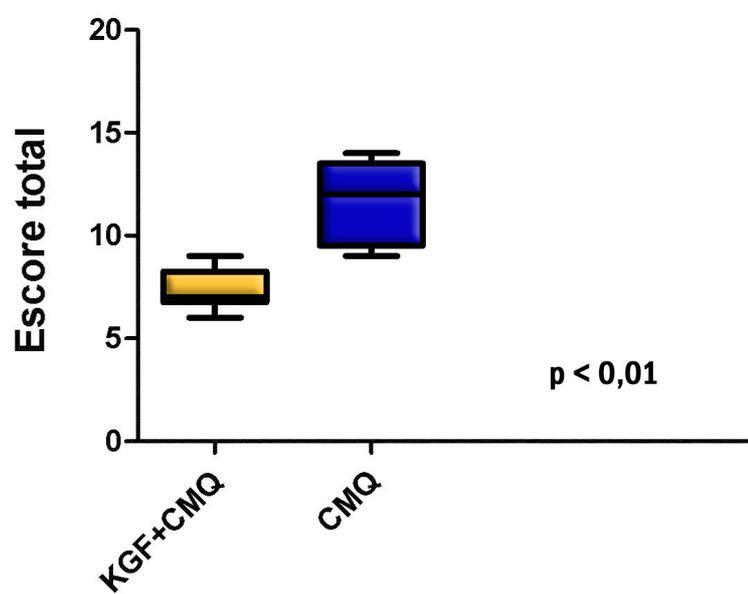


Figura 18. Comparação do Escore Total. Grupo KGF+CMQ vs KGF.



**Figura 19.** Comparação do Escore Total. Grupo KGF+CMQ vs CMQ.

### 5.3.2 Parede lateral

Em relação ao controle, a combinação KGF+CMQ mostrou-se ativa na redução das aderências ( $p < 0,001$ ) juntamente com o KGF e a CMQ quando utilizados isoladamente ( $0,01 < p < 0,05$ ). Foi encontrada, na parede lateral, diferença significativa quando se comparou a KGF+CMQ versus a CMQ ( $0,01 < p < 0,05$ ). Não houve diferença, estatisticamente significativa, entre a KGF+CMQ versus o grupo KGF e entre o KGF versus o CMQ (Tabela 3).

### 5.3.3 Parede inferior e sutura no átrio direito

Nestas regiões, a associação KGF+CMQ foi altamente significativa na redução das aderências, em relação ao controle ( $P < 0,001$ ). O uso do KGF e da CMQ isolados não mostrou significância em relação ao controle. Não houve diferença estatisticamente significativa entre a KGF+CMQ, versus os grupos KGF ou CMQ e entre o KGF versus a CMQ. (Tabela 3)

### 5.3.4 Linha de sutura

A associação KGF+CMQ reduziu as aderências no local, de forma significativa ( $p < 0,01$ ) em relação ao controle, o mesmo não acontecendo com o uso do KGF e CMQ isolados. Foi evidenciada uma diferença significativa entre os grupos KGF+CMQ versus CMQ ( $0,01 < p < 0,05$ ). Não houve diferença estatisticamente significativa entre a KGF+CMQ versus o grupo KGF, e entre o KGF versus o CMQ. (Tabela 3)

#### 5.4 Avaliação quantitativa do uso de dissecação cruenta

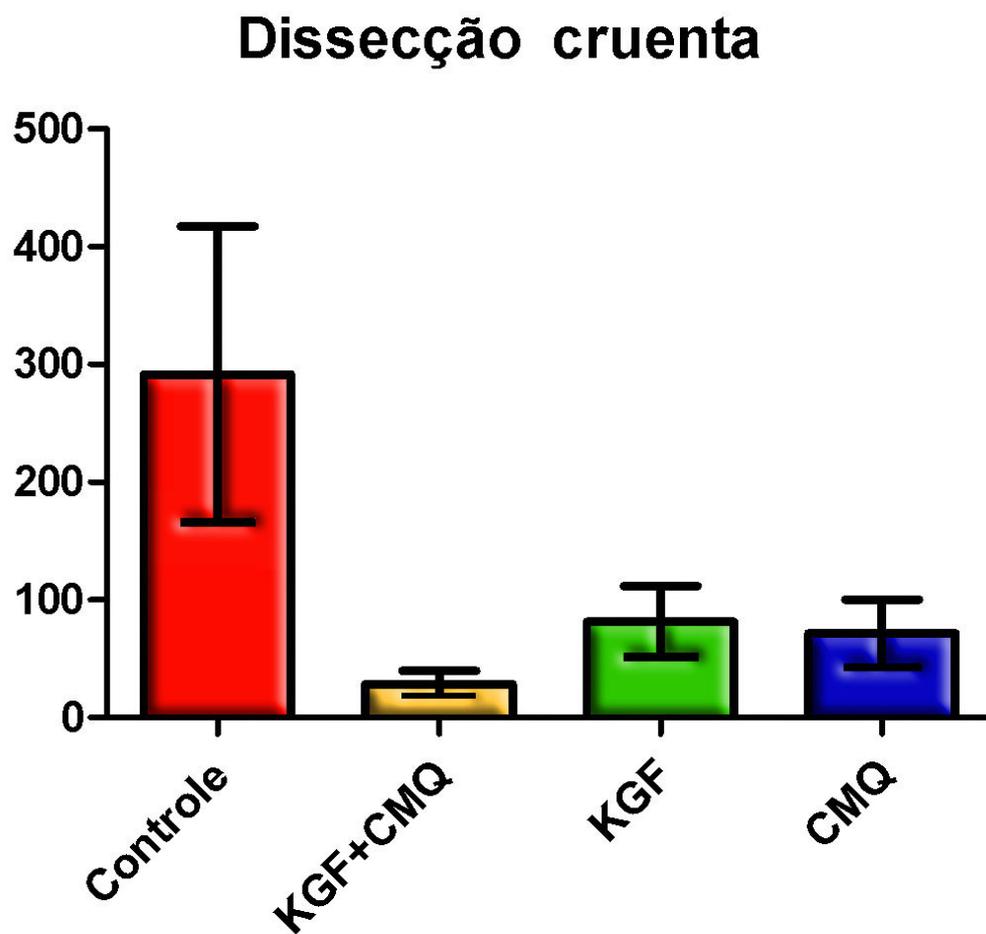
O número de movimentos de dissecação cortante, necessário para a lise das aderências, foi de  $292 \pm 101$ ,  $29 \pm 11$ ,  $82 \pm 28$ ,  $72 \pm 23$  nos grupos controle, KGF+CMQ, KGF e CMQ, respectivamente. Uma diferença significativa ( $p < 0,0001$ ), entre os grupos, foi encontrada através da análise de variância, *one-way* ANOVA. Para identificação dos grupos envolvidos nessa diferença, foi utilizado o teste de Bonferroni para comparações múltiplas. Em relação ao controle, essa avaliação revelou que todos os grupos de tratamento reduziram significativamente ( $p < 0,001$ ) a quantidade de dissecação cruenta (Figura 20). Não existiu diferença estatisticamente significativa entre a KGF+CMQ versus os grupos KGF ou CMQ e entre o KGF versus a CMQ.

A quantidade de dissecação cruenta apresentou uma correlação intensa ( $r^2 = 0,9155$ ) com o escore total das aderências (Figura 21).

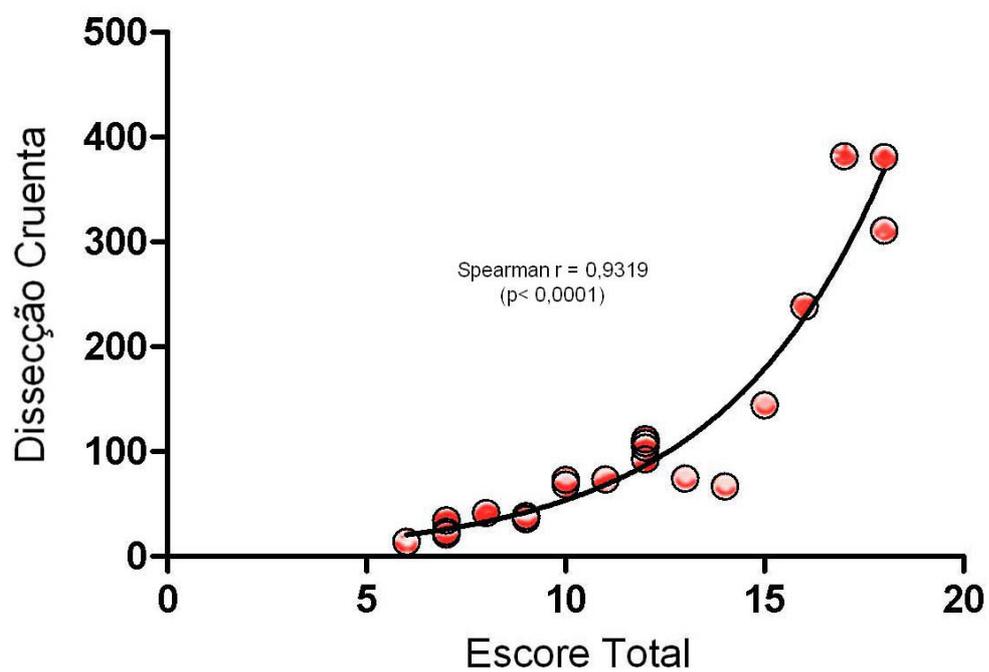
#### 5.5 Avaliação do tempo de dissecação

A média  $\pm$  desvio padrão foi calculada para o tempo de dissecação necessário à abertura do pericárdio e à lise das aderências, nas regiões anteriormente referidas (seção 4.7). Os tempos foram  $33,9 \pm 9,2$  min para o grupo controle;  $7,1 \pm 0,6$  min. no grupo KGF+CMQ,  $9,2 \pm 1,4$  min. no grupo KGF e  $9,8 \pm 1,5$  min. no grupo CMQ (Figura 22).

A análise de variância, *one-way* ANOVA, evidenciou uma diferença significativa ( $p < 0,0001$ ) entre os grupos. A análise, através do teste de Bonferroni evidenciou diminuição significativa ( $p < 0,001$ ) no tempo de dissecação, em todos os três grupos tratamento, quando comparados com o controle. Não existiu diferença estatisticamente significativa entre a KGF+CMQ versus os grupos KGF ou CMQ e entre o KGF versus a CMQ. (Figura 22).



**Figura 20.** Avaliação quantitativa do uso de dissecção cruenta.



**Figura 21.** Correlação exponencial entre o escore total e a quantidade de dissecção cruenta.

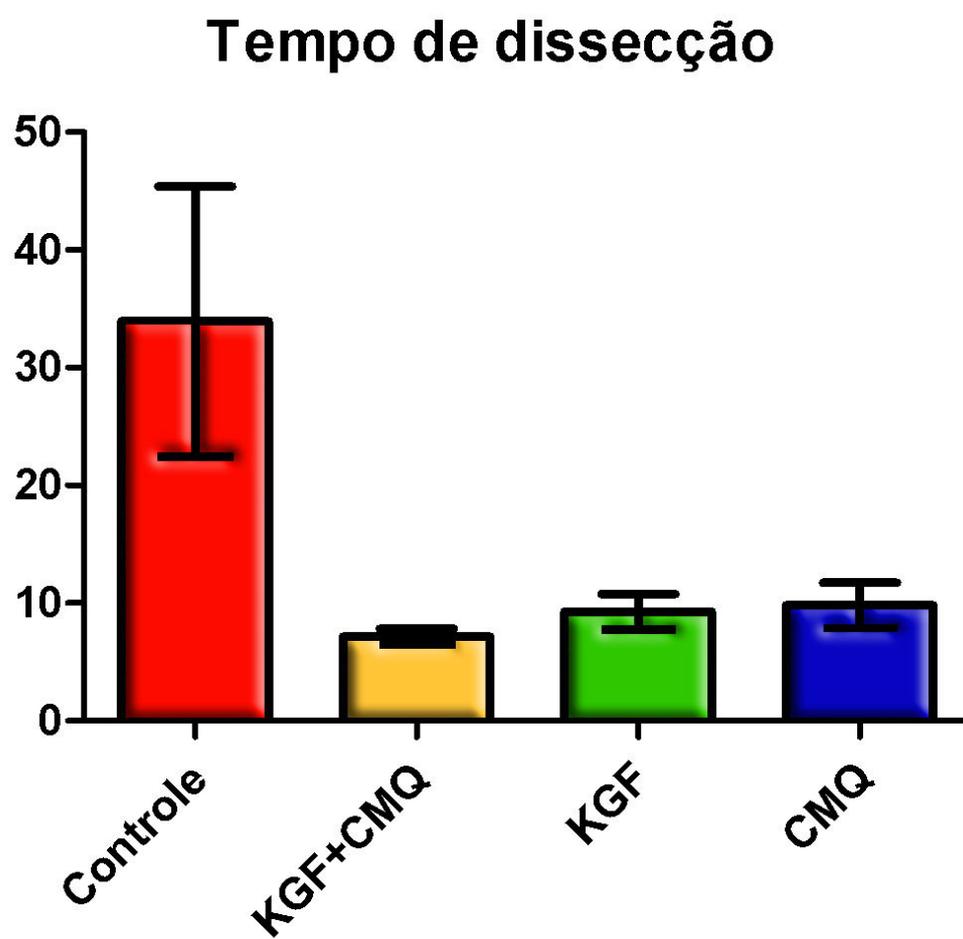


Figura 22. Análise do tempo de dissecção das aderências.

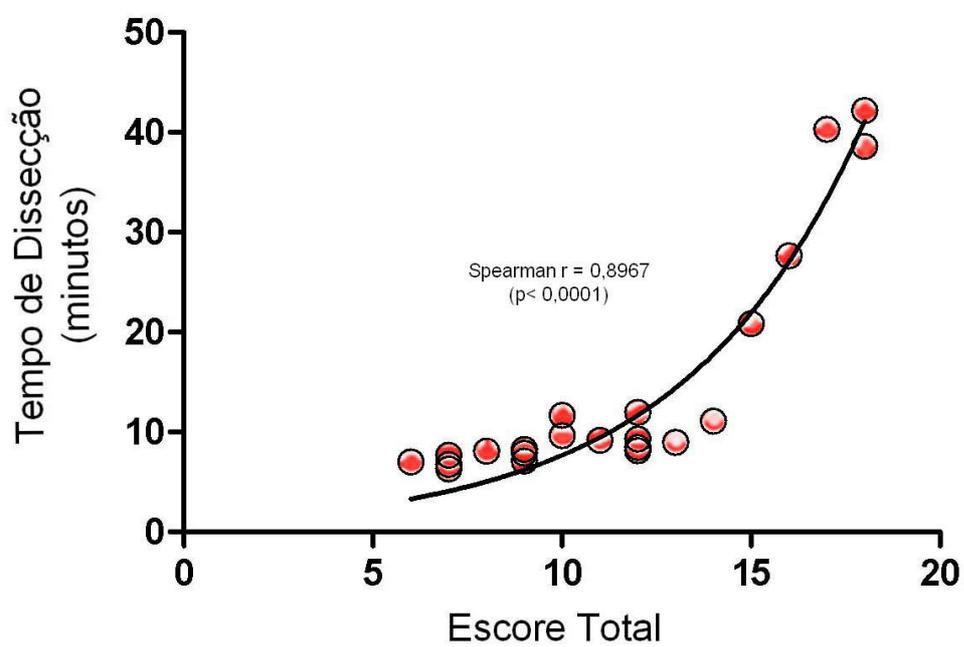
O tempo de dissecação, também, apresentou uma correlação exponencial intensa ( $r^2 = 0,9174$ ), com o escore total das aderências (Figura 23).

### **5.6 Análise morfométrica das lâminas histológicas (Tabelas 6, 7, 8)**

Na análise morfométrica digital do fragmento histológico notou-se, que em relação ao controle, a combinação do KGF+CMQ reduziu a área do pericárdio parietal, da aderência e do epicárdio. A quantidade de colágeno, nestes segmentos, também se apresentou menos intensa neste grupo. A proporção de colágeno na aderência também foi menor nos animais que receberam KGF+CMQ.

No grupo que recebeu KGF isoladamente, notou-se, em relação ao controle, uma redução, na área do pericárdio parietal, da aderência e do epicárdio. Neste mesmo grupo, a quantidade de colágeno, em todos os segmentos analisados, foi menor.

A CMQ, quando utilizada isoladamente, reduziu a área do epicárdio de forma estatisticamente significativa, quando comparada ao controle.



**Figura 23.** Correlação exponencial entre o escore total e o tempo de dissecção.

**Tabela 6.** Medidas morfométricas do pericárdio parietal obtidas através do analisador de imagens (QUANTIMET). Coloração de Sirius Red (5x)

Grupo	Área do pericárdio <sup>§†</sup>	Área de colágeno no pericárdio <sup>§†</sup>	% de colágeno no pericárdio
Controle	60,9(±26,1)	58,2(±2,4)	96,1 (±2,0)
KGF+CMQ	26,6(±5,9)**	24,8(±5,6)**	93,0 (±5,0)
KGF	26,0(±3,8)**	25,1(±3,2)**	96,6 (±2,7)
CMQ	45,6(±10,8)	43,5(±10,7)	95,2 (±3,5)

Todos valores são média±desvio-padrão e em  $\mu^2$

one-way ANOVA: <sup>†</sup> $p = 0,001$ ;

Teste de Bonferroni: \* $p < 0,05$  versus controle; \*\* $p < 0,01$  versus controle

<sup>§</sup> valor x  $10^{-4}$

**Tabela 7.** Medidas morfométricas da aderência obtidas através do analisador de imagens (QUANTIMET). Coloração de Sirius Red (5x)

Grupo	Área da aderência <sup>§†</sup>	Área de colágeno na aderência <sup>§§</sup>	% de colágeno na aderência <sup>#</sup>
Controle	61,7(±25,9)	26,2(±15,3)	41,8(±10,4)
KGF+CMQ	31,9(±9,8) <sup>*</sup>	6,7(±2,2) <sup>**</sup>	21,8(±6,7) <sup>*</sup>
KGF	26,2(±13,2) <sup>*</sup>	9,9(±5,9) <sup>*</sup>	36,3(±5,5)
CMQ	44,1(±12,9)	15,9(±6,8)	37,4(±14,2)

Todos valores são média±desvio-padrão e em  $\mu^2$   
*one-way* ANOVA: <sup>#</sup> $p = 0,01$ ; <sup>†</sup> $p = 0,008$ ; <sup>§</sup> $p = 0,007$ ;  
 Teste de Bonferroni: <sup>\*</sup> $p < 0,05$  versus controle; <sup>\*\*</sup> $p < 0,01$  versus controle  
<sup>§</sup> valor x  $10^{-4}$

**Tabela 8.** Medidas morfométricas do epicárdio obtidas através do analisador de imagens (QUANTIMET). Coloração de Sirius Red (5x)

Grupo	Área do epicárdio <sup>§†</sup>	Área de colágeno no epicárdio <sup>§#</sup>	% de colágeno no epicárdio
Controle	65,2(±25,7)	44,0(±22,2)	66,4(±13,7)
KGF+CMQ	24,3(±15,9) **	16,4(±13,6) *	68,2(±27,7)
KGF	23,8(±13,7) **	17,8(±10,5)	74,3(±7,0)
CMQ	29,6(±18,3) *	18,9(±11,7)	64,0(±21,9)

Todos valores são média±desvio-padrão e em  $\mu^2$

one-way ANOVA: # $p = 0,01$ ; † $p = 0,003$

Teste de Bonferroni: \* $p < 0,05$  versus controle; \*\* $p < 0,01$  versus controle

§ valor x  $10^{-4}$

## 6. DISCUSSÃO

As reoperações cardiovasculares têm sido cada vez mais freqüentes. Hoje, somente nos Estados Unidos da América, são realizadas aproximadamente 50.000 reoperações por ano <sup>86</sup>. Estas intervenções não estão limitadas a uma faixa etária específica, abrangendo desde o infante até o nonagenário. Porém, com o aumento da expectativa de vida e da sobrevida após as intervenções cardiovasculares, crescem as chances de uma pessoa, na fase adulta, necessitar uma nova abordagem cirúrgica.

Por este motivo, o assunto vem sendo tema de pesquisa em diversos centros de referência, no mundo. Em países mais desenvolvidos, as reoperações são objeto de estudo, justamente pela longevidade da população. Já em países subdesenvolvidos, a febre reumática é responsável por um grande número de cirurgias valvares, acarretando, por conseguinte, um aumento nas reoperações, devido às disfunções das próteses. No Brasil, estima-se que cerca de 30% das operações cardíacas são valvares, e a febre reumática é a etiologia dominante <sup>87, 88</sup>.

As reoperações são tecnicamente mais difíceis do que as suas antecessoras. A re-esternotomia é um procedimento perigoso, com uma taxa de acidentes não desprezível <sup>2, 8</sup>, o que conseqüentemente eleva a mortalidade <sup>6, 7</sup>. Alguns autores sugerem a utilização de métodos radiológicos para identificação de situações de maior risco. Macmanus <sup>89</sup>, Antunes <sup>90</sup> e Loop <sup>9</sup> apontam a radiografia do tórax em perfil, como uma opção. Mais recentemente a tomografia computadorizada e a ressonância

magnética têm sido utilizadas por outros especialistas<sup>91-93</sup> para esse mesmo fim. Morishita<sup>94</sup> advoga a instalação da circulação extracorpórea antes da abertura do tórax, quando as imagens da tomografia sugerirem um alto risco de injúria durante a reabertura do esterno.

Durante a re-esternotomia pode-se utilizar de algumas técnicas para reduzir os incidentes causados pela existência das aderências: manutenção dos fios de aço durante a osteotomia<sup>7, 95</sup>; hiperinsuflação dos pulmões<sup>96</sup>; tração da tábua óssea<sup>97</sup> com pinças do tipo Bachaus<sup>87</sup>; abertura inicial de toda tábua externa com serra oscilante e, em seguida, abertura da tábua posterior com tesoura<sup>98</sup>; e uso do osteótomo de Lebsche, para abertura da tábua posterior do esterno<sup>99</sup>.

A toracotomia lateral é uma alternativa que pode ser empregada durante as reoperações para revascularização do miocárdio, quando a anastomose da artéria torácica interna esquerda, para o ramo interventricular anterior, encontra-se pérvia<sup>100</sup>. A toracotomia lateral direita também pode ser utilizada para lise das aderências retroesternais, precedendo a realização da esternotomia mediana. Mais recentemente foi introduzida a videotoracoscopia, associada a retratores especiais para a mesma finalidade<sup>86</sup>. Mejia<sup>101</sup>, em 2005, descreveu a hidrodissecção como mais uma técnica para reduzir os riscos de acidentes. Esse procedimento consiste na infusão, através de uma agulha de anestesia subdural, de 100 a 200 ml de solução cristalóide no espaço retroesternal. Apesar de experiências bem sucedidas, o autor recomenda o uso da ecocardiografia

intraoperatória, quando for necessário a utilização de um volume maior que 200ml, devido ao risco de tamponamento cardíaco.

Os métodos descritos anteriormente são indispensáveis na atualidade, a fim de reduzir a morbidade das reoperações. Eles, porém, tratam apenas o problema criado pelas adesões. Adicionalmente, eles aumentam o tempo operatório, demandam habilidades e cuidados específicos por parte da equipe cirúrgica, além de não solucionar os inconvenientes das aderências intrapericárdicas. Por isso, novas soluções estão sendo investigadas tendo como foco a prevenção.

Na corrente preventiva, há vários elementos que vêm sendo utilizados como métodos de barreira e, dentre eles, os biopolímeros têm sido os que apresentam melhores resultados experimentais, na cavidade pericárdica. Entretanto, alguns deles já estão sendo comercializados com a finalidade de prevenção de aderências peritoneais: Celulose oxidada regenerada – Interceed TC7 (Ethicon / Johnson & Johnson); Polietilenoglicol – CoSeal (Baxter); Carboximetilcelulose + Ácido hialurônico – Seprafilm e Sepragel (Genzyme); Carboximetilquitosana – NOCC (Kytogenics Pharmaceuticals).

Poucos são os ensaios clínicos concluídos cujo objeto de estudo é o pericárdio, pois os ensaios, normalmente, demandam um tempo longo para verificação dos resultados. Duvernoy<sup>91</sup> utilizou a tomografia computadorizada para avaliar a eficácia do poli(hidroxibutirato), após 24 meses de seguimento, não precisando aguardar a ocorrência de uma nova intervenção cirúrgica para estimar os seus efeitos. Apesar da escassez de trabalhos em humanos, os resultados dos trabalhos experimentais sobre a

prevenção de aderências pericárdicas não deixam dúvidas de que os biopolímeros são recursos muito eficazes. Porém, mesmo sendo capazes de reduzir significativamente a intensidade das aderências, eles não são suficientes para eliminá-las, quando utilizados isoladamente.

Uma carboximetilquitosana, esterilizada por um método ainda não descrito na literatura foi utilizada no nosso estudo como agente de barreira. Em similaridade aos resultados de Krause <sup>61</sup>, encontramos que a carboximetilquitosana termo-estéril, quando utilizada isoladamente, foi capaz de reduzir a formação das aderências pericárdicas. Isto foi evidenciado pela redução significativa do tempo necessário para desprender o coração de outras estruturas aderidas a ele, e por uma diminuição na necessidade de dissecação cortante. A Figura 12 deste trabalho sugere uma redução no escore total das aderências, nesse grupo; esta porém não foi estatisticamente significativa. O menor número de animais neste grupo pode ter sido o fator que gerou a divergência entre a análise visual do gráfico e a estatística.

Através da análise dos resultados do grupo que somente utilizou o KGF, confirmamos a nossa hipótese de que o uso desse fator de crescimento é efetivo, mesmo isoladamente, na redução da formação de aderências pericárdicas. Comparado com o controle, a utilização do KGF revelou diferenças significativas em todos os parâmetros relacionados com a intensidade das aderências. O estudo de Adamson <sup>33</sup>, demonstrando um aumento da proliferação das células mesoteliais com o uso do KGF, e o nosso, evidenciando uma redução significativa nas aderências ocorrida no

grupo que utilizou o KGF isoladamente, sugerem que as células mesoteliais estão implicadas diretamente no processo de diminuição das adesões. A redução da atividade fibrinolítica do pericárdio lesado <sup>3</sup> e a prevenção das aderências pós-operatórias induzidas pelo uso de agentes fibrinolíticos <sup>24</sup>, como a estreptoquinase, apontam que a perda da capacidade de fibrinólise das células mesoteliais é um fator singular na formação das aderências. É provável que a recuperação da atividade fibrinolítica das células mesoteliais, com o uso do KGF, seja um dos mecanismos envolvidos no processo da prevenção. Ainda é necessário esclarecer se o KGF influencia esta atividade fibrinolítica, aumentando o número efetivo de células, ou exacerbando-a no mesotélio não lesado. Independente da conclusão, está claro que as células mesoteliais atuam como pivô no processo de reparo do pericárdio lesado, e que novas terapêuticas devem ser dirigidas para modulação da atividade destas células.

Apesar de avaliar os efeitos isolados da carboximetilquitosana e do KGF, o nosso estudo teve como principal propósito abordar a terapêutica combinada dos dois elementos, baseando-se na fisiopatologia do reparo tecidual.

O grupo que utilizou a combinação do biopolímero CMQ associado ao KGF apresentou a maior redução no escore das aderências (Figura 12). Este achado indica que há uma interação positiva entre as duas substâncias. Há algumas explicações possíveis para esta sinergia. A manutenção de uma concentração efetiva constante do fator de crescimento na cavidade, propiciada pela carboximetilquitosana, é uma delas. Alguns autores já

descreveram a utilização da CMQ como agente de modulação na liberação gradual de drogas, inclusive a de macromoléculas<sup>57, 65-67</sup>. Esta característica se deve ao fato de possuir, a CMQ, elevada massa molar, ser hidrodispersível e biodegradável<sup>64, 65</sup>. Um outro mecanismo provável, que explica a sinergia entre a CMQ e o KGF, é o de que a CMQ confere maior estabilidade ao KGF, devido a neutralização de segmentos peptídicos de carga elétrica positiva, que são tidos como responsáveis pela labilidade do fator de crescimento<sup>76</sup>. Esta mesma propriedade foi demonstrada utilizando-se outras glicosaminoglicanas<sup>82</sup> e com outros membros da famílias dos *heparin-binding growth factors* (HBGF)<sup>77, 80, 81</sup>.

Este estudo apresentou pela primeira vez um novo conceito para mensuração da intensidade das aderências. Até agora, a literatura considerava o método baseado em escores (Tabela 1) como o padrão-ouro para esta finalidade. A novidade introduzida foi o registro do tempo de dissecação com um cronômetro. A variável “tempo de dissecação” e a “quantificação do montante de dissecação cruenta”, apesar de aparentemente óbvias, nunca foram relacionadas com as aderências, no intuito de classificar suas intensidades. A análise dos dados revelou uma correlação extremamente forte entre a variável tempo e o escore total das aderências. Normalmente, na prática clínica, os cirurgiões sabem, em uma reoperação, o tempo cirúrgico é maior<sup>6</sup> e presumem que, quanto maior o nível de aderências, maior será o tempo necessário para a liberação do órgão dos tecidos adjacentes. A Figura 15 confirma, objetivamente, este pensamento, e nos mostra que esta correlação é exponencial, ou seja, com o aumento da

intensidade das aderências, o tempo necessário para a lise aumenta em progressão geométrica.

Outro fato relevante encontrado no nosso estudo, é uma importantíssima redução no tempo necessário para a lise das aderências, através do uso da CMQ associada com o KGF (Figura 14). O tempo cirúrgico é importante em situações como as reoperações sem circulação extracorpórea, e nos casos pediátricos, onde o maior tempo de exposição dos pacientes leva à hipotermia, com conseqüências negativas na cascata da coagulação e no ritmo cardíaco. A redução do tempo cirúrgico, advinda da utilização da associação da CMQ com o KGF, pode ser extremamente benéfica nestes casos.

A interação positiva, resultante da associação da CMQ e do KGF, evidenciada quando se analisou o escore total, não se reproduziu de forma tão evidente na análise do tempo de dissecação (Figura 14). Observando a curva exponencial da Figura 15, a grande maioria dos animais, que não os do grupo controle, estão posicionados abaixo do ponto de inflexão da curva do gráfico. As diferenças, no tempo de dissecação, entre os grupos de tratamento são pequenas, tanto que, para se identificar uma diferença estatisticamente significativa entre eles, seria necessária uma amostragem muito maior do que a utilizada neste trabalho.

Rotineiramente, no meio cirúrgico, acredita-se que, quanto maior a severidade das aderências, maior será o sangramento intra e pós-operatório. Levando adiante a lógica desse raciocínio, imagina-se que, ao diminuir a quantidade de aderências severas e a quantidade de dissecação cruenta, o

sangramento poderia ser reduzido, e até colaborar para a redução da mortalidade, haja vista que Brandão <sup>4</sup> identificou o volume de sangramento como um fator preditor de óbito em reoperações valvares. Nosso estudo mostrou que a associação do KGF com a CMQ é extremamente eficaz na redução de aderências severas. Por conseqüência, poderia, também, exercer uma influência positiva na diminuição de sangramentos. Apesar da atratividade dessa hipótese, ela precisa ser confirmada, posteriormente, através da realização de ensaios clínicos.

Em relação à análise microscópica das aderências pericárdicas, o estudo de variáveis histológicas de forma objetiva, comparativa e estatística, sempre foi um tema escasso na literatura. Não sabemos se os demais autores não se interessaram pelas alterações morfométricas, ou se não encontraram diferenças significativas e, por isso, os dados não foram publicados. Mais recentemente, Chang <sup>56</sup> e Yoshioka <sup>102</sup> deram mais ênfase a alguns aspectos histológicos, porém de forma ainda subjetiva. Os dados obtidos da análise histológica do nosso estudo apontam, mais uma vez, para o sinergismo da CMQ com o KGF. As alterações no pericárdio parietal e no epicárdio com o uso da combinação CMQ+KGF sugerem que existe uma redução na fibroplasia pericárdica e epicárdica, refletida pela diminuição da área total e da área de colágeno, quando se compara ao controle, mas mantendo-se sempre a mesma proporção de colágeno. De forma interessante, quando o tecido é produzido “de novo”, como é o caso do segmento da aderência, existe, além da redução nas áreas, também uma redução na proporção de colágeno. Esse fato pode justificar a intensidade

menor das aderências no grupo CMQ+KGF, demonstradas por um escore total, tempo de dissecação e uso de dissecação cruenta menores.

A análise das aderências através de medidas morfométricas, apesar de novidade na literatura relacionada ao tema, parece trazer informações relevantes. Outros trabalhos, utilizando metodologia semelhante, podem consolidar este método como mais uma ferramenta na análise dos agentes atualmente utilizados na prevenção de aderências pericárdicas. Da mesma forma que foi idealizado o escore total neste trabalho, próximos estudos podem explorar um escore histológico, englobando várias áreas do coração, o que poderá refletir de forma mais acurada a intensidade das aderências.

Outra informação escassa na literatura biomédica é sobre as alterações da CMQ, quando submetida ao processo de esterilização. Esse processo é essencial para a utilização desta substância por via parenteral. Kennedy <sup>35</sup>, Costain <sup>34</sup>, Tasker <sup>36</sup> e Zhou <sup>103</sup> relataram o uso da CMQ esterilizada, mas não descreveram as especificações do processo, nem se ocorreram modificações nas propriedades físico-químicas. Vários métodos podem ser utilizados para esterilização <sup>104, 105</sup>: autoclave, ondas ultravioletas, radiação ionizante, óxido de etileno, etc. Todos estes métodos apresentam vantagens e desvantagens. Em experimento não publicado, foi realizada a esterilização da solução a 4% da CMQ, por meio de autoclave e por radiação ionizante. Com ambos os métodos o grau de viscosidade da solução decaiu intensamente, sugerindo a ocorrência de quebra na molécula do polímero. O grau de hidratação da amostra tem relação direta com o grau de quebra da molécula durante a esterilização. A esterilização do pó de

CMQ, com temperatura, pressão e tempos programados e com posterior dissolução em água destilada estéril, foi o método delineado para uso neste estudo.

Os dados resultantes da análise do potencial hidrogeniônico <sup>106</sup>, da termogravimetria <sup>107</sup>, da espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (<sup>1</sup>H RMN) <sup>108</sup> e da espectroscopia de infravermelho, não evidenciaram alterações importantes em relação à amostra estéril e não estéril. Alterações na estrutura molecular da CMQ, relacionadas ao escurecimento não enzimático, não foram detectadas pelos métodos empregados.

A mensuração do potencial hidrogeniônico se mostrou discordante do certificado de análise fornecido pela Dayang Chemicals. Dois fatores podem justificar esta diferença: 1) a viscosidade da nossa solução pode ter influenciado na medida do pH; 2) um resíduo de hidróxido de sódio, proveniente do processo de carboximetilação, pode ter permanecido na amostra adquirida. Dificilmente esta alteração pode ter interferido no resultado, pois os sistemas tampão do organismo são capazes de equilibrar facilmente o pequeno volume utilizado. Ademais, muitas soluções com pH fora da faixa fisiológica são utilizados rotineiramente, em maior volume, sem problemas. Um exemplo disso é a solução de NaCl a 0,9%, conhecida como soro fisiológico, que possui pH na faixa de 5,5 a 6,0.

A escolha do modelo animal foi de fundamental importância na condução deste estudo. A utilização de animal de pequeno porte, a exemplo do rato, permitiria o emprego de uma amostra maior, porém a fragilidade do

respectivo pericárdio não possibilitaria a aplicação de suturas para o seu fechamento e a pequena tenacidade da estrutura impediria a avaliação adequada dos graus de aderências durante o sacrifício, já que não seria possível realizar a dissecação das aderências de forma verossímil ao humano.

Robinson<sup>26</sup> em 1983, Wiseman<sup>24</sup> em 1992 e Krause<sup>61</sup> em 2000 utilizaram o coelho como modelo, contudo, o pericárdio desse animal apresenta fragilidade semelhante à do rato, não permitindo a aplicação da análise das variáveis “tempo de dissecação” e “quantidade de dissecação cruenta”. Seguindo o caminho de outros autores<sup>2, 5, 21, 52</sup>, optamos pelo animal de médio porte, com a diferença de que todos escolheram o cão como modelo. Optamos pelo porco, devido a facilidade, no nosso meio, de obtermos animais de mesma raça. A utilização do suíno trouxe algumas dificuldades relacionadas à interação homem/animal, ao acesso venoso, a entubação orotraqueal e a ocorrência de hipertermia maligna, dificuldades não comumente encontradas com o cão.

Em relação ao modelo de indução de aderências severas no grupo de controle, o nosso método mostrou-se bastante eficaz e uniforme, em relação ao dos outros autores<sup>2, 5, 21, 24, 26, 52</sup>. Acreditamos que a modificação para a abrasão do pericárdio com lixa d'água, ao invés de gaze ou *swab*, causa uma desnudação mesotelial mais homogênea, evocando uma reação mais uniforme. Essa característica de indução de aderências severas foi de grande importância, pois sabemos que as variações dos resultados nos

grupos de tratamento são primordialmente relacionadas ao agente terapêutico e não a falhas do modelo de indução.

A redução significativa das aderências em todos os pontos analisados macroscopicamente (Tabela 3) demonstra que o modelo utilizado permitiu a dispersão das substâncias por todas as áreas intra-pericárdicas. A maioria dos autores <sup>1, 2, 5, 26, 52</sup> também fechou o pericárdio nos seus experimentos, para permitir a manutenção e a distribuição das soluções no seu interior. A questão da melhor forma para aplicação das substâncias ainda é um assunto em debate, já que, na prática diária, o pericárdio é deixado aberto, devido ao risco de compressão dos enxertos vasculares e tamponamento cardíaco, além dos efeitos deletérios sobre o débito cardíaco <sup>109</sup>. O uso de drenos e a abertura das pleuras mediastinais são fatores que dificultam a aplicação das substâncias na forma de soluções. Alguns <sup>53, 54</sup> têm testado a utilização dos polímeros em forma de filme, porém estas películas também apresentam seus inconvenientes, como a fragilidade e tendência a ruptura <sup>110</sup>. A irrigação contínua, um meio comumente utilizado para aplicação de soluções antissépticas no tratamento das mediastinites, ainda não foi testada como forma de administração.

O nosso estudo revelou inúmeros dados de relevância para o estudo sobre a prevenção das aderências pericárdicas. Algumas limitações, porém, podem ser encontradas. Por termos trabalhado com animais de médio porte, a utilização de uma grande amostra, capaz de identificar pequenas diferenças, não foi possível. Em relação ao tempo de dissecação, destacamos que as diferenças entre os três grupos de tratamento talvez não tenham sido

evidenciadas, exatamente por este motivo. Um fato restritivo, que deve ser considerado quando estudamos aderências pós-cirúrgicas, é que não existe um método de mensuração completamente absoluto como, por exemplo, a medida de uma estatura, peso ou dosagem da concentração de uma substância no sangue. Mesmo introduzindo, de forma inédita na literatura, duas variáveis contínuas, na análise da intensidade das aderências, a medida do tempo de dissecção e da necessidade do uso de dissecção cortante ainda apresentam as limitações de análise pois ambas não são métodos diretos de medida.

## 7. CONCLUSÕES

Observando os resultados obtidos, podemos concluir que:

- A carboximetilquitosana reduziu a intensidade das aderências pericárdicas, diminuindo o tempo de dissecção e a necessidade de dissecção cruenta.
- A utilização do fator de crescimento de queratinócitos diminuiu de forma eficiente e significativa as aderências pós-operatórias. Seu desempenho foi superior ao da carboximetilquitosana em relação ao escore de severidade das aderências.
- O fator de crescimento de queratinócitos associado à carboximetilquitosana reduziu significativamente e intensamente a severidade das aderências, claramente evidenciado-se como o melhor método utilizado neste estudo.

## 8. REFERÊNCIAS

1. Vander Salm TJ, Okike ON, Marsicano TH, Compton C, Espinoza E. Prevention of postoperative pericardial adhesions. An animal study. *Arch Surg* 1986;121:462-7.
2. Duncan DA, Yaacobi Y, Goldberg EP, et al. Prevention of postoperative pericardial adhesions with hydrophilic polymer solutions. *J Surg Res* 1988;45:44-9.
3. Nkere UU, Whawell SA, Sarraf CE, Schofield JB, Thompson JN, Taylor KM. Perioperative histologic and ultrastructural changes in the pericardium and adhesions. *Ann Thorac Surg* 1994;58:437-44.
4. Brandão CM, Pomerantzeff PMA, Souza LR, Tarasoutchi F, Grimberg M, Oliveira SA. Risk factors to hospital mortality in valvar reoperations. *Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular* 2002;17:345-51.
5. Seeger JM, Kaelin LD, Staples EM, et al. Prevention of postoperative pericardial adhesions using tissue-protective solutions. *J Surg Res* 1997;68:63-6.
6. Bennett SL, Melanson DA, Torchiana DF, Wiseman DM, Sawhney AS. Next-generation hydrogel films as tissue sealants and adhesion barriers. *J Card Surg* 2003;18:494-9.
7. Garrett HE, Matthews J. Reoperative median sternotomy. *Ann Thorac Surg* 1989;48:305.
8. Dobell AR, Jain AK. Catastrophic hemorrhage during redo sternotomy. *Ann Thorac Surg* 1984;37:273-8.
9. Loop FD. Catastrophic hemorrhage during sternal reentry. *Ann Thorac Surg* 1984;37:271-2.
10. von Segesser L, Jornod N, Faidutti B. Repeat sternotomy after reconstruction of the pericardial sac with glutaraldehyde-preserved equine pericardium. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1987;93:616-9.
11. Bailey LL, Ze-jian L, Schulz E, Roost H, Yahiku P. A cause of right ventricular dysfunction after cardiac operations. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1984;87:539-42.
12. Shapira N, Gordon CI, Lemole GM. Occlusion of aortocoronary vein grafts in association with bovine pericardium. *Am J Cardiovasc Pathol* 1990;3:87-90.

13. Urschel HC, Jr., Razzuk MA, Gardner M. Coronary artery bypass occlusion second to postcardiotomy syndrome. *Ann Thorac Surg* 1976;22:528-31.
14. Gervin AS, Jacobs G, Hufnagel HV, Mason KG. Surgical trauma and pericardial fibrinolytic activity. *Am Surg* 1975;41:225-9.
15. Ar'Rajab A, Ahren B, Rozga J, Bengmark S. Phosphatidylcholine prevents postoperative peritoneal adhesions: an experimental study in the rat. *J Surg Res* 1991;50:212-5.
16. Galili Y, Ben-Abraham R, Rabau M, Klausner J, Kluger Y. Reduction of surgery-induced peritoneal adhesions by methylene blue. *Am J Surg* 1998;175:30-2.
17. Goldman LI, Rosemond GP. 5-Fluorouracil inhibition of experimental peritoneal adhesions. *Am J Surg* 1967;113:491-3.
18. Hemadeh O, Chilukuri S, Bonet V, Hussein S, Chaudry IH. Prevention of peritoneal adhesions by administration of sodium carboxymethyl cellulose and oral vitamin E. *Surgery* 1993;114:907-10.
19. Kawarasaki H, Fujiwara T, Fonkalsrud EW. Reduction of intestinal adhesions by postoperative peritoneal irrigation with dialysis solution. *Am Surg* 1984;50:552-6.
20. Leal RS, Lopes JB, Barreto JR, Sadigursky M. Redução das aderências peritoneais pós-operatórias com a associação de carboximetilcelulose e diclofenaco em cirurgias abdominais. In: *VII Seminário estudantil de pesquisa. Salvador: Universidade Federal da Bahia; 1998.*
21. Milgalter E, Uretzky G, Siberman S, et al. Pericardial meshing: an effective method for prevention of pericardial adhesions and epicardial reaction after cardiac operations. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1985;90:281-6.
22. Gallo JI, Artinano E, Duran CM. Clinical experience with glutaraldehyde-preserved heterologous pericardium for the closure of the pericardium after open heart surgery. *Thorac Cardiovasc Surg* 1982;30:306-9.
23. Smith LO, Jr. Prevention of surgically induced pericardial adhesions with combined dexamethasone and promethazine therapy. *J Fla Med Assoc* 1968;55:413-7.
24. Wiseman DM, Kamp L, Linsky CB, Jochen RF, Pang RH, Scholz PM. Fibrinolytic drugs prevent pericardial adhesions in the rabbit. *J Surg Res* 1992;53:362-8.

25. Konertz WF, Kostelka M, Mohr FW, et al. Reducing the incidence and severity of pericardial adhesions with a sprayable polymeric matrix. *Ann Thorac Surg* 2003;76:1270-4; discussion 4.
26. Robison RJ, Brown JW, Deschner WP, Highes B, King H. Prevention of pericardial adhesions with dextran 70. *Ann Thorac Surg* 1984;37:488-90.
27. Laks H, Hammond G, Geha AS. Use of silicone rubber as a pericardial substitute to facilitate reoperation in cardiac surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1981;82:88-92.
28. Minale C, Nikol S, Hollweg G, Mittermayer C, Messmer BJ. Clinical experience with expanded polytetrafluoroethylene Gore-Tex surgical membrane for pericardial closure: a study of 110 cases. *J Card Surg* 1988;3:193-201.
29. Holtz G. Prevention and management of peritoneal adhesions. *Fertil Steril* 1984;41:497-507.
30. Mutsaers SE. Mesothelial cells: their structure, function and role in serosal repair. *Respirology* 2002;7:171-91.
31. Mutsaers SE, McAnulty RJ, Laurent GJ, Versnel MA, Whitaker D, Papadimitriou JM. Cytokine regulation of mesothelial cell proliferation in vitro and in vivo. *Eur J Cell Biol* 1997;72:24-9.
32. Pierro E, Nicosia SV, Saunders B, Fultz CB, Nicosia RF, Mancuso S. Influence of growth factors on proliferation and morphogenesis of rabbit ovarian mesothelial cells in vitro. *Biol Reprod* 1996;54:660-9.
33. Adamson IY, Bakowska J, Prieditis H. Proliferation of rat pleural mesothelial cells in response to hepatocyte and keratinocyte growth factors. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000;23:345-9.
34. Costain DJ, Kennedy R, Ciona C, McAlister VC, Lee TD. Prevention of postsurgical adhesions with N,O-carboxymethyl chitosan: examination of the most efficacious preparation and the effect of N,O-carboxymethyl chitosan on postsurgical healing. *Surgery* 1997;121:314-9.
35. Kennedy R, Costain DJ, McAlister VC, Lee TD. Prevention of experimental postoperative peritoneal adhesions by N,O-carboxymethyl chitosan. *Surgery* 1996;120:866-70.
36. Tasker RA, Ross SJ, Dohoo SE, Elson CM. Pharmacokinetics of an injectable sustained-release formulation of morphine for use in dogs. *J Vet Pharmacol Ther* 1997;20:362-7.
37. Uragami T, Tokura S, eds. *Material Science of Chitin and Chitosan*: Springer; 2006.

38. Latarjet M, Ruiz Liard A, eds. Anatomia humana. 2ª ed. São Paulo: Panamericana; 1993
39. Ishihara T, Ferrans VJ, Jones M, Boyce SW, Kawanami O, Roberts WC. Histologic and ultrastructural features of normal human parietal pericardium. *Am J Cardiol* 1980;46:744-53.
40. Leak LV, Ferrans VJ, Cohen SR, Eidbo EE, Jones M. Animal model of acute pericarditis and its progression to pericardial fibrosis and adhesions: ultrastructural studies. *Am J Anat* 1987;180:373-90.
41. Honda A, Ohashi Y, Mori Y. Hyaluronic acid in rabbit pericardial fluid and its production by pericardium. *FEBS Lett* 1986;203:273-8.
42. Valle MT, Degl'Innocenti ML, Bertelli R, et al. Antigen-presenting function of human peritoneum mesothelial cells. *Clin Exp Immunol* 1995;101:172-6.
43. Porter JM, Ball AP, Silver D. Mesothelial fibrinolysis. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1971;62:725-30.
44. Ozeren M, Han U, Mavioglu I, et al. Consequences of PTFE membrane used for prevention of re-entry injuries in rheumatic valve disease. *Cardiovasc Surg* 2002;10:489-93.
45. Kajihara N, Eto M, Oishi Y, et al. Three-layered synthetic pericardial substitutes reduce postoperative pericardial adhesions. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005;129:18-24.
46. Amanpour S, Ahamadi H, Mirzadeh H, Mohagheghi MA, Rabbani S. Long-term evaluation of laser-treated silicone (LTS) membrane as a pericardial substitute: in vivo study. *J Long Term Eff Med Implants* 2005;15:347-54.
47. Barbanti SH, Zavaglia CAC, Duek EAR. Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos. *Polímeros* 2005;15:13-21.
48. Denuziere A, Ferrier D, Domard A. Interactions between chitosan and glycosaminoglycans (chondroitin sulfate and hyaluronic acid): physicochemical and biological studies. *Ann Pharm Fr* 2000;58:47-53.
49. Qian G, Zhou J, Ma J, Wang D, He B. The chemical modification of E. coli L-asparaginase by N,O-carboxymethyl chitosan. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 1996;24:567-77.
50. Metwally M, Watson A, Lilford R, Vandekerckhove P. Fluid and pharmacological agents for adhesion prevention after gynaecological surgery. *Cochrane Database Syst Rev* 2006:CD001298.

51. Marc Hendrikx M, Mees U, Hill AC, Egbert B, Coker GT, Estridge TD. Evaluation of a novel synthetic sealant for inhibition of cardiac adhesions and clinical experience in cardiac surgery procedures. *Heart Surg Forum* 2001;4:204-9; discussion 10.
52. Mitchell JD, Lee R, Hodakowski GT, et al. Prevention of postoperative pericardial adhesions with a hyaluronic acid coating solution. Experimental safety and efficacy studies. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1994;107:1481-8.
53. Mitchell JD, Lee R, Neya K, Vlahakes GJ. Reduction in experimental pericardial adhesions using a hyaluronic acid bioabsorbable membrane. *Eur J Cardiothorac Surg* 1994;8:149-52.
54. Iliopoulos J, Cornwall GB, Evans RO, et al. Evaluation of a bioabsorbable polylactide film in a large animal model for the reduction of retrosternal adhesions. *J Surg Res* 2004;118:144-53.
55. Tsukihara H, Takamoto S, Kitahori K, et al. Prevention of postoperative pericardial adhesions with a novel regenerative collagen sheet. *Ann Thorac Surg* 2006;81:650-7.
56. Chang Y, Lai PH, Wang CC, Chen SC, Chang WC, Sung HW. Mesothelium regeneration on acellular bovine pericardia loaded with an angiogenic agent (ginsenoside Rg1) successfully reduces postsurgical pericardial adhesions. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2006;132:867-74.
57. Ishihara M, Fujita M, Obara K, et al. Controlled releases of FGF-2 and paclitaxel from chitosan hydrogels and their subsequent effects on wound repair, angiogenesis, and tumor growth. *Curr Drug Deliv* 2006;3:351-8.
58. Kratz G, Arnander C, Swedenborg J, et al. Heparin-chitosan complexes stimulate wound healing in human skin. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 1997;31:119-23.
59. Rabea EI, Badawy ME, Stevens CV, Smagghe G, Steurbaut W. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules* 2003;4:1457-65.
60. Suzuki K, Okawa Y, Hashimoto K, Suzuki S, Suzuki M. Protecting effect of chitin and chitosan on experimentally induced murine candidiasis. *Microbiol Immunol* 1984;28:903-12.
61. Krause TJ, Zazanis G, Malatesta P, Solina A. Prevention of pericardial adhesions with N-O carboxymethylchitosan in the rabbit model. *J Invest Surg* 2001;14:93-7.
62. Abreu FRd, Campana-Filho SP. Preparation and characterization of carboxymethylchitosan. *Polímeros* 2005;15:79-83.

63. Krause TJ, Goldsmith NK, Ebner S, Zazanis GA, McKinnon RD. An inhibitor of cell proliferation associated with adhesion formation is suppressed by N,O-carboxymethyl chitosan. *J Invest Surg* 1998;11:105-13.
64. Lopes CM, Lobo JMS, Costa P. Modified release of drug delivery systems: hydrophilic polymers. *Rev Bras Cienc Farm* 2005;41:143-54.
65. Ranade VV. Drug delivery systems: 3A. Role of polymers in drug delivery. *J Clin Pharmacol* 1990;30:10-23.
66. Senel S, Ikinici G, Kas S, Yousefi-Rad A, Sargon MF, Hincal AA. Chitosan films and hydrogels of chlorhexidine gluconate for oral mucosal delivery. *Int J Pharm* 2000;193:197-203.
67. Tasker RA, Connell BJ, Ross SJ, Elson CM. Development of an injectable sustained-release formulation of morphine: antinociceptive properties in rats. *Lab Anim* 1998;32:270-5.
68. Fujita M, Ishihara M, Shimizu M, et al. Therapeutic angiogenesis induced by controlled release of fibroblast growth factor-2 from injectable chitosan/non-anticoagulant heparin hydrogel in a rat hindlimb ischemia model. *Wound Repair Regen* 2007;15:58-65.
69. Liu H, Fan H, Cui Y, Chen Y, Yao K, Goh JC. Effects of the controlled-released basic fibroblast growth factor from chitosan-gelatin microspheres on human fibroblasts cultured on a chitosan-gelatin scaffold. *Biomacromolecules* 2007;8:1446-55.
70. Rubin JS, Osada H, Finch PW, Taylor WG, Rudikoff S, Aaronson SA. Purification and characterization of a newly identified growth factor specific for epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:802-6.
71. Aaronson SA, Bottaro DP, Miki T, et al. Keratinocyte growth factor. A fibroblast growth factor family member with unusual target cell specificity. *Ann N Y Acad Sci* 1991;638:62-77.
72. Finch PW, Rubin JS, Miki T, Ron D, Aaronson SA. Human KGF is FGF-related with properties of a paracrine effector of epithelial cell growth. *Science* 1989;245:752-5.
73. Canatan H, Chang WY, Sugimoto Y, et al. Keratinocyte growth factor (KGF/FGF-7) has a paracrine role in canine prostate: molecular cloning of mRNA encoding canine KGF. *DNA Cell Biol* 1996;15:247-54.
74. Staiano-Coico L, Krueger JG, Rubin JS, et al. Human keratinocyte growth factor effects in a porcine model of epidermal wound healing. *J Exp Med* 1993;178:865-78.

75. Derrick T, Grillo AO, Vitharana SN, et al. Effect of polyanions on the structure and stability of repifermin (keratinocyte growth factor-2). *J Pharm Sci* 2007;96:761-76.
76. Hsu E, Osslund T, Nybo R, et al. Enhanced stability of recombinant keratinocyte growth factor by mutagenesis. *Protein Eng Des Sel* 2006;19:147-53.
77. Trowbridge JM, Rudisill JA, Ron D, Gallo RL. Dermatan sulfate binds and potentiates activity of keratinocyte growth factor (FGF-7). *J Biol Chem* 2002;277:42815-20.
78. Zhang MZ, Wen J, Arakawa T, Prestrelski SJ. A new strategy for enhancing the stability of lyophilized protein: the effect of the reconstitution medium on keratinocyte growth factor. *Pharm Res* 1995;12:1447-52.
79. Edelman ER, Mathiowitz E, Langer R, Klagsbrun M. Controlled and modulated release of basic fibroblast growth factor. *Biomaterials* 1991;12:619-26.
80. Prestrelski SJ, Fox GM, Arakawa T. Binding of heparin to basic fibroblast growth factor induces a conformational change. *Arch Biochem Biophys* 1992;293:314-9.
81. Masuoka K, Ishihara M, Asazuma T, et al. The interaction of chitosan with fibroblast growth factor-2 and its protection from inactivation. *Biomaterials* 2005;26:3277-84.
82. Trowbridge JM, Rudisill JA, Ron D, Gallo RL. Dermatan sulfate binds and potentiates activity of keratinocyte growth factor (FGF-7). *J Biol Chem* 2002;277:42815-20.
83. Santos JEd, Soares JdP, Dockal ER, Campana Filho SP, Cavaleiro ÉTG. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. *Polímeros* 2003;13:242-9.
84. Borges LF, Taboga SR, Gutierrez PS. Simultaneous observation of collagen and elastin in normal and pathological tissues: analysis of Sirius-red-stained sections by fluorescence microscopy. *Cell Tissue Res* 2005;320:551-2.
85. Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J* 1979;11:447-55.
86. Mayfield WR. Endoscopic repeat sternotomy. *Heart Surg Forum* 1998;1:26-9.

87. Brandão CM. Análise univariada e multivariada de fatores de risco para mortalidade hospitalar nas reoperações valvares [Doutorado]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2002.
88. Grimberg M, Arnoni AS, Santos DVd, et al. Consenso sobre conduta em valvopatia. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo* 1996;6:378-90.
89. Macmanus Q, Okies JE, Phillips SJ, Starr A. Surgical considerations in patients undergoing repeat median sternotomy. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1975;69:138-43.
90. Antunes MJ. Techniques of valvular reoperation. *Eur J Cardiothorac Surg* 1992;6:S54-7; discussion S8.
91. Duvernoy O, Malm T, Ramström J, Bowald S. A biodegradable patch used as a pericardial substitute after cardiac surgery: 6- and 24-month evaluation with CT. *Thorac Cardiovasc Surg* 1995;43:271-4.
92. Duvernoy O, Malm T, Thuomas KA, Larsson SG, Hansson HE. CT and MR evaluation of pericardial and retrosternal adhesions after cardiac surgery. *J Comput Assist Tomogr* 1991;15:555-60.
93. Mulligan SA, Soto B, Nath PH. Usefulness of computed tomography in preoperative assessment of resternotomy after ascending aortic aneurysm resection or after cardiac ventricle to pulmonary conduit insertion. *Am J Cardiol* 1987;60:739-43.
94. Morishita K, Kawaharada N, Fukada J, et al. Three or more median sternotomies for patients with valve disease: role of computed tomography. *Ann Thorac Surg* 2003;75:1476-80; discussion 81.
95. Abdulmassih Neto C. Tactics and techniques in reoperations of valvopathies *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo* 1993;3:72-7.
96. Ancalmo N, Ochsner JL. A simple and useful maneuver to open the sternum in redo operations. *Ann Thorac Surg* 1993;55:1600.
97. Eddy AC, Miller D, Johnson D, et al. Anterior sternal retraction for reoperative median sternotomy. *Am J Surg* 1991;161:556-9.
98. Bortolotti U. The problem of reoperation in bioprosthetic valve recipients. *J Heart Valve Dis* 1992;1:29-31.
99. Robicsek F. The management of severe adherence of mediastinal structures to the sternum during cardiac reoperations. *J Heart Valve Dis* 1993;2:476-7.
100. Walker WS, Sang CT. Avoidance of patent anterior grafts at revisional coronary artery surgery: use of a lateral thoracotomy approach. *Thorax* 1986;41:692-5.

101. Mejia R, Saxena P, Tam RK. Hydrodissection in redo sternotomies. *Ann Thorac Surg* 2005;79:363-4.
102. Yoshioka I, Saiki Y, Sakuma K, et al. Bioabsorbable gelatin sheets latticed with polyglycolic acid can eliminate pericardial adhesion. *Ann Thorac Surg* 2007;84:864-70.
103. Zhou J, Elson C, Lee TD. Reduction in postoperative adhesion formation and re-formation after an abdominal operation with the use of N, O - carboxymethyl chitosan. *Surgery* 2004;135:307-12.
104. Jarry C, Leroux JC, Haeck J, Chaput C. Irradiating or autoclaving chitosan/polyol solutions: effect on thermogelling chitosan-beta-glycerophosphate systems. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2002;50:1335-40.
105. Marreco PR, da Luz Moreira P, Genari SC, Moraes AM. Effects of different sterilization methods on the morphology, mechanical properties, and cytotoxicity of chitosan membranes used as wound dressings. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2004;71:268-77.
106. Mendham J, Denney RC, Barnes JD, Thomas MJK. Métodos eletroanalíticos diretos. In: Vogel Análise química quantitativa. Rio de Janeiro: LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora S.A; 2002:277-316.
107. Mendham J, Denney RC, Barnes JD, Thomas MJK. Análise térmica. In: Vogel Análise química quantitativa. Rio de Janeiro: LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora S.A; 2002:265-76.
108. Mendham J, Denney RC, Barnes JD, Thomas MJK. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear. In: Vogel Análise química quantitativa. Rio de Janeiro: LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora S.A; 2002:317-24.
109. Hunter S, Smith GH, Angelini GD. Adverse hemodynamic effects of pericardial closure soon after open heart operation. *Ann Thorac Surg* 1992;53:425-9.
110. Rodas ACD. Desenvolvimento de membranas como compostos dermo-epidérmicos [Doutorado]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2004.

## APÊNDICE

---

**Tabela 1 - Intensidade das aderências na parede anterior**

<b>Controle</b>	<b>KGF+CMQ</b>	<b>KGF</b>	<b>CMQ</b>
3	1	2	1
3	1	2	2
3	1	1	2
2	1	2	2
3	2	1	1
3	1	1	-

---



---

**Tabela 2 - Intensidade das aderências na parede lateral**

<b>Controle</b>	<b>KGF+CMQ</b>	<b>KGF</b>	<b>CMQ</b>
2	1	2	1
3	1	0	2
2	1	2	2
2	1	2	1
3	1	1	2
2	1	1	-

---

---

**Tabela 3 - Intensidade das aderências na parede inferior**

<b>Controle</b>	<b>KGF+CMQ</b>	<b>KGF</b>	<b>CMQ</b>
3	1	2	1
3	1	2	2
3	1	1	2
3	1	1	2
3	1	2	1
2	1	2	-

---



---

**Tabela 4 - Intensidade das aderências na linha de sutura**

<b>Controle</b>	<b>KGF+CMQ</b>	<b>KGF</b>	<b>CMQ</b>
3	1	2	2
3	2	3	3
3	2	3	3
3	2	3	3
3	2	2	3
3	2	3	-

---

---

**Tabela 5 - Intensidade das aderências na sutura do átrio**

<b>Controle</b>	<b>KGF+CMQ</b>	<b>KGF</b>	<b>CMQ</b>
3	1	2	2
3	1	3	1
3	1	2	3
3	1	2	3
3	1	2	2
3	1	2	-

---



---

**Tabela 6 - Intensidade das aderências na sutura da aorta**

<b>Controle</b>	<b>KGF+CMQ</b>	<b>KGF</b>	<b>CMQ</b>
3	1	2	2
3	1	2	2
3	2	2	2
2	1	2	2
3	2	1	1
3	1	1	-

---

**Tabela 7 - Escore total**

<b>Controle</b>	<b>KGF+CMQ</b>	<b>KGF</b>	<b>CMQ</b>
17	6	12	9
18	7	12	12
17	8	11	14
15	7	12	13
18	9	9	10
16	7	10	-

**Tabela 8 – Quantidade de movimentos cortantes para lise das aderências**

<b>Controle</b>	<b>KGF+CMQ</b>	<b>KGF</b>	<b>CMQ</b>
-	14	108	39
311	24	112	104
382	42	74	67
145	21	93	75
381	36	36	73
239	35	69	-

**Tabela 9 – Tempo de dissecação ( em min.)**

<b>Controle</b>	<b>KGF+CMQ</b>	<b>KGF</b>	<b>CMQ</b>
-	7,00	8,13	7,90
38,62	7,68	8,47	9,33
40,30	8,10	9,18	11,12
20,83	6,32	11,97	8,98
42,17	7,10	8,28	11,67
27,67	6,75	9,65	-

**Tabela 10 – Área do epicárdio ( $\mu^2$ )**

<b>Controle</b>	<b>CMQ+KGF</b>	<b>KGF</b>	<b>CMQ</b>
291.075	328.538	201.950	615.643
757.381	119.300	327.575	208.300
469.944	131.150	402.625	187.263
557.913	448.388	335.206	286.431
871.913	62.413	79.475	183.625
967.731	372.723	86.563	-

**Tabela 11 – Área de colágeno no epicárdio ( $\mu^2$ )**

<b>Controle</b>	<b>CMQ+KGF</b>	<b>KGF</b>	<b>CMQ</b>
199.469	115.944	150.238	356.019
410.344	97.119	215.750	157.931
237.781	41.188	291.938	58.069
447.763	360.606	292.669	256.950
530.044	60.706	56.944	120.706
815.288	312.169	64.581	-

**Tabela 12 – Percentagem de colágeno no epicárdio**

<b>Controle</b>	<b>CMQ+KGF</b>	<b>KGF</b>	<b>CMQ</b>
69	35	74	58
54	81	66	76
51	31	73	31
80	80	87	90
61	97	72	66
84	84	75	-

**Tabela 13 – Área da aderência ( $\mu^2$ )**

<b>Controle</b>	<b>CMQ+KGF</b>	<b>KGF</b>	<b>CMQ</b>
767.150	337.075	469.850	609.731
494.825	420.612	193.144	325.944
913.656	375.663	171.106	297.088
823.350	380.325	391.288	490.844
474.213	157.850	171.944	484.144
232.825	246.919	179.181	-

**Tabela 14 – Área de colágeno na aderência ( $\mu^2$ )**

<b>Controle</b>	<b>CMQ+KGF</b>	<b>KGF</b>	<b>CMQ</b>
226.456	60.925	181.388	234.244
153.027	77.596	70.963	149.731
504.375	85.112	44.619	139.675
393.356	95.125	167.944	212.125
184.354	52.144	61.869	61.125
113.463	33.781	67.619	-

**Tabela 15 – Percentagem de colágeno na aderência**

<b>Controle</b>	<b>CMQ+KGF</b>	<b>KGF</b>	<b>CMQ</b>
30	18	39	38
31	18	37	46
55	23	26	47
48	25	43	43
39	33	36	13
49	14	38	-

**Tabela 16 – Área do pericárdio ( $\mu^2$ )**

<b>Controle</b>	<b>CMQ+KGF</b>	<b>KGF</b>	<b>CMQ</b>
767.906	230.100	262.450	393.031
697.213	213.094	191.281	493.213
958.581	285.381	266.731	610.358
244.294	375.750	306.288	464.875
610.244	263.056	278.606	322.394
377.706	232.238	258.613	-

---

**Tabela 17 – Área de colágeno no pericárdio ( $\mu^2$ )**

<b>Controle</b>	<b>CMQ+KGF</b>	<b>KGF</b>	<b>CMQ</b>
745.981	219.006	249.513	360.588
656.900	188.594	189.419	477.806
891.519	244.313	263.881	594.981
236.950	352.463	283.138	423.894
596.875	258.850	266.731	319.581
369.388	225.325	255.463	-

---



---

**Tabela 18 – Percentagem de colágeno no pericárdio**

<b>Controle</b>	<b>CMQ+KGF</b>	<b>KGF</b>	<b>CMQ</b>
97	95	95	92
94	89	99	97
93	86	99	97
97	94	92	91
98	98	96	99
98	97	99	-

---

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)