

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Faculdade de Medicina

Paulo Henrique Nogueira Costa

**AVALIAÇÃO DA CERA DE OSSO COMO COFATOR NA
COLONIZAÇÃO DE ESTERNOTOMIA EM RATOS**

Belo Horizonte

2013

Paulo Henrique Nogueira Costa

**AVALIAÇÃO DA CERA DE OSSO COMO COFATOR NA
COLONIZAÇÃO DE ESTERNOTOMIA EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ivana Duval Araújo.

Coorientador: Prof. Dr. Cláudio Leo Gelape.

Belo Horizonte

Faculdade de Medicina - UFMG

2013

Costa, Paulo Henrique Nogueira.
C837a Avaliação da cera de osso como cofator na colonização de esternotomia em ratos [manuscrito]. / Paulo Henrique Nogueira Costa. -- Belo Horizonte: 2013.
65f.: il.
Orientador: Ivana Duval Araújo.
Co-Orientador: Cláudio Leo Gelape.
Área de concentração: Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Mediastinite. 2. Esternotomia/efeitos adversos. 3. Radionuclídeo. 4. Ratos. 5. Dissertações Acadêmicas. I. Araújo, Ivana Duval. II. Gelape, Cláudio Leo. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WF 980



FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte – MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640



DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE PAULO HENRIQUE NOGUEIRA COSTA, nº 2011659595.

Às quatorze horas do dia vinte e nove de abril de dois mil e treze, reuniu-se na Faculdade de Medicina da UFMG, a Comissão Examinadora de tese indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: **“AVALIAÇÃO DA CERA DE OSSO COMO COFATOR NA COLONIZAÇÃO DE ESTERNOTOMIAS: ESTUDO CINTILOGRÁFICO EM RATOS”**, requisito final para a obtenção do grau de mestre em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e a Oftalmologia. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Profa. Ivana Duval Araújo, após dar a conhecer aos presentes o teor das normas regulamentares do trabalho final passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença do candidato e do público para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Profa. Ivana Duval Araújo/ orientadora	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprovado</u>
Prof. Cláudio Leo Gelape / Co-orientador	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprovado</u>
Prof. Walter Vilela Andrade Vicente- USP/RP	Instituição: USP/RP	Indicação: <u>Aprovado</u>
Prof. Charles Simões Filho	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprovado</u>

Pelas indicações, o candidato foi considerado aprovado

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 29 de abril de 2013.

Profa. Ivana Duval Araújo/ Orientadora _____

Prof. Claudio Leo Gelape/ Co-orientador _____

Prof. Walter Vilela Andrade Vicente _____

Prof. Charles Simão Filho _____

Prof. Marcelo Dias Sanches/Coordenador _____

Obs.: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador.

Profa. Ivana Duval de Araújo
Sub-Coordenadora do Prog. de Pós-Graduação em
Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia
Faculdade de Medicina/UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

REITOR: Prof. Dr. Clélio Campolina Diniz

VICE-REITORA: Prof^a. Dr^a. Rocksane de Carvalho Norton

PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO: Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez

PRÓ-REITOR DE PESQUISA: Prof. Dr. Renato de Lima dos Santos

FACULDADE DE MEDICINA

DIRETOR: Prof. Dr. Francisco José Penna

VICE-DIRETOR: Prof. Dr. Tarcizo Afonso Nunes

COORDENADOR DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO: Prof. Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha

SUBCOORDENADORA DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO: Prof^a. Dr^a. Teresa Cristina de Abreu Ferrari

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIRURGIA: Prof. Dr. Marcelo Eller Miranda

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE OFTALMOLOGIA E OTORRINOLARINGOLOGIA:
Prof. Dr. Roberto Eustáquio Santos Guimarães

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA: Prof. Dr. Marcelo Dias Sanches

SUBCOORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA: Prof^a. Dr^a. Ivana Duval de Araújo

COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA

Prof. Dr. Alcino Lázaro da Silva

Prof^a. Dr^a. Ivana Duval de Araújo

Prof. Dr. Marcelo Dias Sanches

Prof. Dr. Márcio Bittar Nehemy

Prof. Dr. Renato Santiago Gomez

Prof. Dr. Tarcizo Afonso Nunes

Sumara Marques Barral - representante discente

A Alessandra, Gabriel e Pedro,
por compreenderem minha ausência.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Ivana Duval Araújo, por acolher a ideia deste estudo e por suas valorosas intervenções.

Ao Prof. Dr. Cláudio Leo Gelape, pelo incentivo para o início desta pesquisa e por toda a ajuda ao longo da mesma.

A toda a equipe do Laboratório de Radioisótopos da Faculdade de Farmácia da UFMG, aqui representado pelo Prof. Dr. Valbert Nascimento Cardoso e pela Prof^a. Dr^a. Simone Odília Fernandes Diniz, pelo apoio sem o qual nada do que foi realizado seria possível.

À Prof^a. Dr^a. Paula Vidigal, pelo apoio no estudo histológico.

Ao médico residente Otávio Pena Braga, pelo auxílio na execução do ato operatório.

Aos acadêmicos Bernardo Tarabal e Izabela Kunico, pela ajuda e pela dedicação.

Ao Biotério da Faculdade de Medicina da UFMG, por viabilizar este experimento.

“Tudo acontece conforme a natureza”.

Hipócrates 370 a.C.

RESUMO

INTRODUÇÃO: a cera de osso é frequentemente utilizada para a hemostasia do sangramento oriundo da porção esponjosa do esterno após esternotomia mediana. Seu uso já foi associado a maior incidência de infecção em estudos experimentais e clínicos. **OBJETIVO:** avaliar, por meio de cintilografia com antibiótico marcado, se a cera de osso atua como cofator que facilita a colonização e posterior infecção de esternotomias de ratos. **METODOLOGIA:** foram submetidas 19 ratas *wistar* à esternotomia mediana parcial superior. As feridas esternais foram tratadas ou não com cera de osso e contaminadas ou não com *Staphylococcus aureus*. Foram formados quatro grupos: controle (esternotomia), cera (esternotomia com uso de cera de osso), bactéria (esternotomia com contaminação bacteriana) e cerabactéria (esternotomia com uso de cera de osso e contaminação bacteriana). No oitavo dia após a cirurgia, os animais foram submetidos à análise cintilográfica da região esternal após 210 e 360 minutos da infusão da ceftizoxima marcada com o tecnécio-99 metaestável, seguido de contagem *ex vivo* da radioatividade do esterno, e estudo histológico. **RESULTADOS:** a comparação entre os grupos controle e cera não mostrou diferença significativa, sugerindo que a cera não alterou a captação do radiofármaco. Quando comparados os grupos controle e bactéria ($p= 0,03$, $p= 0,02$, $p=0,04$) e cera e cerabactéria ($p= 0,01$, $p= 0,02$, $p=0,009$), diferenças significativas foram encontradas em todas as leituras realizadas, respectivamente, aos 210 e 360 min e *ex vivo*. Isso indica que a cintilografia usando a ceftizoxima marcada com o tecnécio-99 metaestável teve boa acurácia em detectar a presença da bactéria nos animais que foram contaminados. Os grupos bactéria e cerabactéria não mostraram diferenças significativas nas leituras realizadas, mostrando que a cera de osso não facilitou a colonização da ferida esternal pela bactéria. **CONCLUSÃO:** a cera de osso não atuou como cofator na colonização de esternotomia de ratos.

Palavras-Chave: Mediastinite. Imagem com radionuclídeos. Esternotomia. Ratos.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Bone wax is commonly used for sternum hemostasis after median sternotomy. Its use has been associated with increased incidence of infection in experimental and clinical studies. **OBJECTIVE:** To evaluate if bone wax acts as a promoting factor to the colonization of rats sternotomies using radiolabeled antibiotic scintigraphy. **METHODOLOGY:** Ninety Wistar rats were subjected to partial upper median sternotomy. The sternal wounds were treated or not with bone wax and contaminated with *Staphylococcus aureus* or not. The rats were divided into four groups, control (sternotomy), wax (sternotomy using bone wax), bacteria (sternotomy with bacterial contamination) and waxbacteria (sternotomy using bone wax and bacterial contamination). Eight days after the surgery, the animals were subjected to scintigraphy of the sternal region 210 and 360 minutes after infusion of ceftizoxime labeled with technetium-99m, followed by *ex vivo* radioactivity counting of the sternum. **RESULTS:** Quantitative analysis of the scintigraphic data showed no significant differences between the control vs. wax groups, suggesting that wax did not alter the uptake of the radiopharmaceutical. When comparing the control vs. bacteria groups ($p = 0.03$, $p = 0.02$, $p = 0.04$) and wax vs. waxbacteria group ($p = 0.01$, $p = 0.02$, $p = 0.009$), significant differences were found in all the scannings, respectively, at 210 and 360 minutes and *ex vivo* counting, indicating that scintigraphy using labeled ceftizoxime with technetium-99m had good accuracy in determining which animals were infected. The waxbacteria and bacteria groups did not show significant differences in scintigraphy scanning data, meaning that bone wax did not facilitate colonization of sternal wound by the bacteria. **CONCLUSION:** Bone wax did not act as a promoting factor for the colonization of the sternal wounds in rats.

Key words: Mediastinitis, Radionuclide Imaging, Sternotomy, Rats

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

67Ga-Citrato	Citrato de gálio-67
^{99m} Tc-CFT	CFT marcada com Tc-99m
^{99m} Tc-MDP	Metilendifosfonato-tecnécio-99m
ANOVA	Análise de Variância
BF	Biofilme
C	Celsius
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CFT	Ceftizoxima
CO	Cera de osso
CPM/g	Contagem por minuto por grama
EM	Esternotomia mediana
FIG	Figura
g	Gramma
GRÁF	Gráfico
HE	Hematoxilina eosina
HMPAO	Hexametilpropileno amino-oxima
IBM	<i>International Business Machines</i>
IPEN	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
MBq	Megabecquerel
mCi	Milicurrie
MD	Mediastinite
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
Na ^{99m} TcO ₄ ⁻	Pertecnetato de sódio
nm	Nanômetro
pH	Potencial hidrogeniônico

ROI	Região de interesse
SPSS	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
TAB	Tabela
^{99m} Tc	Tecnécio-99 metaestável
UFC	Unidade formadora de colônia
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
vs	<i>Versus</i>

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figuras

FIGURA 1 – Mediastinite.....	18
FIGURA 2 – Cera de osso.....	19
FIGURA 3 – Esterno com cera de osso	21
FIGURA 4 – Corte transversal, esterno com cera de osso	21
FIGURA 5 – Biofilme bacteriano em cateter central, <i>Staphylococcus aureus</i> ..	23
FIGURA 6 – Gel bacteriano.....	28
FIGURA 7 – Divulsão retroesternal.....	30
FIGURA 8 – Esternotomia mediana parcial superior.....	30
FIGURA 9 – Esterno seccionado	31
FIGURA 10 – CO aplicada no esterno	31
FIGURA 11 – Inóculo bacteriano na ferida esternal	32
FIGURA 12 – Animais preparados para leitura.....	34
FIGURA 13 – Gama-câmara.....	34
FIGURA 14 – Alvo	35
FIGURA 15 – Esternectomia.....	36
FIGURA 16 – Imagens cintilográficas de animais submetidos a: esternotomia (controle), esternotomia e aplicação da CO (cera), esternotomia e contaminação do sitio cirúrgico (bactéria) ou esternotomia aplicação da CO e contaminação do sitio cirúrgico (cerabactéria).....	40
FIGURA 17 – Macroscopia da região do esterno de animais submetidos à esternotomia mediana contaminados com <i>Staphylococcus aureus</i>	46
FIGURA 18 – Infiltrado polimorfonuclear em ferida operatória do esterno de ratos após contaminação com <i>Staphylococcus aureus</i> e uso de CO. HE 400X.....	46

FIGURA 19 – Presença de material amorfo, podendo corresponder a ágar de soja tripcaseinado e lacunas que poderiam ter sido ocupadas por CO em ferida operatória do esterno de ratos após contaminação <i>Staphylococcus aureus</i> e uso de CO. HE 200X.....	47
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Gráficos

GRÁFICO 1 – Média e erro-padrão da contagem <i>in vivo</i> do alvo aos 210 minutos, após administração do ^{99m} Tc-CFT, em ratos submetidos à esternotomia.....	41
GRÁFICO 2 - Média e erro-padrão da contagem <i>in vivo</i> do alvo aos 360 minutos, após administração do ^{99m} Tc-CFT, em ratos submetidos à esternotomia.....	42
GRÁFICO 3 - Queda da contagem radioativa <i>in vivo</i> do alvo entre as leituras de 210 min e 360 min de animais submetidos a: esternotomia e contaminação do sítio cirúrgico (bactéria) ou esternotomia aplicação da CO e contaminação do sítio cirúrgico (cerabactéria).....	43
GRÁFICO 4 - Média e erro-padrão da contagem por minuto por grama de tecido (<i>ex vivo</i>), após administração do ^{99m} Tc-CFT, em ratos submetidos à esternotomia.....	44

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Média e desvio-padrão da contagem radioativa <i>in vivo</i> na área do esterno após 210 min ou 360 min da infusão do ^{99m} Tc-CFT em ratos submetidos à esternotomia.....	43
TABELA 2 - Média e desvio-padrão da contagem por minuto por grama de tecido (<i>ex vivo</i>) em ratos submetidos à esternotomia.....	45
TABELA 3 - Dados da avaliação histológica da esternotomia de ratos, no oitavo dia pós-operatório, após contaminação ou não da área operada com <i>Staphylococcus aureus</i> e uso ou não da CO.....	48
TABELA 4 - Dados globais dos animais.....	62
TABELA 5 - Medidas descritivas da leitura <i>in vivo</i> alvo, contagem total.....	63
TABELA 6 - Medidas descritivas da leitura <i>ex vivo</i> , contagem por minuto por grama.....	63
TABELA 7 - Comparação entre os grupos, pelo teste t de Student.....	64

SUMÁRIO¹

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 OBJETIVO.....	25
3 RELEVÂNCIA.....	26
4 MATERIAL E MÉTODO.....	27
4.1 Animais utilizados e cuidados dispensados.....	27
4.2 Desenho do experimento.....	27
4.3 Métodos.....	27
4.3.1 Preparação do inóculo bacteriano.....	27
4.3.2 Procedimento cirúrgico.....	28
4.3.2.1 Ato operatório.....	28
4.3.2.2 Cuidados pós-operatórios.....	32
4.3.3 Preparo do radiofármaco.....	32
4.3.4 Estudo cintilográfico.....	33
4.3.5 Morte dos animais.....	35
4.3.6 Estudo histológico.....	36
4.4 Análise estatística.....	37
4.5 Parecer ético.....	38
5 RESULTADOS.....	39
5.1 Pós-operatório.....	39
5.2 Imagens cintilográficas.....	39
5.3 Avaliação cintilográfica.....	40
5.4 Avaliação anátomo-histológica.....	45

¹ Este trabalho foi revisado de acordo com as novas regras ortográficas aprovadas pelo Acordo Ortográfico assinado entre os países que integram a Comunidade de Países de Língua Portuguesa (CPLP), em vigor no Brasil desde 2009. E foi formatado de acordo com a ABNT NBR 14724 de 17.04.2011. As referências bibliográficas estão no formato de Vancouver.

6 DISCUSSÃO.....	49
7 CONCLUSÃO.....	56
REFERÊNCIAS.....	57
ANEXOS E APÊNDICE.....	61

1 INTRODUÇÃO

As bases da cirurgia cardíaca remontam à metade do século passado. Inicialmente, o acesso ao coração e vasos da base era feito por meio de toracotomia, mas logo a esternotomia mediana (EM) surgiu como opção a essa técnica, devido ao melhor acesso às estruturas torácicas¹. Ainda hoje é considerada uma via de fácil execução, com ampla exposição ao mediastino, baixa morbidade e mortalidade, sendo bem tolerada pelos pacientes no período pós-operatório.

Apesar do avanço das técnicas minimamente invasivas, essa via é ainda a mais utilizada para o acesso ao coração^{2,3}, mas não é isenta de complicações. Entre as complicações, a mediastinite (MD) merece destaque. É uma infecção profunda da ferida operatória que se segue à esternotomia mediana, associada à osteomielite esternal com ou sem acometimento do espaço retroesternal⁴ (FIG. 1). A MD é importante causa de morbidade e mortalidade, com incidência que varia entre 0,25% e 8%^{2,5,6}. Sua mortalidade pode atingir até 47%, a despeito de tratamento adequado^{7,8}, tem também impacto negativo na sobrevida tardia dos pacientes⁷, e aumenta até três vezes os custos hospitalares⁹.

FIGURA 1 – Mediastinite



Fonte: Cardona *et al.* (2008)¹⁰.

Com o objetivo de prevenir essa complicação e os desfechos a ela relacionados, tem-se investigado sua fisiopatologia, prevenção e tratamento. O mecanismo fisiopatológico exato da MD é desconhecido. Enquanto alguns estudos sugerem haver contaminação intraoperatória, outros citam que bactérias endógenas estariam envolvidas na gênese da infecção. A instabilidade esternal, que para alguns autores seria o evento primordial, para outros é consequência do processo infeccioso. O mais provável é que essa seja uma condição multifatorial em que fatores relacionados ao paciente e à cirurgia estejam envolvidos^{11,12,13}. Obesidade, idade avançada, diabetes, tabagismo, doença pulmonar obstrutiva crônica e tempo cirúrgico prolongado são fatores de risco universalmente relacionados às infecções no pós-operatório e também estão entre os envolvidos no desenvolvimento da MD em várias casuísticas^{2,7,13,14}. Outros fatores como uso excessivo do eletrocautério, técnica utilizada para esternotomia e aplicação da cera de osso (CO) para hemostasia esternal podem ter alguma relevância na fisiopatologia da MD, entretanto, não há consenso sobre sua real importância^{6,15,16,17}.

A obtenção de hemostasia adequada faz parte da técnica operatória em qualquer intervenção. Mas a particularidade dos ossos planos, como o esterno, onde o sangramento oriundo da parte esponjosa não permite o emprego de cauterização e ligadura por meio de suturas, fez com que no século XVIII fossem usadas substâncias pastosas para obliteração dos canalículos medulares e interrupção do sangramento. Inicialmente, foram empregados mistura de ervas e cera de vela¹⁸.

A cera de osso (CO), da maneira como é conhecida hoje, foi desenvolvida pelo neurocirurgião inglês Sir Victor Horsley e utilizada pela primeira vez por Parker, em 1892¹⁸. O composto que foi chamado de cera asséptica era constituído de cera de abelha, óleo de amêndoa e ácido salicílico, tudo esterilizado por fervura e acondicionado em frascos de vidro. Por ser maleável e estéril, era mais adequado para ser usado em neurocirurgias do que a cera de vela comum que vinha sendo utilizada até então. A cera desenvolvida por Horsley é similar à que se utiliza hoje em dia, que é composta de cera de abelha (88%), e palmitato isopropílico (12%), acondicionado em envelopes de 2,5 g esterilizados por óxido de etileno^{19,20} (FIG. 2).

FIGURA 2 – Cera de osso



Fonte: do autor.

A hemostasia do esterno com CO é realizada pela maioria dos cirurgiões cardiovasculares (FIG. 3). Não se encontram na literatura relatos de como essa prática foi incorporada, entretanto, tudo leva a crer que se originou junto com a especialidade, provavelmente herdada dos neurocirurgiões e ortopedistas¹⁹. O baixo custo e sua eficácia em interromper o sangramento oriundo do esterno são responsáveis pela sua ampla utilização. A prova do tempo, porém, mostrou que o uso da CO não é inócuo.

Geary e Frantz, em 1950, foram os primeiros a relatar a CO como uma substância inabsorvível nos tecidos corpóreos. Sendo assim, poderia atuar como um corpo estranho e facilitar o desenvolvimento de infecções²¹. Tal suposição se confirmou em dois trabalhos experimentais, nos quais foi mostrado que a CO impedia os mecanismos imunológicos de atuarem, favorecendo a ocorrência de osteomielite²², e diminuía 10.000 vezes a quantidade de bactérias necessárias para o estabelecimento de infecção óssea²³.

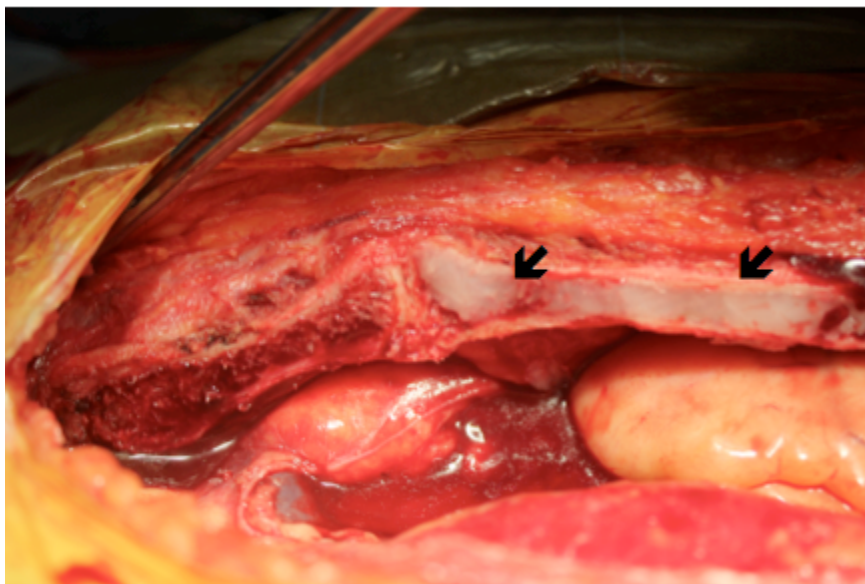
Efeitos adversos diretos na cicatrização óssea também foram relatados por vários autores, seja atuando como uma barreira mecânica impedindo a fusão óssea ou inibindo a atividade osteoblástica^{3,18,22,24}.

Robicsek *et al.*, baseados em observações clínicas, foram os primeiros cirurgiões cardiovasculares a sugerir a CO como facilitador da MD no pós-operatório. Os mesmos autores também demonstraram, em cães, a embolização pulmonar pela CO utilizada para hemostasia após EM²⁵.

A CO é utilizada com o intuito de impedir a cicatrização após cirurgias ortopédicas em que não se deseja a fusão ou crescimento ósseo²⁶. Seu uso foi associado a maior incidência de infecção após cirurgias da coluna²⁶. Em necrópsias realizadas em pacientes submetidos a cirurgias cardíacas, foi demonstrado que até 10 anos após o procedimento a CO ainda estava presente na cicatriz esternal, com reação inflamatória crônica intensa ao seu redor em 17 dos 18 casos analisados²⁷ (FIG. 4). Por outro lado, o único estudo clínico prospectivo randomizado que

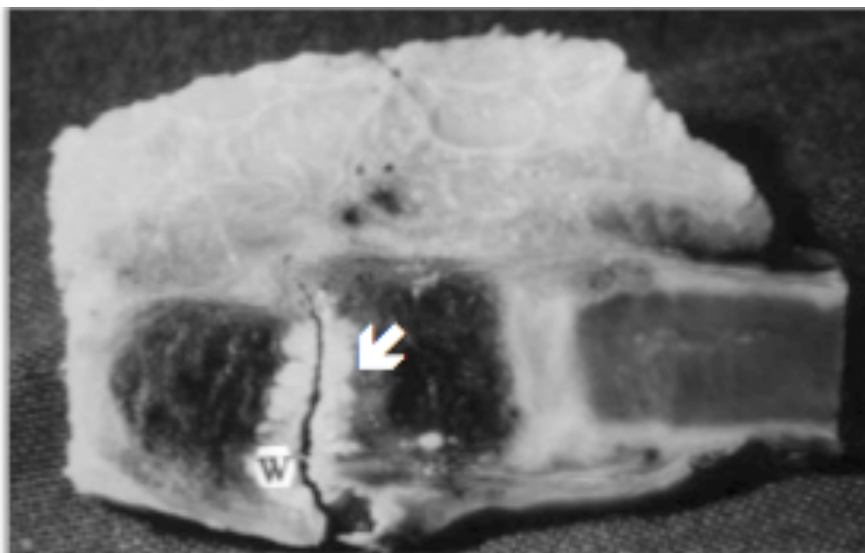
comparou o uso ou não da CO não demonstrou qualquer efeito adverso relacionado à CO, tampouco benefício com seu uso¹⁹.

FIGURA 3 – Esterno com cera de osso (seta)



Fonte: do autor.

FIGURA 4 – Corte transversal, esterno com cera de osso (seta)



Fonte: Sudmann *et al.* (2006)²⁷.

A contaminação e a posterior infecção associadas à presença de corpos estranhos, como a CO, podem ser decorrentes da formação de biofilme (BF) pelas

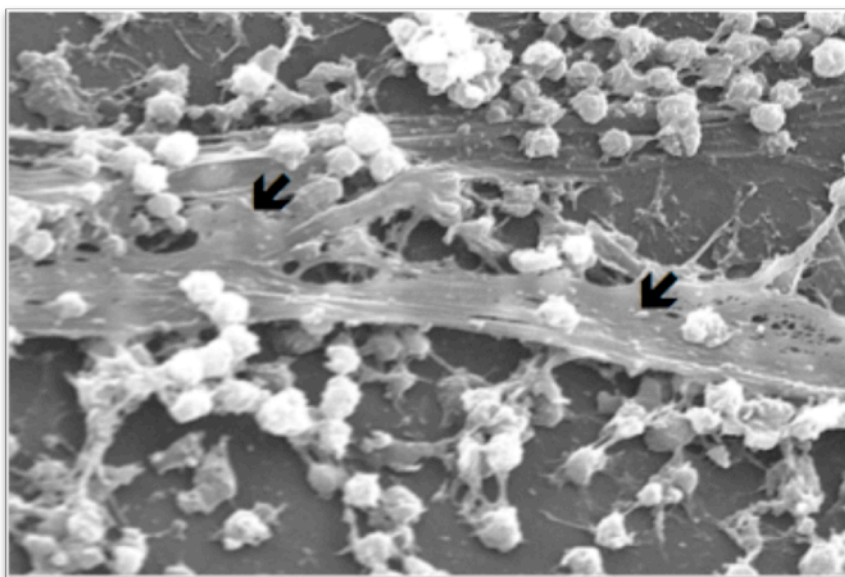
bactérias. O biofilme bacteriano pode ser definido como um conjunto de bactérias firmemente aderido a uma superfície inerte ou viva, englobado por uma matriz extracelular, composta de polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos, produzida pelas próprias bactérias²⁸ (FIG. 5). É uma forma séssil e adaptativa no ciclo biológico das bactérias, com características genotípicas e fenotípicas distintas que diferenciam o BF das formas bacterianas livres e circulantes. Essa forma de vida as tornam altamente resistentes a alterações de potencial hidrogeniônico (pH), à temperatura, à atividade dos antimicrobianos e às defesas do hospedeiro²⁹.

Os biofilmes podem desenvolver-se em superfície úmida, seja ela biótica ou abiótica, como sanitários, tubulação de água, pele e mucosas de animais (incluindo o homem), e próteses. A formação do BF no curso de determinada doença tem sérias implicações para o hospedeiro, já que as bactérias ali presentes estarão protegidas da ação de mecanismos adaptativos e inatos do sistema imunológico, como a ação de células fagocitárias, opsonização de anticorpos e atuação do sistema complemento, além de apresentarem sensibilidade diminuída aos antimicrobianos^{28,29}.

A remoção cirúrgica do substrato responsável pela infecção é frequentemente a única solução para infecções associadas à formação do BF. Infecções de dispositivo intravasculares e próteses ortopédicas são exemplos típicos dessa situação. A CO, por suas características físico-químicas, em teoria, é um bom substrato para a formação do BF³⁰.

O *Staphylococcus aureus* e o *Staphylococcus epidermidis* são os agentes causadores de mediastinite mais frequentemente isolados^{6,12,31}, ambas as bactérias sabidamente formadoras de BF^{28,29}. A interação entre essas bactérias e a CO, formando BF, explicaria o papel facilitador da infecção atribuído à CO.

FIGURA 5 – Biofilme bacteriano em cateter central,
Staphylococcus aureus



Matriz extracelular (seta) e cocos bacterianos.

Fonte: CDC (2012)³².

O diagnóstico de infecção no pós-operatório, principalmente infecção profunda e de próteses, esbarra em dificuldades técnicas relacionadas ao acesso ao local suspeito de infecção. Isso dificulta a coleta de material para a cultura, além dos sintomas que são pouco específicos e se confundem com outros comuns a diferentes afecções e pela baixa acurácia dos métodos radiológicos convencionais.

A cintilografia é uma subespecialidade da Medicina Nuclear que usa a radiação gama emitida por determinados radioisótopos e captada por uma gama-câmara para formar imagens bidimensionais. Tem como principal vantagem sobre a radiologia clássica fornecer informações importantes sobre a função do órgão que está sendo estudado³³. Seu uso vem mostrando resultados promissores no diagnóstico de infecções profundas e de próteses^{33,34,35}.

O tecnécio-99 metaestável (^{99m}Tc) é um radioisótopo emissor de radiação gama produto do decaimento do molibdênio-99. Possui excelentes qualidades para a aquisição de imagens cintilográficas, que aliadas à sua disponibilidade e ao

baixo custo de produção o tornaram o radioisótopo empregado em mais de 80% dos exames em Medicina Nuclear. É muito reativo quimicamente e, sendo um metal deficiente em elétrons, reage principalmente com grupos funcionais capazes de doar elétrons. A ceftizoxima (CFT) é uma cefalosporina de 3ª geração de amplo espectro que atua na síntese da parede celular bacteriana. Sua molécula possui vários grupos funcionais doadores de elétrons capazes de se ligarem ao Tc-99m. A CFT marcada com ^{99m}Tc ($^{99m}\text{Tc-CFT}$) se mostrou eficaz em diferenciar focos infecciosos de focos inflamatórios em um modelo experimental de osteomielite em ratos³⁵.

Com o objetivo de avaliar o papel da cera de osso como facilitador da colonização de esternotomias em modelo experimental, realizou-se o presente estudo.

2 OBJETIVO

Avaliar se a cera de osso atua como cofator que facilita a colonização e posterior infecção de esternotomias de ratos.

3 RELEVÂNCIA

Fornecer subsídios que permitam analisar criticamente o uso da cera de osso em seres humanos, orientando estudos experimentais e clínicos futuros que justifiquem ou não a continuidade de seu uso.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Animais utilizados e cuidados dispensados

Estudaram-se 20 ratos *Wistar* fêmeas, com peso médio de 220 g, provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Durante todo o período da experimentação os animais foram alojados no biotério da Faculdade de Medicina da UFMG, acondicionados em gaiolas coletivas de polipropileno com, no máximo, cinco animais por gaiola, recebendo à vontade água potável e ração padrão para ratos. Foram mantidos em sala climatizada e com luminosidade controlada artificialmente para ciclos de claro e escuro de 12 horas.

4.2 Desenho do experimento

Os animais foram aleatoriamente distribuídos em quatro grupos:

- Controle (n=3): esternotomia.
- Cera (n=3): esternotomia e aplicação de CO.
- Bactéria (n=7): esternotomia com contaminação bacteriana.
- Cerabactéria (n=7): esternotomia, aplicação de CO e contaminação bacteriana.

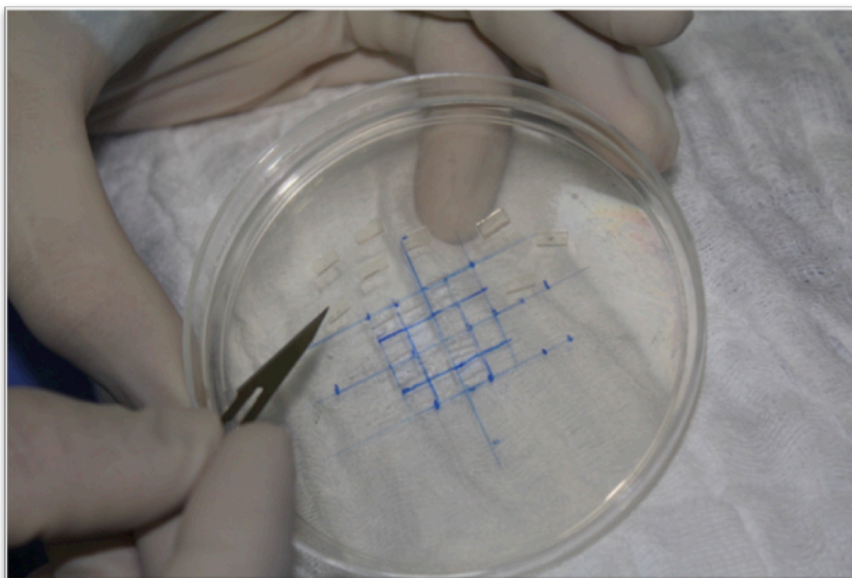
4.3 Método

4.3.1 Preparação do inóculo bacteriano

Para a preparação do gel bacteriano utilizado nos grupos bactéria e cerabactéria, utilizou-se cepa de *Staphylococcus aureus* (ATCC6538-P) multissensível. As colônias da bactéria foram cultivadas em ágar antibiótico n^o 1,

suspensas em solução salina estéril e sua concentração ajustada por espectrofotometria em 11% de transmitância a 580 nm, correspondendo a 1×10^9 UFC/mL. Posteriormente, uma alíquota de 1 mL da suspensão foi homogeneizada com 9 mL de ágar soja tripticaseína e distribuído em placa de Petri de 80 mm de diâmetro. No dia da cirurgia, o fundo da placa foi delimitado em quadrados de 5 mm de lado e cada quadrado foi dividido em dois retângulos iguais, utilizando lâmina de bisturi nº 11, com área de $12,5 \text{ mm}^2$. Conhecendo a área da placa de Petri pela fórmula $A = \pi r^2$, determinou-se que cada retângulo equivalia a 1/400 da área da placa, contendo $2,5 \times 10^6$ UFC (FIG. 6).

FIGURA 6 – Gel bacteriano



Fonte: do autor.

4.3.2 Procedimento cirúrgico

4.3.2.1 Ato operatório

Os animais foram operados sob condições de antissepsia em bancada higienizada com álcool a 70% e coberta com campo cirúrgico estéril trocado a cada procedimento. Todo o instrumental cirúrgico foi esterilizado com solução de

glutaraldeído a 2%. As lâminas e agulhas utilizadas eram descartáveis e o cirurgião usava gorro, máscara, avental cirúrgico e luvas estéreis descartáveis trocadas a cada procedimento.

A anestesia foi realizada com xilazina a 2% (5 mg/kg) e quetamina a 10% (40 mg/kg) administradas intraperitonealmente. Após a obtenção do plano anestésico, o animal era submetido à tonsura na linha mediana do tórax, posicionado em decúbito dorsal em placa de isopor plastificada e higienizada com álcool a 70% e imobilizado a partir da contenção das patas e da cauda com fita adesiva. Realizou-se degermação com polivinilpirrolidona iodo degermante, sendo utilizadas duas compressas estéreis fenestradas como campos cirúrgicos.

Feita incisão na linha média do tórax até o plano ósseo empregando lâmina de bisturi nº 15 em extensão de 1 cm a partir da fúrcula esternal, procedeu-se à divulsão romba com pinça hemostática do plano retroesternal. Seccionou-se o terço superior do esterno com tesoura reta de ponta fina e aplicada CO, sempre a mesma quantidade, entre as bandas esternais nos animais dos grupos em que foi previsto o seu uso. Depois, realizou-se esternorrafia com ponto simples de *nylon* 3-0.

Nos grupos em que estava prevista contaminação bacteriana, a mesma foi realizada utilizando-se os retângulos do gel bacteriano, previamente preparados, que eram colocados sobre o esterno. Após, procedia-se à sutura do panículo carnoso e pele com pontos separados a Donatti com *nylon* 3-0 (FIG. 7 a 11).

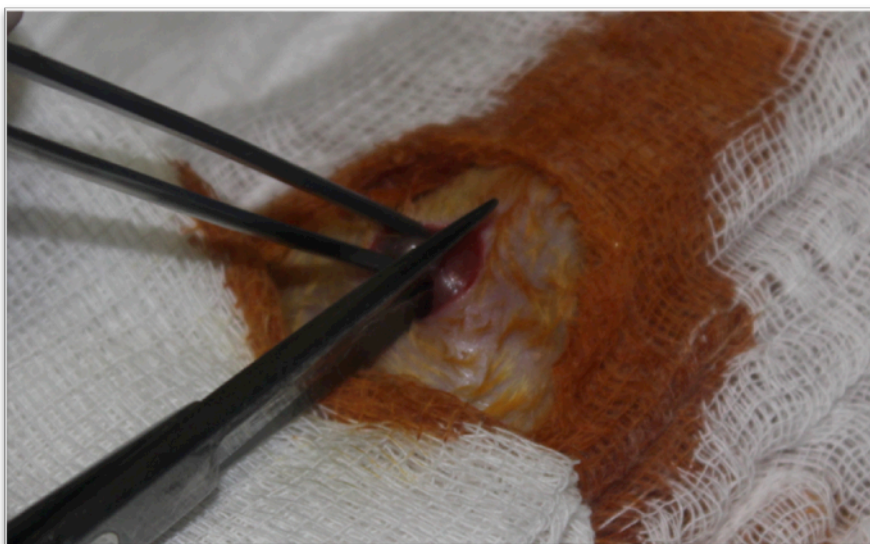
FIGURA 7 – Divulsão retroesternal



Divulsão com pinça hemostática curva (seta).

Fonte: do autor.

FIGURA 8 - Esternotomia mediana parcial superior



Fonte: do autor.

FIGURA 9 – Esterno seccionado (seta)



Fonte: do autor.

FIGURA 10 – CO(seta) aplicada no esterno



Fonte: do autor.

FIGURA 11 – Inóculo bacteriano(seta) na ferida esternal



Fonte: do autor.

4.3.2.2 Cuidados pós-operatórios

Após recuperação anestésica, os animais eram retornados para gaiolas coletivas, onde recebiam acetaminofeno em solução oral na dose de 2 mg/mL na água do bebedouro, durante 48 horas. Água e ração eram oferecidos à vontade. Os animais tiveram boa evolução pós-operatória, voltando a ingerir água e ração nas primeiras 12 horas após o procedimento, assim permanecendo até o final do experimento.

4.3.3 Preparo do radiofármaco

O procedimento completo da marcação da CFT foi realizado de acordo com Diniz *et al.* 2008³⁵, no Laboratório de Radioisótopos da Faculdade de Farmácia da UFMG. Resumidamente, o reagente liofilizado de ceftizoxima (Cefizox®, Smith-Kline) foi marcado com 1,2 mL de solução de pertecnetato de sódio ($\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$), contendo atividade de 444 MBq (12 mCi), Instituto de Pesquisas Energéticas e

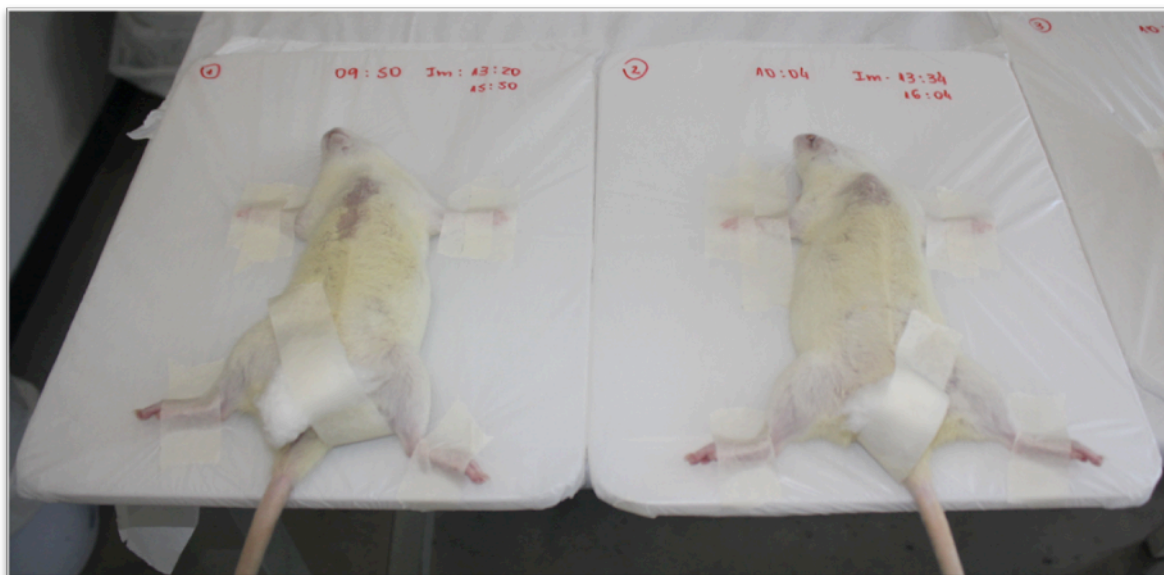
Nucleares (IPEN), Brasil, o radiofármaco foi incubado por 10 minutos em banho fervente (100⁰C) e, posteriormente resfriado em água corrente por 5 minutos. Após o resfriamento, a solução foi filtrada em membrana de éster de celulose de 0,22 mm e recolhida em um frasco a vácuo.

4.3.4 Estudo cintilográfico

No oitavo dia após a cirurgia, os animais foram transportados para o Laboratório de Farmácia Nuclear da Faculdade de Farmácia da UFMG. Após sedação com xilazina (5 mg/kg) e quetamina (40 mg/kg) administradas intraperitonealmente, o animal recebeu dose de 0,1 mL de ^{99m}Tc-CFT (1,8 MBq) pela veia da cauda (FIG. 12).

Após 210 e 360 minutos da injeção do fármaco, os animais eram novamente sedados e as imagens cintilográficas realizadas com os mesmos em decúbito dorsal sob gama-câmara equipada com um colimador de baixa energia para a aquisição das imagens estáticas planares (10 minutos) usando-se uma matriz de 256 x 256 pixels (NuclideTM TH 22, Mediso, Hungria, FIG. 13). As imagens foram analisadas determinando-se a radioatividade na região de interesse (ROI) delineada em torno da área esternal (alvo) por um retângulo que abrangia todo o esterno do animal (FIG. 14). A radioatividade do alvo (A) foi calculada a partir da contagem total obtida em 10 minutos.

FIGURA 12 – Animais preparados para leitura



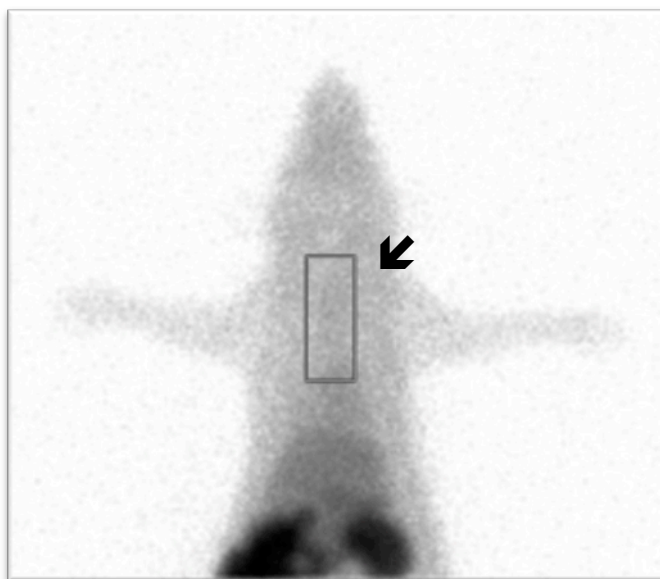
Fonte: do autor.

FIGURA 13 - Gama-câmara



Fonte: do autor.

FIGURA 14 – Alvo (seta)



Fonte: do autor.

4.3.5 Morte dos animais

Os animais, ainda sob sedação, eram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical imediatamente após o término da leitura de 360 minutos. Feito isso, era realizada a esternectomia (FIG. 15), a peça cirúrgica era pesada e a radioatividade determinada em contagem durante um minuto utilizando-se um contador do tipo poço (Wizard, Turku/Finlândia). A contagem obtida era dividida pelo peso do esterno e os resultados anotados em contagem por minuto por grama de esterno (CPM/g). Feito isso, o osso era armazenado em formol tamponado a 10% e estocado por duas semanas, para decaimento da radioatividade juntamente com as carcaças dos animais, segundo normas do Laboratório de Farmácia Nuclear da Faculdade de Farmácia da UFMG.

FIGURA 15 – Esternectomia



Fonte: do autor.

4.3.6 Estudo histopatológico

Duas semanas depois do procedimento cirúrgico, os esternos foram encaminhados para estudo histológico. O material foi submetido a desidratação com álcool, diafanização em xilol e inclusão em parafina. Os blocos de parafina foram cortados em micrótomo com espessura de 5 micrômetros e as lâminas coradas com hematoxilina e eosina (HE).

As lâminas foram avaliadas por médico patologista que desconhecia a que grupo pertencia a amostra e descritas de acordo com os seguintes critérios:

- Grau do infiltrado inflamatório (ausente a leve ou moderado a acentuado).
- Tipo de infiltrado inflamatório (mononuclear, polimorfonuclear, misto).
- Presença de células gigantes.
- Grau da angiogênese (ausente a leve ou moderada a acentuada).
- Grau da fibroplasia (ausente a leve ou moderado a acentuado).

O infiltrado inflamatório foi graduado como ausente; discreto, com células distribuídas de forma esparsa com grandes áreas livres; moderado, com células constituindo agregados densos, mas ainda com áreas livres; intenso, com agregados celulares densos e contínuos sem áreas livres. No infiltrado inflamatório também foi observado o tipo celular predominante.

A deposição do colágeno foi graduada como ausente; discreta, quando as fibras estavam distribuídas esparsamente em pequena quantidade ao redor dos fibroblastos; moderada, quando havia feixes de fibras espessas intercaladas com tecido conjuntivo frouxo; intensa, quando havia grande quantidade de fibras colágenas espessas e compactas depositadas sem áreas de tecido conjuntivo frouxo.

A neoformação vascular foi graduada como discreta nos casos em que se observavam vasos sanguíneos de forma esparsa, com áreas livres entremeadas (até 10 vasos por campo); moderada, quando havia 12 a 15 vasos por campo; e intensa, quando ultrapassava este número.

4.4 Análise estatística

Os dados foram analisados por meio do *software* de análise estatística *Statistical Package for Social Sciences (SPSS) 21 International Business Machines (IBM)* e comparados pelo teste Kolmogorov-Smirnof para verificação da normalidade dos dados da amostra. Os dados quantitativos foram comparados pelo teste de Análise de Variância (ANOVA) e teste t de Student, considerando-se significativas as diferenças para $p < 0,05$. Os dados qualitativos foram comparados pelo teste exato de Fisher sendo significativas as diferenças para $p < 0,05$.

4.5 Parecer ético

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), com o número de protocolo 143/2011 (ANEXO A).

5 RESULTADOS

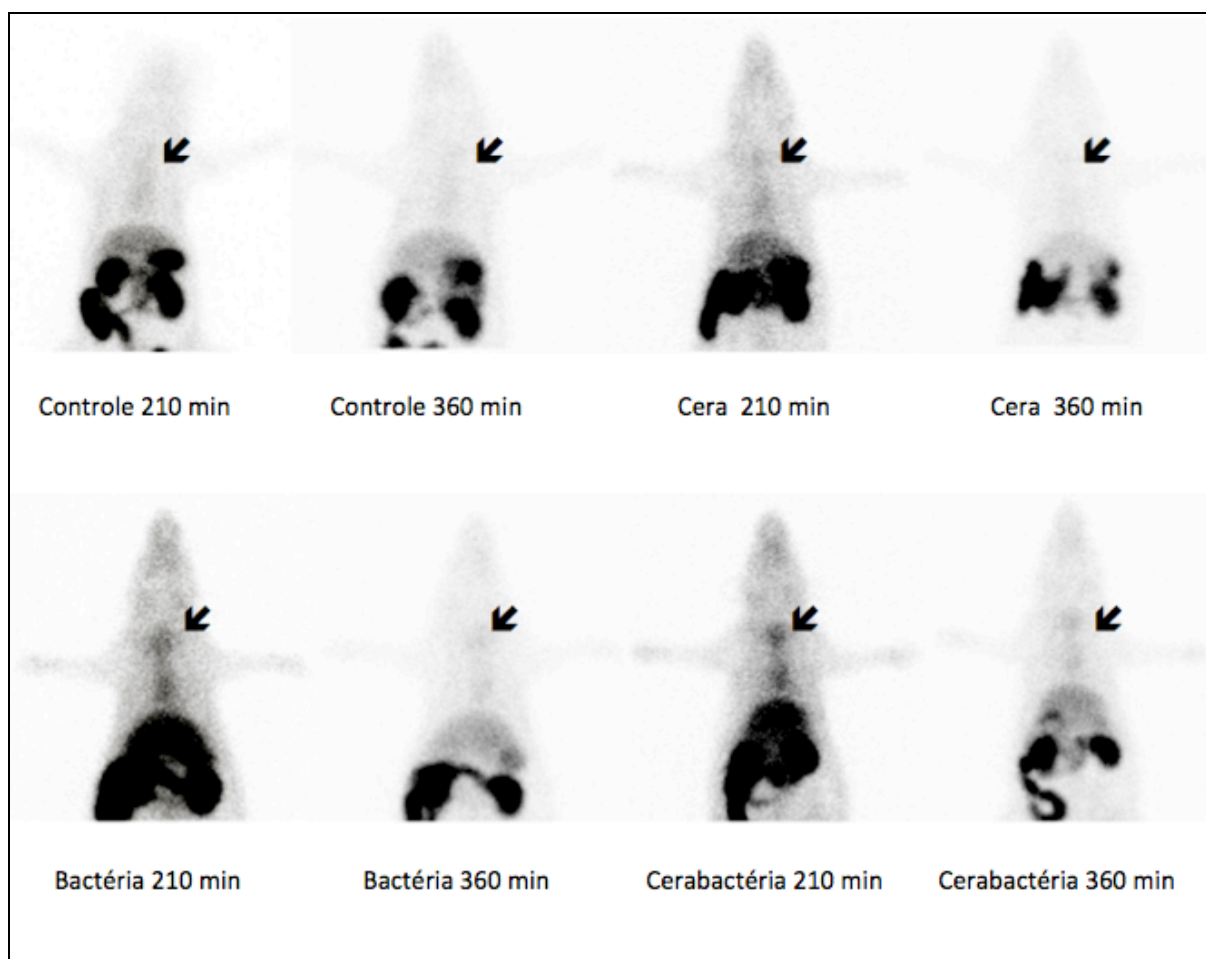
5.1 Pós-operatório

Todos os animais, com exceção de um que morreu imediatamente após o procedimento cirúrgico provavelmente em decorrência de um pneumotórax, tiveram boa evolução pós-operatória. A ferida operatória de todos eles mostrava-se íntegra, seca e sem sinais flogísticos no dia final do experimento.

5.2 Imagens cintilográficas

A avaliação qualitativa das imagens revelou que o ^{99m}Tc -CFT apresentou boa fixação na área do esterno (alvo) aos 210 min e 360 min naqueles animais que haviam sido contaminados, como pode ser observado na FIG. 16.

FIGURA 16 – Imagens cintilográficas de animais submetidos a: esternotomia (controle), esternotomia e aplicação da CO (cera), esternotomia e contaminação do sítio cirúrgico (bactéria) ou esternotomia aplicação da CO e contaminação do sítio cirúrgico (cerabactéria)



Imagens obtidas após 210 min ou 360 min da administração do ^{99m}Tc -CFT.

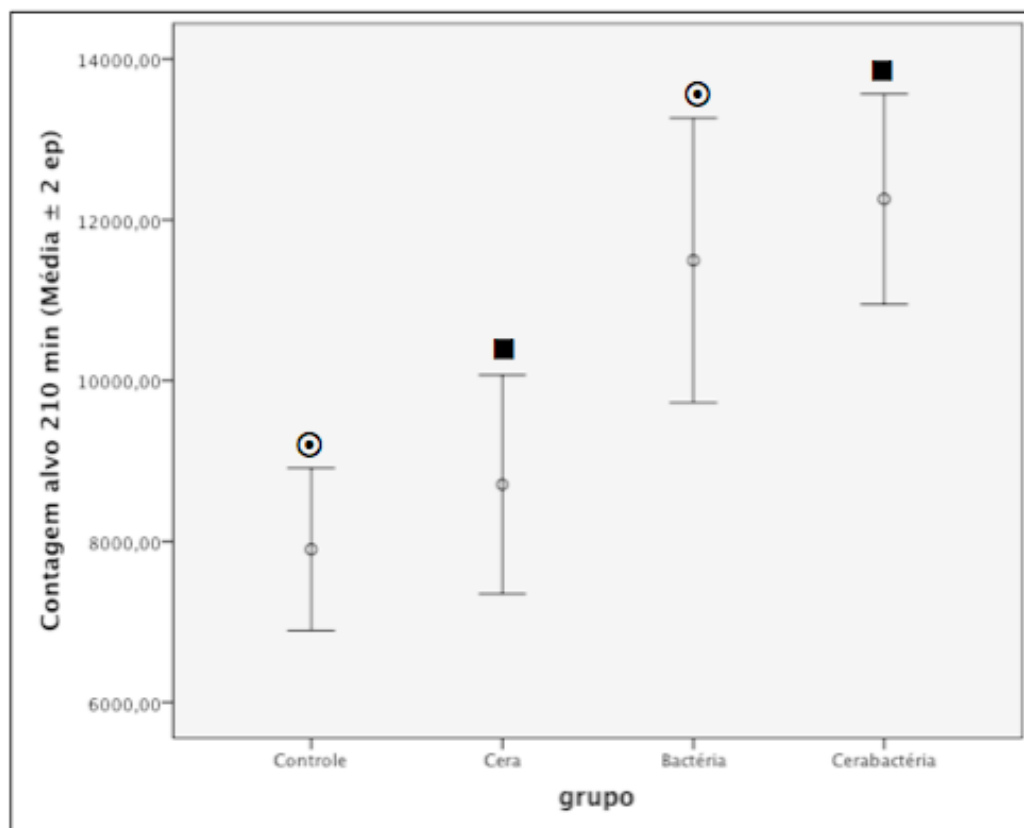
Fonte: do autor.

5.3 Avaliação cintilográfica

A contagem *in vivo* da radioatividade na região operada, medida pela contagem total na área alvo (esterno) após 210 minutos da injeção do radiofármaco, mostrou valores de $7902,3 \pm 874,2$ no grupo controle, $8708 \pm 1177,4$ no grupo cera, $11495,5 \pm 2167,7$ no grupo bactéria e $12258,2 \pm 1729$ no grupo cerabactéria. Não houve diferença significativa quando comparados os grupos: controle vs. cera ($p=0,395$) e bactéria vs. cerabactéria ($p=0,495$). Entretanto, houve

diferença quando comparados os grupos: controle vs. bactéria ($p=0,03$) e cera vs. cerabactéria ($p=0,01$, GRÁF. 1, TAB. 1).

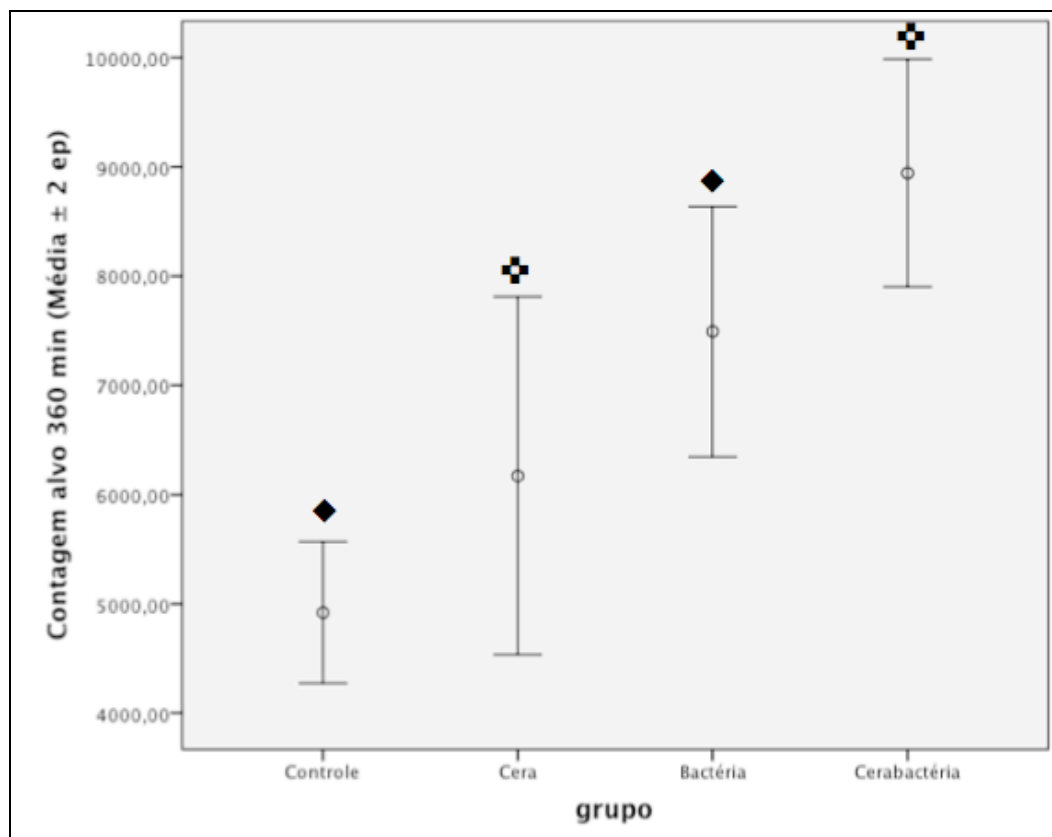
GRÁFICO 1 – Média e erro-padrão da contagem *in vivo* do alvo aos 210 minutos, após administração do ^{99m}Tc -CFT, em ratos submetidos à esternotomia



○ $p=0,03$ ■ $p=0,01$.

Após 360 minutos da injeção do radiofármaco, os valores da contagem do alvo foram: $4920,6 \pm 562,9$ no grupo controle, $6170,3 \pm 1419,3$ no grupo cera, $7492,4 \pm 1403,5$ no grupo bactéria, $8942,3 \pm 1378,3$ no grupo cerabactéria. Não houve diferença significativa quando comparados os grupos: controle vs. cera ($p=0,229$) e bactéria vs. cerabactéria ($p=0,088$). E quando comparados os grupos controle vs. bactéria houve diferença significativa ($p=0,02$), o mesmo ocorrendo quando comparados os grupos cera vs. cerabactéria ($p=0,02$, GRÁF. 2, TAB. 1).

GRÁFICO 2 - Média e erro-padrão da contagem *in vivo* do alvo aos 360 minutos, após administração do ^{99m}Tc -CFT, em ratos submetidos à esternotomia



◆ $p=0,02$ ✚ $p=0,02$.

A queda percentual da contagem radioativa entre as leituras de 210 min e 360 min foi mais acentuada no grupo cerabactéria (34,82%) quando comparado ao grupo bactéria (27,05%) (GRÁF. 3), porém sem diferença significativa.

GRÁFICO 3 - Queda da contagem radioativa *in vivo* do alvo entre as leituras de 210 min e 360 min de animais submetidos a: esternotomia e contaminação do sítio cirúrgico (bactéria) ou esternotomia aplicação da CO e contaminação do sítio cirúrgico (cerabactéria)

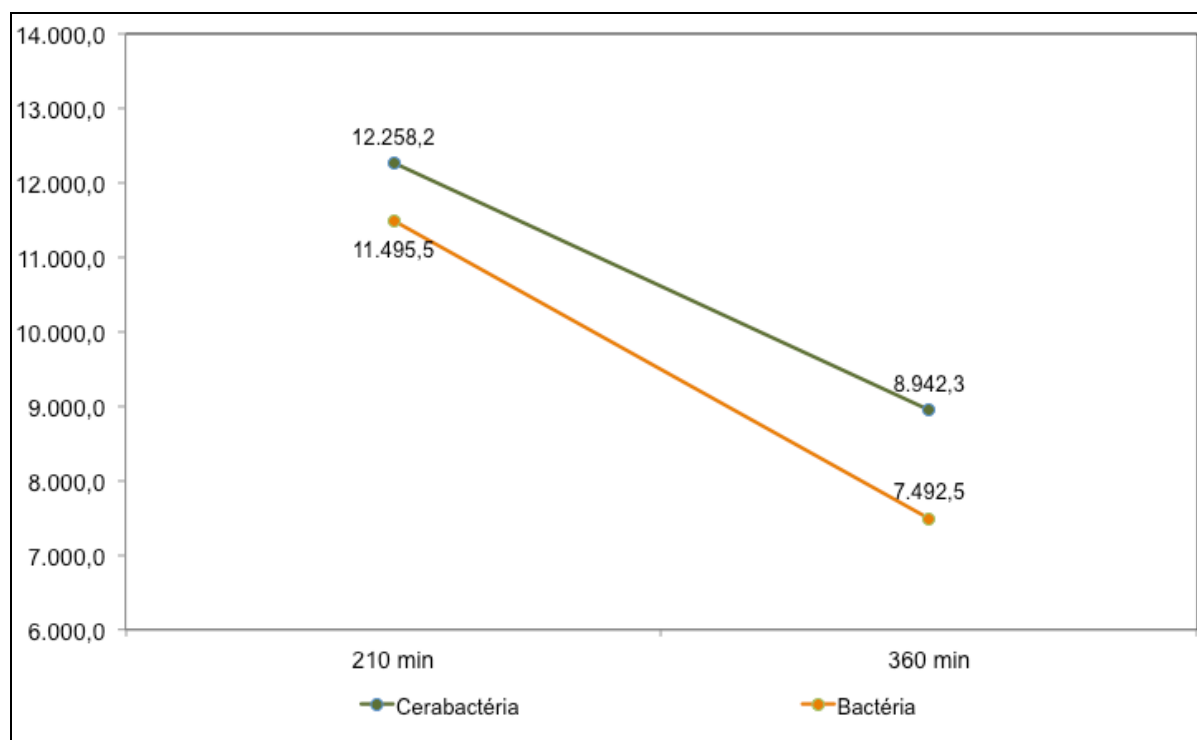
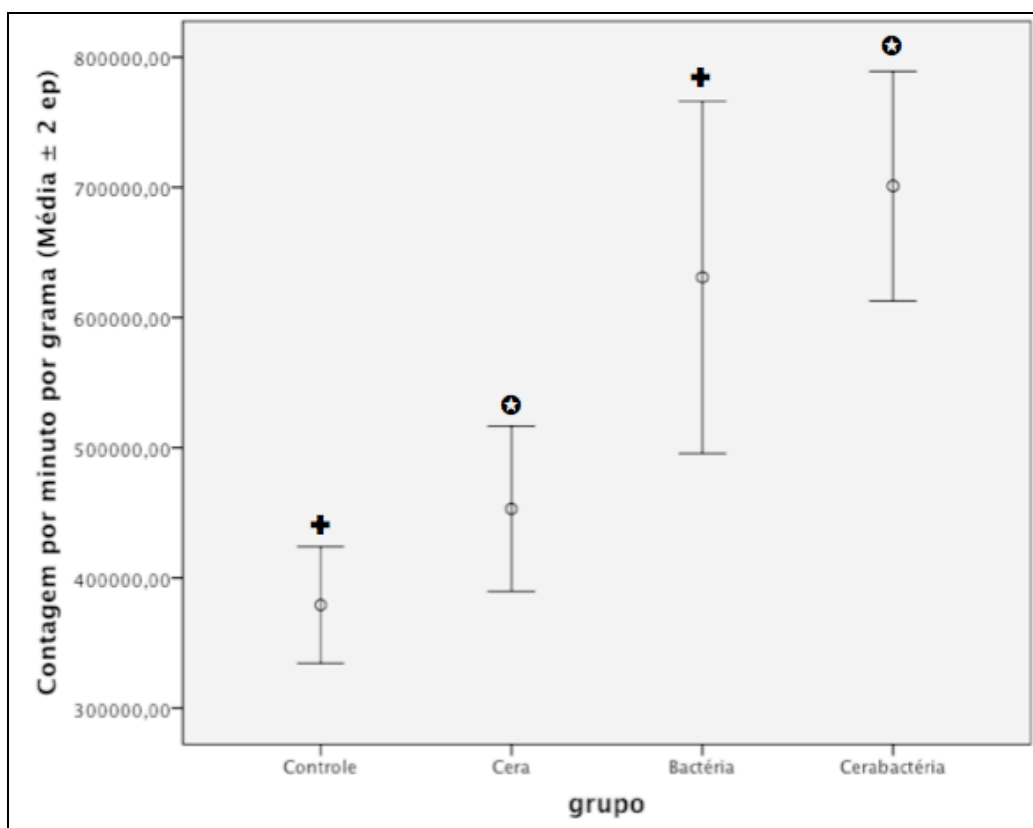


TABELA 1 – Média e desvio-padrão da contagem radioativa *in vivo* na área do esterno após 210 min ou 360 min da infusão do $^{99m}\text{Tc-CFT}$ em ratos submetidos à esternotomia

Grupo	Contagem <i>in vivo</i> alvo 210 min	Contagem <i>in vivo</i> alvo 360 min
Controle	7902,3 ± 874,2	4920,6 ± 562,9
Cera	8708 ± 1177,4	6170,3 ± 1419,3
Bactéria	11495,5 ± 2167,7	7492,4 ± 1403,5
Cerabactéria	12258,2 ± 1729	8942,3 ± 1378,3

As medidas da radioatividade *ex vivo*, em CPM/g, evidenciou valores de: $379,3 \pm 38,7 \times 10^3$ no grupo controle, $453,1 \pm 54,9 \times 10^3$ no grupo cera, $631,0 \pm 165,7 \times 10^3$ no grupo bactéria e $701,1 \pm 116,7 \times 10^3$ no grupo cerabactéria. Não se registrou diferença significativa quando comparados os grupos: controle vs. cera ($p=0,13$) e bactéria vs. cerabactéria ($p=0,391$) (TAB. 2, GRÁF. 3). A CPM/g foi significativamente mais alta no grupo bactéria quando comparado ao grupo-controle ($p=0,04$); e no grupo cerabactéria quando comparado ao grupo cera ($p=0,009$, GRÁF. 4).

GRÁFICO 4 - Média e erro-padrão da contagem por minuto por grama de tecido (*ex vivo*), após administração do $^{99m}\text{Tc-CFT}$, em ratos submetidos à esternotomia



+ p= 0,04 * p= 0,009.

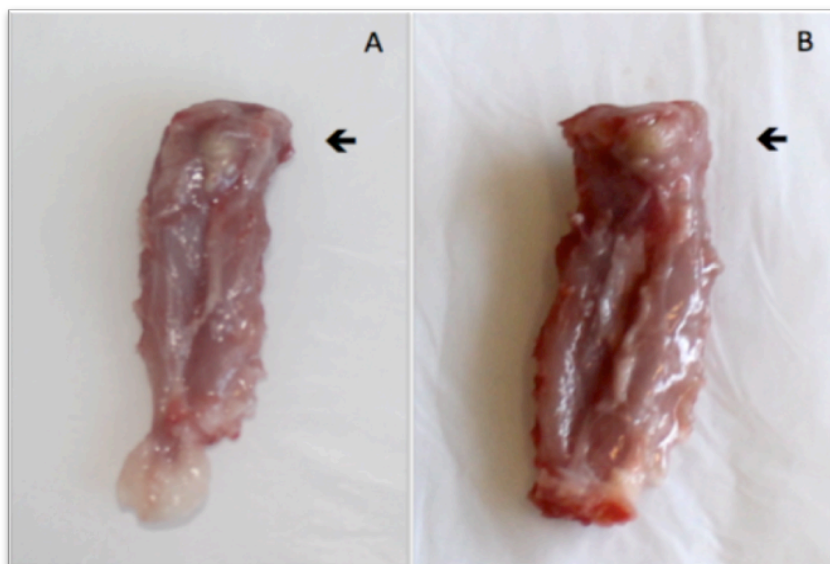
TABELA 2 - Média e desvio-padrão da contagem por minuto por grama de tecido (*ex vivo*) em ratos submetidos à esternotomia

Grupo	Contagem por minuto por grama de tecido
Controle	379.260,3 ± 38.731,4
Cera	453.113,0 ± 54.895,2
Bactéria	630.977,5 ± 165.654,4
Cerabactéria	701.077,1 ± 116.625,0

5.4 Avaliação anátomo-histológica

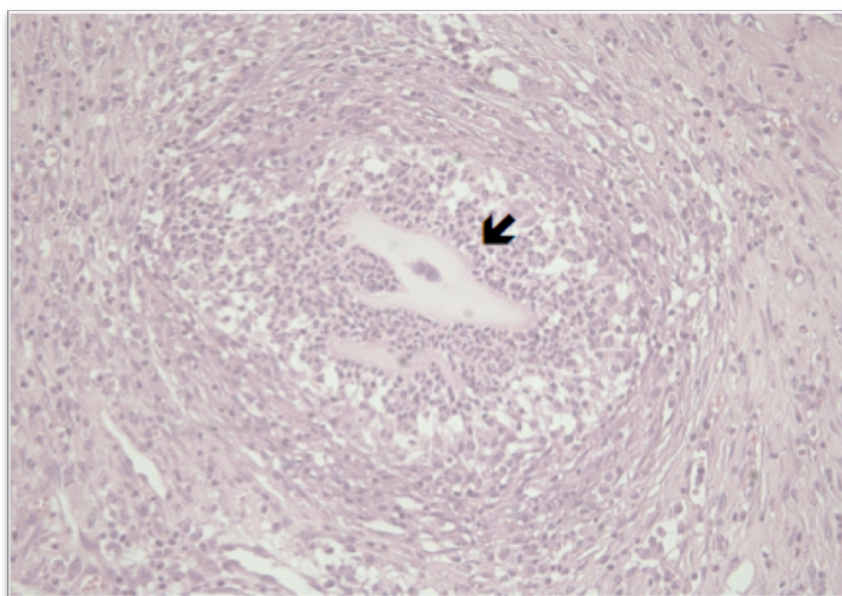
À avaliação macroscópica, todos os esternos apresentavam, no terço superior, sinais de intensa reação inflamatória. Aqueles que foram inoculados com bactéria mostravam formação de processo nodular encapsulado (FIG. 17), porém sem secreção purulenta. A avaliação histológica do terço proximal do esterno não ressaltou diferença entre os grupos, em relação aos parâmetros: angiogênese ($p=0,386$) e fibroplasia ($p=0,078$). Todos os animais dos grupos bactéria e cerabactéria tinham acentuado infiltrado inflamatório do tipo polimorfonuclear (FIG. 18 e 19), enquanto todos dos grupos controle e cera exibiram leve infiltrado do tipo mononuclear. Não foram observadas células gigantes em qualquer dos animais do experimento (TAB. 3).

FIGURA 17 – Macroscopia da região do esterno de animais submetidos à esternotomia mediana contaminados com *Staphylococcus aureus*



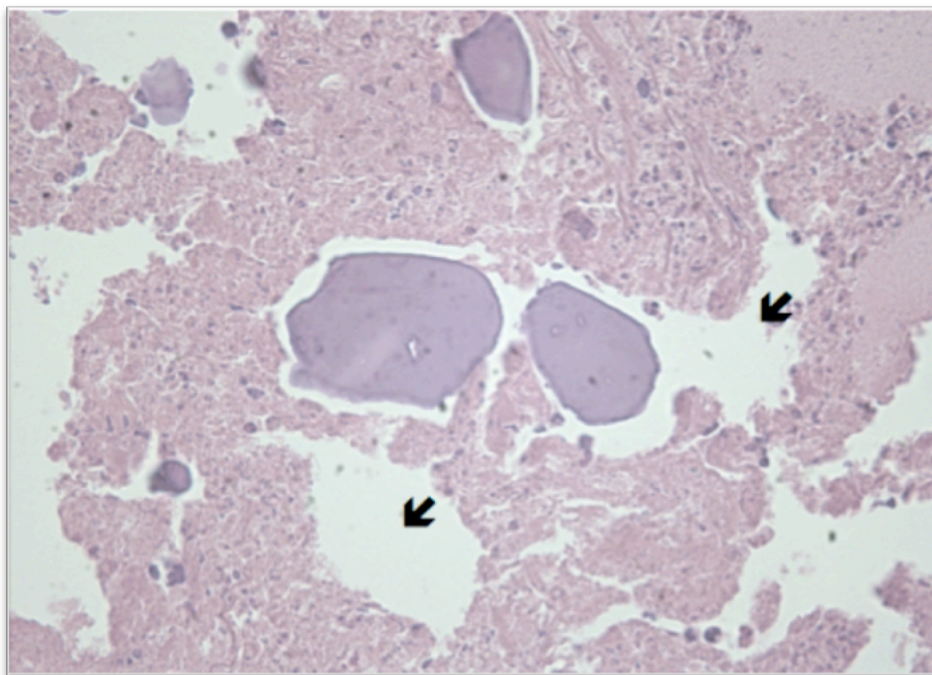
Sem uso de CO (A) e com uso de CO (B). Na seta processo nodular encapsulado. Fonte: do autor.

FIGURA 18 – Infiltrado polimorfonuclear em ferida operatória do esterno de ratos após contaminação com *Staphylococcus aureus* e uso de CO. HE 400X.



No centro material amorfo podendo corresponder a ágar de soja tripcaseinado com aglomerados de bactérias (seta). Fonte: do autor.

FIGURA 19 – Presença de material amorfo, podendo corresponder a ágar de soja tripcaseinado e lacunas (seta) que poderiam ter sido ocupadas por CO em ferida operatória do esterno de ratos após contaminação *Staphylococcus aureus* e uso de CO. HE 200X.



Fonte: do autor.

TABELA 3 - Dados da avaliação histológica da esternotomia de ratos, no oitavo dia pós-operatório, após contaminação ou não da área operada com *Staphylococcus aureus* e uso ou não da CO

Característica	Grupo			
	Controle	Cera	Bactéria	Cerabactéria
Infiltrado				
Ausente/Leve	3	3	0	0
Moderado/Acentuado	0	0	6	7
p < 0,001				
Tipo de célula				
Mononucleares	3	3	0	0
Polimorfonucleares	0	0	6	7
p < 0,001				
Angiogênese				
Ausente/Leve	1	0	1	0
Moderado/Acentuado	2	3	5	7
p = 0,386				
Fibroplasia				
Ausente/Leve	0	0	3	0
Moderado/Acentuado	3	3	3	7
p = 0,078				
Células Gigantes				
Ausente	3	3	6	7
Presente	0	0	0	0

A probabilidade de significância refere-se ao teste exato de Fisher.

6 DISCUSSÃO

As complicações relacionadas à cicatrização esternal, pela sua gravidade e manejo terapêutico difícil, sempre foram um desafio para os cirurgiões cardiovasculares. Entre essas complicações, destaca-se a mediastinite (MD). A MD esta associada a alta morbidade e mortalidade. Mesmo quando tratada de maneira adequada, tem resultados nem sempre bem-sucedidos. Além dos altos custos financeiros para o sistema médico-hospitalar, há o sofrimento tanto para o paciente quanto seus familiares, que são envolvidos em um doloroso e lento processo de recuperação. Isso faz com que sua prevenção seja fundamental. Identificar fatores modificáveis relacionados ao ato operatório que possam favorecer a ocorrência de MD, como o uso da CO, pode contribuir para diminuir a morbimortalidade associada a essa complicação^{2,4,6,11,13}.

A CO promove hemostasia a partir da oclusão de canalículos vasculares da porção esponjosa dos ossos planos, interrompendo instantaneamente o sangramento. É fácil de manusear e seu custo é baixo quando comparado ao de outros agentes hemostáticos. No entanto, impede a osteogênese e, por conseguinte, prejudica a cicatrização óssea^{18, 19, 26}.

Granulomas ósseos secundários à reação do tipo corpo estranho têm sido amplamente descritos na literatura como complicação do uso de CO em cirurgias ortopédicas, neurocirurgia, cirurgia dentária e após esternotomias^{24,26,27}. Além disso, a CO pode embolizar para a circulação pulmonar²⁵ e parece impedir a depuração bacteriana, agindo como um nicho para infecção^{22,23}. Sua presença, quando associada à colonização bacteriana, pode propiciar a formação de BF, o que pode impedir a atuação de mecanismos imunológicos do hospedeiro, propiciando o aumento da população bacteriana e facilitando a infecção³⁶. Isso explica os resultados de trabalhos anteriores que demonstraram ser a CO um facilitador de infecção em modelos experimentais de osteomielite^{22,23}. Enfatiza-se que o único estudo clínico prospectivo randomizado que comparou o uso ou não

da CO em pacientes submetidos à cirurgia de revascularização do miocárdio mostrou que aqueles que haviam usado a CO tiveram duas vezes mais infecção, entretanto, a diferença não foi significativa. Ressalta-se que a taxa global de MD neste estudo foi baixa (0,75%). No que se refere a sangramento pós-operatório, necessidade de reexploração cirúrgica para revisão da hemostasia e uso de hemoderivados, nenhuma diferença foi realçada entre os grupos¹⁹. Apesar dos possíveis inconvenientes e da ausência de benefícios, a CO é usada de forma liberal por cirurgiões cardiovasculares^{14,19,27}.

Estudos experimentais prévios que avaliaram a cicatrização esternal em ratos realizaram esternotomia mediana total, que reproduz o que acontece em seres humanos. Porém, visto que o limite entre o mediastino e o espaço pleural nos ratos é tênue e dificilmente não é invadido após esternotomia mediana total, são necessários a intubação orotraqueal e o suporte ventilatório durante o ato operatório, o que aumenta consideravelmente a complexidade do experimento^{31,37}. A esternotomia mediana parcial superior, como realizado por Ozcan *et al.*³⁸, permitiu que o experimento fosse realizado sem invadir a cavidade pleural, dispensando o suporte ventilatório.

O uso de um corpo estranho associado à inoculação bacteriana e ao trauma ósseo constitui o modelo básico para osteomielite em animais³⁶. A CO, nesse estudo, fez o papel do corpo estranho. Nossos resultados revelaram, entretanto, que a CO não foi indispensável para o desenvolvimento do processo infeccioso. A carga bacteriana utilizada, de $2,5 \times 10^5$ UFC, foi estabelecida com base nos dados de Barnea *et al.*³¹, que encontraram que entre 10^5 a 10^7 UFC de *Staphylococcus aureus* era o inóculo necessário para causar MD com baixa mortalidade dos animais. Apesar do exame macroscópico da ferida operatória dos animais infectados, ao final do experimento, não exibir sinais clínicos de MD, os dados histológicos mostraram infiltrado inflamatório do tipo polimorfonuclear intenso, sugerindo resposta aguda a um processo infeccioso. Isso comprova a eficácia do modelo em provocar infecção, mas como o experimento terminou no oitavo dia

pós-cirurgia, não foi possível avaliar se o quadro infeccioso instalado iria progredir para MD, evoluir de maneira indolente ou mesmo ter resolução espontânea. O modelo aqui proposto se mostrou adequado para estudar a infecção da ferida esternal, foi bem tolerado pelos animais e é facilmente reproduzível.

Pelos dados da histologia, a CO não foi capaz de alterar de maneira significativa o processo de cicatrização, mesmo células gigantes, frequentemente associadas à CO^{27,39}, não foram encontradas. Esses dados vão de encontro à literatura, que informa alterações histológicas significativas da cicatrização óssea na presença da CO. A duração do experimento, oito dias, ajuda a explicar esses achados. Os trabalhos anteriores avaliaram as alterações decorrentes da CO em fase mais avançada da cicatrização. Células gigantes só foram detectadas de maneira clara e uniforme a partir do 60º dia pós-implante tanto em tíbia de ratos, mandíbula de coelhos quanto esterno de porcos^{3,26,39}. Talvez um prazo mais longo de observação dos animais após a cirurgia possibilitasse a identificação de células gigantes.

A infecção da ferida esternal pode ser classificada em dois tipos básicos: infecções superficiais e profundas (MD). O diagnóstico clínico das infecções superficiais é normalmente fácil de ser realizado, já o acometimento do osso e do espaço retroesternal frequentemente é difícil. Diferenciar processo infeccioso superficial do profundo, diagnosticar infecção profunda em paciente sem sinais de infecção superficial e afastar infecção naquele com deiscência esternal estéril é de extrema importância, visto que o tratamento e prognóstico são bem distintos. Além disso, quanto mais precoce for instituído o tratamento da MD, tanto melhor será o prognóstico do paciente. A tomografia computadorizada do tórax, apesar de frequentemente utilizada em pacientes com suspeita de MD, é pouco sensível e pouco específica no seu diagnóstico⁵.

Os métodos de imagem utilizados em Medicina baseiam-se na interação da energia com os tecidos biológicos. A natureza da informação disponível em cada modalidade é determinada por essas interações. Na Medicina Nuclear, a imagem

do órgão estudado é obtida de dentro para fora. Os radioisótopos, geralmente na forma de radiofármacos, são administrados internamente. A inferência diagnóstica é obtida registrando-se a distribuição do material radioativo no tempo e no espaço. A farmacocinética dos fármacos e a captação seletiva pelos tecidos formam as bases de interpretação das imagens obtidas³³. A cintilografia é um bom método não invasivo para o diagnóstico da osteomielite e os principais radiofármacos utilizados são o metilendifosfonato-tecnécio-99m (99mTc-MDP), citrato de gálio-67 (67Ga-Citrato) e os leucócitos marcados com tecnécio-99m-Hexametilpropileno amino-oxima (HMPAO)^{33,34}. Entretanto, todos esses radiotraçadores não são capazes de diferenciar processo inflamatório de infeccioso. Assim como, após a esternotomia mediana e outras cirurgias de grande porte, a reação inflamatória secundária ao trauma cirúrgico é exuberante, é essencial que o radiofármaco utilizado para diagnosticar a infecção no pós-operatório tenha especificidade para focos infecciosos.

A cintilografia com leucócitos autólogos marcados com tecnécio-99m utilizando o HMPAO (^{99m}Tc-HMPAO) mostrou-se sensível e específica no diagnóstico da MD após cirurgias cardíacas⁴⁰. Contudo, a preparação de leucócitos radiomarcados requer equipamentos especializados, pessoal treinado e várias etapas no procedimento de marcação com tempo relativamente longo (três horas). Esse método apresenta riscos para o manipulador, devido ao manuseio de sangue, potencialmente contaminado, podendo levar à transmissão de doenças tais como hepatites e síndrome da imunodeficiência adquirida. Desta forma, várias pesquisas estão sendo realizadas no sentido de desenvolver métodos alternativos que não ofereçam riscos³⁴.

Uma nova proposta para o diagnóstico diferencial entre inflamação e infecção baseia-se no uso de antibióticos radiomarcados, que surgem como opção no diagnóstico da infecção óssea no período pós-cirúrgico. Entre eles, a ^{99m}Tc-CFT foi eficaz em diferenciar foco infeccioso de foco inflamatório em ratos³⁵. Esses antibióticos são captados pelos focos infecciosos e são, frequentemente,

metabolizados pelos microrganismos. Portanto, a quantidade da radioatividade medida no foco será proporcional ao número de microrganismos presentes.

No presente estudo, a comparação dos grupos controle vs. bactéria e cera vs. cerabactéria mostrou diferenças significativas em todas as leituras realizadas, o que comprova a eficácia do método em detectar a bactéria mesmo na ausência de evidente quadro clínico de infecção.

Os animais dos grupos controle e cera não apresentaram diferenças significativas nas leituras *in vivo* do alvo obtida aos 210 min e 360 min e na contagem *ex vivo*, o que significa que a CO, por si, não alterou a captação do radiofármaco. Tal achado foi confirmado pelo estudo histológico que não revelou diferenças na intensidade e tipo de infiltrado inflamatório nesses dois grupos. Tendo em vista a especificidade para focos infecciosos do $^{99m}\text{Tc-CFT}$, já demonstrado em trabalho prévio³⁵, tal comportamento era esperado. Mesmo que a CO determinasse expressiva reação inflamatória local, não se teria captação significativa do antibiótico marcado no local da cirurgia. Vale ressaltar que essa característica é altamente desejável para o diagnóstico da infecção óssea no pós-operatório, visto que a reação inflamatória intensa secundária ao trauma cirúrgico interfere na captação dos radiofármacos comumente utilizados para diagnóstico de doenças ósseas, falseando os resultados obtidos e promovendo a perda da especificidade do exame.

A $^{99m}\text{Tc-CFT}$ apresentou, neste trabalho, excelente acurácia em diagnosticar os animais que haviam sido contaminados mesmo na ausência de um quadro clínico de MD e na presença da reação inflamatória secundária ao trauma cirúrgico. Assim, merece ter seu uso avaliado no diagnóstico da MD, visto ser um radiofármaco mais seguro e barato do que outros já utilizados para tal fim, além de ser mais eficaz em diferenciar focos inflamatórios de focos infecciosos do que esses, característica altamente desejável para o diagnóstico da MD pós-esternotomia mediana.

Quando comparados os grupos bactéria e cerabactéria, tanto na leitura *in vivo* quanto no estudo *ex vivo*, não houve diferença significativa entre os dois grupos, sugerindo que a CO não facilitou o crescimento bacteriano na esternotomia. Os achados histológicos que informaram infiltrado inflamatório intenso do tipo polimorfonuclear em ambos os grupos confirmaram os dados obtidos pela cintilografia.

Esse resultado não confirma o que havia sido demonstrado em outros trabalhos, nos quais ficou claro o papel da CO como facilitador da infecção^{22,23}. Johnson e Fromm, após inocularem em um orifício na crista ílica de coelhos 10^5 UFC de *Staphylococcus aureus* associado ou não a um cilindro de CO, perceberam que a cera impediu que houvesse depuração da bactéria 10 dias após a inoculação. Tal efeito foi semelhante ao de um cilindro de aço de mesma dimensão, sugerindo que a CO exercia o papel semelhante ao de um corpo estranho.

Nelson *et al.* mostraram que o inóculo de *Staphylococcus aureus* necessário para induzir osteomielite na tíbia de ratos era reduzido na presença de CO, de log 6,9 para log 2,6 quando se desejava taxa de infecção de 50% dos animais e de log 8,2 para log 4,4 quando se desejava 100% dos animais infectados²³.

A interação entre o *Staphylococcus aureus* e a CO formando o biofilme é o mecanismo que explica os achados desses dois trabalhos^{22,23} e seria fundamental para que o modelo aqui proposto pudesse demonstrar algum efeito facilitador da infecção associado à CO. Mas como já foi bem comprovado, não são todas as linhagens do *Staphylococcus aureus* que são capazes de produzir biofilme, e mesmo aquelas sabidamente produtoras não o fazem de maneira regular. Mecanismos genéticos associados a estímulos externos, ambos ainda pouco compreendidos, são necessários para que isso ocorra⁴¹.

A não formação do BF poderia explicar o fato de não se ter encontrado diferença entre os grupos bactéria vs. cerabactéria. Os dados histológicos mostraram que todos aqueles que haviam sido contaminados com a bactéria mostravam sinais sugestivos de processo infeccioso, cuja intensidade era

semelhante entre os grupos. A carga bacteriana utilizada foi suficiente para provocar alterações histológicas compatíveis com infecção em todos os animais que foram contaminados pelo *Staphylococcus aureus*, independentemente da presença da CO. Talvez com o uso de um inóculo bacteriano menor fosse possível demonstrar o efeito facilitador do processo infeccioso associado à CO.

Apesar das três leituras e do estudo histológico não indicarem diferenças entre os grupos bactéria vs. cerabactéria, nota-se que a queda percentual entre as duas medidas *in vivo* do grupo bactéria foi mais acentuada quando comparada ao grupo cerabactéria, o que indica mais interação do radiofármaco com seu substrato no grupo cerabactéria, sugerindo maior população bacteriana nesses animais. Talvez uma terceira leitura em intervalo superior às que foram feitas mostrasse alguma diferença significativa entre esses grupos.

7 CONCLUSÃO

A cera de osso não atuou como cofator na colonização de esternotomia em ratos.

REFERÊNCIAS

1. Dalton ML, Connally SR, Sealy WC. Julian's reintroduction of Milton's operation. *Ann Thorac Surg.* 1992; 53:532-3.
2. Schimmer C, Reents W, Berneder S, Eigel P, Sezer O, Scheld H, *et al.* Prevention of sternal dehiscence and infection in high-risk patients: a prospective randomized multicenter trial. *Ann Thorac Surg.* 2008; 86:1897-904.
3. Vestergaard RF, Jensen H, Vind-Kezunovic S, Jakobsen T, Soballe K, Hasenkam JM. Bone healing after median sternotomy: a comparison of two hemostatic devices. *J Cardiothorac Surg.* 2010; 5:117.
4. El Oakley RM, Wright JE. Postoperative mediastinitis: classification and management. *Ann Thorac Surg.* 1996; 61:1030-6.
5. Gelape CL. Surgical wound infection following heart surgery. *Arq Bras Cardiol.* 2007; 89:e3-9.
6. Baskett RJ, MacDougall CE, Ross DB. Is mediastinitis a preventable complication? A 10-year review. *Ann Thorac Surg.* 1999; 67:462-5.
7. Risnes I, Abdelnoor M, Almdahl SM, Svennevig JL. Mediastinitis after coronary artery bypass grafting risk factors and long-term survival. *Ann Thorac Surg.* 2010; 89:1502-9.
8. Tiveron MG, Fiorelli AI, Mota EM, Mejia OA, Brandão CM, Dallan LA, *et al.* Preoperative risk factors for mediastinitis after cardiac surgery: analysis of 2768 patients. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2012; 27:203-10.
9. Graf K, Ott E, Vonberg RP, Kuehn C, Haverich A, Chaberny IF. Economic aspects of deep sternal wound infections. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2010; 37:893-6.
10. Cardona JG, Crespob BG, Candela SC, Ramos AC, Medina JLD, Martínez JQ. Utility of omentoplasty for poststernotomy mediastinitis secondary to myocardial revascularization surgery. Servicio de Cirugía Torácica, Hospital Clínico Universitario, Valladolid, Spain. *Arch Bronconeumol.* 2008; 44:113-5.
11. Diez C, Koch D, Kuss O, Silber RE, Friedrich I, Boergermann J. Risk factors for mediastinitis after cardiac surgery - a retrospective analysis of 1700 patients. *J Cardiothorac Surg.* 2007; 2:23.

12. Gårdlund B, Bitkover CY, Vaage J. Postoperative mediastinitis in cardiac surgery - microbiology and pathogenesis. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2002; 21:825-30.
13. Milano CA, Kesler K, Archibald N, Sexton DJ, Jones RH. Mediastinitis after coronary artery bypass graft surgery. Risk factors and long-term survival. *Circulation.* 1995; 92:2245-51.
14. Sá MP, Soares EF, Santos CA, Figueiredo OJ, Lima RO, Escobar RR, *et al.* Risk factors for mediastinitis after coronary artery bypass grafting surgery. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2011; 26:27-35.
15. Tang GH, Maganti M, Weisel RD, Borger MA. Prevention and management of deep sternal wound infection. *Semin Thorac Cardiovasc Surg.* 2004; 16:62-9.
16. Losanoff JE, Richman BW, Jones JW. Disruption and infection of median sternotomy: a comprehensive review. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2002; 21:831-9.
17. Steingrímsson S, Gustafsson R, Gudbjartsson T, Mokhtari A, Ingemansson R, Sjögren J. Sternocutaneous fistulas after cardiac surgery: incidence and late outcome during a ten-year follow-up. *Ann Thorac Surg.* 2009; 88:1910-5.
18. Gupta G, Prestigiacomo CJ. From sealing wax to bone wax: predecessors to Horsley's development. *Neurosurg Focus.* 2007; 23:E16.
19. Prziborowski J, Hartrumpf M, Stock UA, Kuehnel RU, Albes JM. Is bonewax safe and does it help? *Ann Thorac Surg.* 2008; 85:1002-6.
20. Achneck HE, Sileshi B, Jamiolkowski RM, Albala DM, Shapiro ML, Lawson JH. A comprehensive review of topical hemostatic agents: efficacy and recommendations for use. *Ann Surg.* 2010; 251:217-28.
21. Geary Jr, Kneeland Frantz V. New absorbable hemostatic bone wax; experimental and clinical studies. *Ann Surg.* 1950; 132:1128-37.
22. Johnson P, Fromm D. Effects of bone wax on bacterial clearance. *Surgery.* 1981; 89:206-9.
23. Nelson DR, Buxton TB, Luu QN, Rissing JP. The promotional effect of bone wax on experimental *Staphylococcus aureus* osteomyelitis. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1990; 99:977-80.
24. Raposo-Amaral CE, Almeida AB, Paschoal G, Bueno DF, Vulcano LC, Passos-Bueno MR, *et al.* Histological and radiological changes in cranial bone in the presence of bone wax. *Acta Cir Bras.* 2011; 26:274-8.

25. Robicsek F, Masters TN, Littman L, Born GV. The embolization of bone wax from sternotomy incisions. *Ann Thorac Surg.* 1981; 31:357-9.
26. Wellisz T, Armstrong JK, Cambridge J, An YH, Wen X, Kang Q, *et al.* The effects of a soluble polymer and bone wax on sternal healing in an animal model. *Ann Thorac Surg.* 2008; 85:1776-80.
27. Sudmann B, Bang G, Sudmann E. Histologically verified bone wax (beeswax) granuloma after median sternotomy in 17 of 18 autopsy cases. *Pathology.* 2006; 38:138-41.
28. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 1999; 284:1318-22.
29. Aparna MS, Yadav S. Biofilms: microbes and disease. *Braz J Infect Dis.* 2008; 12:526-30.
30. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15:167-93.
31. Barnea Y, Carmeli Y, Kuzmenko B, Navon-Venezia S. Staphylococcus aureus mediastinitis and sternal osteomyelitis following median sternotomy in a rat model. *J Antimicrob Chemother.* 2008; 62:1339-43.
32. Centers for Disease Control. CDC Public health image library. 2012. Disponível em: http://phil.cdc.gov/PHIL/Images/7488/7488_lores.jpg. Acesso em: janeiro de 2013.
33. Thrall JH, Ziesman HA. *Medicina nuclear.* 2ª edição, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2003. 408 p.
34. Diniz SO. Emprego da ceftizoxima marcada com tecnécio-99m na diferenciação de processos inflamatórios asséptico de séptico em modelos experimentais. [Doutorado - Cirurgia]. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.
35. Diniz SO, Rezende CM, Serakides R, Ferreira RL, Ribeiro TG, Martin-Comin J, *et al.* Scintigraphic imaging using technetium-99m-labeled ceftizoxime in an experimental model of acute osteomyelitis in rats. *Nucl Med Commun.* 2008; 29:830-6.
36. An YH, Kang QK, Arciola CR. Animal models of osteomyelitis. *Int J Artif Organs.* 2006; 29:407-20.

37. Iwakura A, Tabata Y, Nishimura K, Nakamura T, Shimizu Y, Fujita M, *et al.* Basic fibroblast growth factor may improve devascularized sternal healing. *Ann Thorac Surg.* 2000; 70:824-8.
38. Ozcan AV, Demir M, Onem G, Goksin I, Baltalarli A, Topkara VK, *et al.* Topical versus systemic vancomycin for deep sternal wound infection caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a rodent experimental model. *Tex Heart Inst J.* 2006; 33:107-10
39. Rodrigues SO, Carvalho ACP. Implante de cera ossea em tecido conjuntivo subcutâneo e em cavidade cirúrgica na mandíbula de ratos: estudo histológico. *Rev Odontol. UNESP,* 1986; 15:39-51.
40. Liberatore M, Fiore V, D'Agostini A, Prosperi D, Iurilli AP, Santini C, *et al.* Sternal wound infection revisited. *Eur J Nucl Med.* 2000; 27:660-7.
41. Harraghy N, Seiler S, Jacobs K, Hannig M, Menger MD, Herrmann M. Advances in in vitro and in vivo models for studying the staphylococcal factors involved in implant infections. *Int J Artif Organs.* 2006; 29:368-78.

ANEXOS E APÊNDICE

ANEXO A – Parecer ético



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 143/2011**, relativo ao projeto intitulado "**Avaliação da cera de osso como substrato na formação de biofilme após esternotomia mediana em ratos**", que tem como responsável(is) **Ivana Duval Araujo**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **6/ 07/2011**.

Este certificado expira-se em **6/ 07/ 2016**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 143/2011**, related to the project entitled "**Valuation of bone wax as a substrate in biofilm formation in rats after median sternotomy**", under the supervisors of **Ivana Duval Araujo**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **July 6, 2011**.

This certificate expires in **July 6, 2016**.

Belo Horizonte, 14 de Julho de 2011.

Prof^a. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite
Coordenadora do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

ANEXO B – Declaração de aprovação




FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

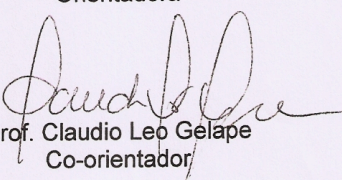
Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640




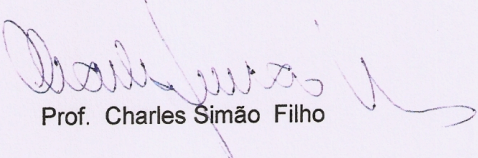
DECLARAÇÃO

A Comissão Examinadora abaixo assinada, composta pelos Professores Doutores: Ivana Duval Araújo, Cláudio Leo Gelape, Walter Vilela Andrade Vicente, Charles Simões Filho, aprovou a defesa da tese intitulada: **“AVALIAÇÃO DA CERA DE OSSO COMO COFATOR NA COLONIZAÇÃO DE ESTERNOTOMIAS: ESTUDO CINTILOGRÁFICO EM RATOS”**, apresentada pelo mestrando **PAULO HENRIQUE NOGUEIRA COSTA**, para obtenção do título de Mestre em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, realizada em 29 de abril de 2013.


Profa. Ivana Duval Araújo
Orientadora


Prof. Claudio Leo Gelape
Co-orientador


Prof. Walter Vilela Andrade Vicente


Prof. Charles Simão Filho

APÊNDICE A - Tabelas

TABELA 4 – Dados globais dos animais

Número Animal	Grupo	Contagem alvo		CPM/g
		210min	360min	
1,00	Controle	8.450,83	5.171,25	419.914,00
2,00	Controle	8.361,92	5.314,71	342.791,00
3,00	Controle	6.894,22	4.275,89	375.076,00
4,00	Cera	8.897,16	5.532,19	424.833,00
5,00	Cera	9.779,42	7.796,59	516.382,00
6,00	Cera	7.447,52	5.182,10	418.124,00
7,00	Bactéria	11.604,96	8.268,09	747.578,00
8,00	Bactéria	9.294,80	5.656,73	414.074,00
9,00	Bactéria	10.971,16	7.070,08	485.572,00
10,00	Bactéria	9.693,10	6.601,92	601.767,00
11,00	Bactéria	12.067,51	7.656,47	676.846,00
20,00	Bactéria	15.341,23	9.701,39	860.028,00
13,00	Cerabactéria	14.219,44	10.377,25	855.385,00
14,00	Cerabactéria	11.433,51	8.293,94	593.979,00
15,00	Cerabactéria	14.276,98	10.062,82	684.607,00
16,00	Cerabactéria	12.222,48	8.226,04	585.407,00
17,00	Cerabactéria	9.541,51	7.498,01	628.201,00
18,00	Cerabactéria	11.089,36	7.482,76	693.626,00
19,00	Cerabactéria	13.023,90	10.655,24	866.335,00

TABELA 5 - Medidas descritivas da leitura *in vivo* alvo, contagem total

Tempo	Grupo	Medidas descritivas				
		Mínimo	Máximo	Mediana	Média	d.p.
210 minutos	Controle	6.894,2	8.450,8	8.361,9	7.902,3	874,2
	Cera	7.447,5	9.779,4	8.897,2	8.708,0	1.177,4
	Bactéria	9.294,8	15.341,2	11.288,1	11.495,5	2.167,7
	Cerabactéria	9.541,5	14.277,0	12.222,5	12.258,2	1.729,0
360 minutos	Controle	4.275,9	5.314,7	5.171,3	4.920,6	562,9
	Cera	5.182,1	7.796,6	5.532,2	6.170,3	1.419,3
	Bactéria	5.656,7	9.701,4	7.363,3	7,492,5	1.403,5
	Cerabactéria	7.482,8	10.655,2	8.293,9	8.942,3	1.378,3

TABELA 6 - Medidas descritivas da leitura *ex vivo*, contagem por minuto por grama de esterno

Grupo	Medidas descritivas				
	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	d.p.
Controle	342791,0	419914,0	375.076,0	379260,3	38731,4
Cera	418124,0	516382,0	424.833,0	453113,0	54895,2
Bactéria	414074,0	860028,0	639.306,5	630977,5	165654,4
Cerabactéria	585407,0	866335,0	684.607,0	701077,1	116625,0

TABELA 7 - Comparação entre os grupos, pelo teste t de Student

Comparação	Alvo	Alvo	Contagem por minuto / grama
	210 min	360 min	
Controle x Cera	0,395	0,229	0,13
Controle x Bactéria	0,031	0,021	0,04
Controle x Cerabactéria	0,004	0,001	0,002
Cera x Bactéria	0,081	0,226	0,122
Cera x Cerabactéria	0,013	0,020	0,009
Bactéria x Cerabactéria	0,495	0,088	0,39