

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

MARCOS ALVES PAVIONE

Avaliação do uso do pré-condicionamento isquêmico remoto no dia precedente à cirurgia em crianças submetidas à circulação extracorpórea (efeitos na “segunda janela”)

Ribeirão Preto

2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

MARCOS ALVES PAVIONE

Avaliação do uso do pré-condicionamento isquêmico remoto no dia precedente à cirurgia em crianças submetidas à circulação extracorpórea (efeitos na “segunda janela”)

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente

Opção: Investigação em Pediatria

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula C. P. Carlotti

Ribeirão Preto

2010

FOLHA DE APROVAÇÃO

PAVIONE, Marcos Alves

Avaliação do uso do pré-condicionamento isquêmico remoto no dia precedente à cirurgia em crianças submetidas à circulação extracorpórea (efeitos na “segunda janela”)

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente.

Aprovado em:

Banca examinadora:

Prof. Dr. André Schimidt

Instituição: FMRP-USP Assinatura: _____

Prof. Dr. Jorge Yussef Afiune

Instituição: INCOR-DF Assinatura: _____

Prof^a. Dr^a. Ana Paula de Carvalho Panzeri Carlotti

Instituição: FMRP-USP Assinatura: _____

Dedico este trabalho aos meus pais,
que com toda sua simplicidade aparente,
foram capazes de me oferecer um saber
acima de qualquer ciência.

AGRADECIMENTOS

“Durante o dia o SENHOR ia na frente deles numa coluna de nuvem, para lhes mostrar o caminho. Durante a noite Ele ia na frente deles numa coluna de fogo, para iluminar o caminho, a fim de que pudessem andar de dia e de noite.”

Livro do Êxodo capítulo 13, versículos 21 e 22

Bíblia na Linguagem de Hoje

Primeiro a Deus, que durante toda a minha caminhada esteve à frente como meu guia e cuidador, providenciando sempre os meios e as oportunidades necessários à minha vitória.

Aos meus pais, que sempre abriram mão de seu conforto em favor dos meus sonhos e que estiveram sempre ao meu lado como fortes baluartes e exemplos de amor e dedicação.

À minha esposa Tatiana, que com seus mimos permitiu que eu estivesse sempre disposto e dedicado ao meu trabalho.

Ao meu irmão e minha família que mesmo sem saber me valeram sempre como pontos de amparo e apoio; verdadeiros mananciais no deserto da caminhada.

À minha orientadora, Dra. Ana Paula, deixo um agradecimento especial. Sempre com sua presença marcante e sua disposição para me ajudar a qualquer momento, esteve presente em cada mínimo detalhe deste trabalho. Com sua experiência e sua dedicação vem cooperando cada vez mais para um atendimento de melhor qualidade às nossas crianças.

Aos meus amigos Fábio Carmona, Paulo Henrique e toda equipe da UTI pediátrica e cardiologia infantil que sempre me apoiaram e abraçaram comigo o projeto, mesmo em altas horas da madrugada.

À Dra. Margaret e toda equipe do laboratório de endocrinologia pediátrica que tiveram o árduo trabalho de me ensinar os melindres das técnicas de laboratório e que tiveram muita paciência com meus muitos erros.

Enfim, à FAPESP, pelo apoio financeiro, sem o qual este trabalho não seria possível.

RESUMO

PAVIONE, M.A. **Avaliação do uso do pré-condicionamento isquêmico remoto no dia precedente à cirurgia em crianças submetidas à circulação extracorpórea (efeitos na 'segunda janela')**. 2010. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Objetivos: Avaliar a resposta inflamatória, a disfunção miocárdica e a morbimortalidade pós-operatória em crianças submetidas ao pré-condicionamento isquêmico remoto (PCIr) no dia anterior à cirurgia cardíaca com circulação extracorpórea (CEC), comparadas com um grupo controle. **Métodos:** Trata-se de estudo intervencionista e controlado, de alocação aleatória de lactentes de 1 mês a 2 anos de idade submetidos à cirurgia cardíaca com CEC. As crianças alocadas aleatoriamente ao PCIr foram submetidas a quatro períodos de cinco minutos de isquemia do membro inferior pelo uso de esfigmomanômetro, intercalados por períodos de cinco minutos de reperfusão, no dia prévio à cirurgia cardíaca. No pós-operatório, foram colhidas amostras de sangue 4, 12, 24 e 48 horas após o fim da CEC para mensurar a resposta inflamatória por meio da avaliação da ativação do fator nuclear kappa-B (NF- κ B) em leucócitos pela quantificação do RNAm de sua proteína inibitória, a I kappa B-alfa ($I\kappa$ -B α) por PCR em tempo real, e pelas concentrações plasmáticas de interleucina (IL)-8 e IL-10 avaliadas por ELISA. O comprometimento miocárdico foi avaliado pelas concentrações da fração amino-terminal do peptídeo natriurético tipo B (NT-pro BNP) e de troponina I cardíaca (cTnI), mensuradas por técnica de quimioluminescência. Também foram avaliados parâmetros clínicos da síndrome de baixo débito cardíaco e a necessidade de drogas vasoativas no pós-operatório. **Resultados:** Foram estudados 22 pacientes: 12 alocados no grupo PCIr e 10 no grupo controle. Os grupos eram homogêneos e não foram encontradas diferenças significativas quando comparamos as variáveis: idade, sexo, etnia, peso, estatura, saturação em ar ambiente no período pré-operatório, tempo de cirurgia, tempo de CEC, tempo de parada anóxica, score de gravidade PRISM e classificação de risco cirúrgico cardíaco RACHS-1. Entre as

variáveis clínicas, a única que apresentou diferença estatisticamente significativa foi a frequência respiratória, no período de 48 horas após a cirurgia, com menores valores no grupo PCIr ($p=0,004$). Das variáveis que mensuram de forma indireta o débito cardíaco e a oferta de oxigênio aos tecidos, a saturação venosa de oxigênio se mostrou com valores significativamente mais baixos com 12 horas ($p=0,042$) e 48 horas ($p=0,018$) após a saída de CEC no grupo pré-condicionado. Isso se confirma na medida da extração de oxigênio, que se mostrou mais alta neste grupo nos mesmos períodos de 12 horas ($p=0,021$) e 48 horas ($p=0,008$). Dentre os marcadores de dano miocárdico, apenas o NT-pro BNP, um marcador de disfunção miocárdica, apresentou diferença significativa, com menores valores no grupo pré-condicionado nos tempos 12 horas ($p=0,035$) e 24 horas ($p=0,035$). Os valores da cTnl estiveram maiores em todos os tempos no grupo PCIr, mas sem diferença significativa. Dentre os marcadores da função inflamatória, tanto a liberação da IL-8, da IL-10 e a expressão do gene I- κ B α foram semelhantes nos dois grupos. A morbidade pós-operatória foi semelhante nos dois grupos e não houve óbito até a alta hospitalar em nenhum dos grupos. **Conclusão:** Os pacientes que receberam o PCIr antes da cirurgia cardíaca com uso de CEC apresentaram menor liberação do hormônio NT-pro BNP, que indica uma menor disfunção celular cardíaca, e um papel protetor do comprometimento miocárdico.

Palavras-chave: pré-condicionamento isquêmico; cirurgia cardíaca

ABSTRACT

PAVIONE, M.A. **Evaluation of remote ischemic preconditioning applied the day before open heart surgery in children undergoing cardiopulmonary bypass (the 'second window' effect)**. 2010. Dissertation (Master) – Faculty of Medicine of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto.

Objectives: To evaluate the inflammatory response, myocardial dysfunction, morbidity and postoperative mortality in children undergoing remote ischemic preconditioning (IPC_r) stimulus the day before heart surgery with cardiopulmonary bypass (CPB), compared with a control group. **Methods:** We conducted a randomized controlled study of infants aged 1 month to 2 years undergoing cardiac surgery with CPB. Children randomly assigned to IPC_r were submitted to four periods of five minutes of lower limb ischemia by using a blood pressure cuff intercalated with periods of five minutes of reperfusion, the day prior to cardiac surgery. Postoperatively, blood samples were collected 4, 12, 24 and 48 hours after the end of CPB to assess the inflammatory response by activation of nuclear factor kappa-B (NF-κB) in leukocytes by the quantification of mRNA of its inhibitory protein (I kappa B alpha – IκB-α) by real-time PCR, and by the plasma concentrations of interleukin (IL) 8, and IL-10 measured by ELISA. Myocardial dysfunction was assessed by the concentrations of the amino-terminal fraction of B-type natriuretic peptide (NT-pro BNP) and cardiac troponin I (cTnI), measured by chemiluminescence method. Clinical parameters of low cardiac output syndrome and the need for vasoactive drugs in the postoperative period were also evaluated. **Results:** Twenty-two patients were studied: 12 allocated to IPC_r group and 10 to the control group. The groups were homogeneous and no significant differences were found when comparing the age, gender, ethnicity, weight, height, preoperative oxygen saturation in room air, surgery time, CPB time, anoxic arrest, PRISM score and the risk classification of cardiac surgery (Risk Adjustment for Congenital Heart Surgery-1 - RACHS-1). Among the clinical variables, the only one that showed a statistically significant difference was the respiratory rate, 48 hours after surgery, with lower values in ICPr group (p=0.004). Among the variables that measure indirect cardiac output and

oxygen delivery to tissues, venous oxygen saturation was significantly lower at 12 hours ($p=0.042$) and 48 hours ($p=0.018$) after CPB in ICPr group. This was confirmed by the measurement of oxygen extraction, which was higher in this group in the same periods of 12 hours ($p = 0.021$) and 48 hours ($p = 0.008$). Of the markers of myocardial damage, only NT-pro BNP, a marker of myocardial dysfunction showed a significant difference, with lower values in the IPCr group at 12 hours ($p = 0.035$) and 24 hours ($p = 0.035$). The values of cTnI were higher in IPCr group, but the differences were not significant. Among the markers of inflammatory response, both the release of IL-8 and IL-10, and I κ -B α gene expression were similar in both groups. Postoperative morbidity was similar in both groups. There were no deaths until hospital discharge in either group. **Conclusion:** Patients who received IPCr stimulus before cardiac surgery with CPB had lower levels of NT-pro BNP, indicating less cardiac cell dysfunction and a protective role for myocardial compromise.

Key words: ischemic preconditioning; heart surgery

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Comparação da frequência cardíaca entre os grupos.....	41
Figura 2 – Comparação da frequência respiratória entre os grupos	42
Figura 3 – Comparação da pressão arterial entre os grupos	43
Figura 4 – Comparação do escore inotrópico entre os grupos.....	44
Figura 5 – Comparação da pressão venosa central entre os grupos	45
Figura 6 – Comparação do volume de líquidos infundido entre os grupos.....	46
Figura 7 – Comparação da diurese entre os grupos	47
Figura 8 – Comparação da creatinina entre os grupos	48
Figura 9 – Comparação da uréia entre os grupos	49
Figura 10 – Comparação do lactato entre os grupos	50
Figura 11 – Comparação da saturação venosa de oxigênio entre os grupos	51
Figura 12 – Comparação da extração de oxigênio entre os grupos	52
Figura 13 – Comparação da contagem de leucócitos entre os grupos	53
Figura 14 – Comparação da contagem de plaquetas entre os grupos.....	54
Figura 15 – Comparação da PaO ₂ /FiO ₂ entre os grupos	55
Figura 16 – Comparação da Interleucina 8 entre os grupos	56
Figura 17 – Comparação da Interleucina 10 entre os grupos	57
Figura 18 – Comparação da expressão do IκB alfa entre os grupos.....	58
Figura 19 – Comparação da troponina I entre os grupos	59
Figura 20 – Comparação do NT-pro BNP entre os grupos	61
Figura 21 – Comparação entre as áreas sob a curva do NT-pro BNP	62
Figura 22 – Comparação entre a fração de ejeção nos dois grupos	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Descrição geral dos pacientes	38
Tabela 2 – Comparação entre as variáveis que conferem homogeneidade aos grupos	40
Tabela 3 – Análise temporal da frequência cardíaca separada por grupo	42
Tabela 4 – Análise temporal da frequência respiratória separada por grupo	43
Tabela 5 – Análise temporal da pressão arterial separada por grupo	44
Tabela 6 – Análise temporal do escore inotrópico separada por grupo	45
Tabela 7 – Análise temporal da pressão venosa central separada por grupo.....	46
Tabela 8 – Análise temporal do volume infundido separada por grupo.....	47
Tabela 9 – Análise temporal da diurese separada por grupo	48
Tabela 10 – Análise temporal da creatinina sérica separada por grupo.....	49
Tabela 11 – Análise temporal da uréia sérica separada por grupo	50
Tabela 12 – Análise temporal do lactato separada por grupo	51
Tabela 13 – Análise temporal da extração de oxigênio separada por grupo.....	52
Tabela 14 – Análise temporal da contagem de glóbulos brancos separada por grupo	53
Tabela 15 – Análise temporal da contagem de plaquetas separada por grupo	54
Tabela 16 – Análise temporal da interleucina 8 separada por grupo	56
Tabela 17 – Análise temporal da interleucina 10 separada por grupo	57
Tabela 18 – Análise temporal da expressão do I κ B alfa separada por grupo	58
Tabela 19 – Análise temporal da troponina I separada por grupo.....	60
Tabela 20 – Análise temporal do NT-pro BNP separada por grupo	61
Tabela 21 – Comparação entre as variáveis de morbi-mortalidade entre os dois grupos	64
Tabela 22 – Quantificação do RNA	94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abreviatura	Significado
CEC	Circulação extracorpórea
CTIP	Centro de Terapia Intensiva Pediátrica
cTnl	Troponina cardíaca I
HC-FMRP-USP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
IIR	Injúria isquemia-reperfusão
I-κB	Proteína inibidora do NF-κB (pode ser tipo alfa ou beta)
IL	Interleucina
IPCr	Remote Ischemic Preconditioning
NF-κB	Fator de transcrição nuclear kappa B
NT-pro BNP	Fração amino-terminal do peptídeo natriurético ventricular tipo B
PCI	Pré-condicionamento isquêmico
PCIr	Pré-condicionamento isquêmico remoto
PELOD	<i>Pediatric Logistic Organ Dysfunction</i>
PRISM	<i>Paediatric Risk of Mortality</i>
RACHS-1	<i>Risk adjustment for congenital heart surgery</i>
RNAm	Ácido ribonucléico mensageiro
SRIS	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
RQ-PCR	Técnica de quantificação gênica em tempo real que utiliza a cadeia de reação da enzima polimerase
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Hipótese.....	15
1.2 Relevância do estudo	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 Pré-condicionamento isquêmico.....	17
2.2 PCIr: do laboratório para o leito.....	19
2.3 Mensurando a SRIS.....	21
2.4 Mensurando o Comprometimento Miocárdico	25
3 OBJETIVOS	29
4 PACIENTES E MÉTODOS	30
4.1 Protocolo do pré-condicionamento isquêmico remoto	31
4.2 Amostras de sangue e análise.....	31
4.3 Cirurgia	33
4.4 Coleta de Dados	33
4.5 Análise estatística.....	35
4.6 Potenciais riscos inerentes ao estudo.....	36
4.7 Financiamento	37
5 RESULTADOS	38
5.1 Dados demográficos e epidemiológicos	38
5.2 Análise das variáveis relativas à hemodinâmica dos pacientes.....	41
5.3 Análise dos exames laboratoriais dosados na rotina do CTIP.....	48
5.4 Análise das quantificações referentes a resposta inflamatória	55
5.5 Análise das quantificações referentes ao comprometimento miocárdico	59
5.6 Avaliação da morbi-mortalidade intra-hospitalar.....	63
6 DISCUSSÃO	65
7 CONCLUSÃO	74
8 LIMITAÇÕES DO ESTUDO	75
REFERÊNCIAS	76
APÊNDICES	83
ANEXOS	97

1 INTRODUÇÃO

O organismo humano tem um modelo de funcionamento preparado para enfrentar agressões de diversas naturezas. Qualquer situação não identificada pelo organismo como normal ou fisiológica pode despertar um conjunto de reações relacionadas aos mecanismos de defesa ou de compensação.

A circulação extracorpórea (CEC), que é o aparato usado para substituir temporariamente a função propulsora do coração e a função pulmonar de trocas gasosas durante as cirurgias cardíacas constitui um desses agentes que é reconhecido pelo organismo como um agressor, e, como tal, suscita uma série de reações de natureza hemodinâmica, física e química. Esta resposta, inicialmente chamada de “síndrome pós-perfusão” é conhecida hoje como Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SRIS) (SOUZA;ELIAS, 2006). Estas reações quando muito intensas, podem produzir disfunção em diversos órgãos, entre eles o coração, gerando a disfunção miocárdica (PAPARELLA et al., 2002).

Sabe-se que esta disfunção miocárdica é ainda mais intensa em neonatos e lactentes jovens (BRIX-CHRISTENSEN, 2001) e tem apresentações de graus variáveis no período pós-operatório imediato de crianças submetidas à cirurgia cardíaca com CEC, tornando-se mais acentuada entre 9 a 12 horas após a cirurgia (WERNOVSKY et al., 1995). Existe uma associação entre baixo débito cardíaco e aumento da morbi-mortalidade nos pós-operatórios destas crianças (PARR et al., 1975).

Além do insulto secundário provocado pela SRIS no paciente que necessita da CEC, existe ainda um insulto primário ao miocárdio, também chamado de Injúria Isquemia-Reperusão (IIR). Este mecanismo de lesão em última análise leva à apoptose, disfunção e necrose celular ao órgão acometido. O conceito de IIR foi primeiramente sugerido por Jennings et al, em 1960 (BRAUNWALD et al., 1985) e divulgado por Buckerberg nos anos 80, e posteriormente por Braunwald e Kloner (VINTEN-JOHANSEN et al., 2005). Este conceito foi bem estudado para a lesão que ocorre devido à oclusão de uma coronária, passando por uma fase inicial chamada ‘isquemia’ provocada pela oclusão vascular em si e que leva à lesão miocárdica por hipóxia e falta de nutrientes. O comprometimento prossegue e se agrava num

segundo momento, onde paradoxalmente ao que se imaginaria, o processo de 'reperusão' da coronária (que deveria ser benéfico e resolutivo para a isquemia), mostrou-se tão ou mais lesivo que o comprometimento inicial. Este complexo mecanismo de lesão passou a ser chamado de Injúria Isquemia-Reperusão (BRAUNWALD et al., 1985). Desta forma, estruturou-se o conceito de que a restauração do fluxo sanguíneo por si só pode resultar em morte dos miócitos viáveis (PRZYKLENK, 1997).

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar a lesão pela reperusão, tais como a formação de radicais livres derivados do oxigênio, anormalidades na homeostase do cálcio, infiltração de neutrófilos e liberação de citocinas, ativação da cascata de coagulação e do sistema caliceína e o aumento da permeabilidade celular e mitocondrial (VINTEN-JOHANSEN et al., 2005).

Durante a CEC, o miocárdio é submetido a todos estes processos de lesão. A isquemia tecidual ocorre numa fase inicial devido ao clampeamento aórtico e à parada circulatória. Posteriormente, durante a fase de desclampeamento aórtico, ocorre a lesão gerada pela reperusão e concomitante disparo da cascata inflamatória, onde se agrega a SRIS, de modo que o resultado final consiste em morte celular e disfunção miocárdica (BRIX-CHISTENSEN, 2001). Assim, tem sido um grande desafio nas últimas décadas encontrar mecanismos de bloquear ou reduzir a IIR ou a resposta inflamatória. Atualmente, os pesquisadores têm buscado minimizar o comprometimento celular e não somente diminuir a mortalidade.

Em relação à isquemia induzida pela CEC, sua duração e gravidade são determinantes para a morte celular. Portanto, formas de diminuir este período foram propostas, como diminuição do tempo de isquemia ou utilização de técnicas que reduzam o comprometimento causado por ela, como a hipotermia e a cardioplegia. Após o conceito de lesão causada pela reperusão, diversas estratégias tentando reduzir ou modificar seus mecanismos entraram em pauta, como o uso de perfusatos alcalóticos, com baixo teor de cálcio e adjuntos metabólicos (ex.: piruvato, glicose-insulina, etc), reperusão gradual, uso de agentes antioxidantes, depleção de neutrófilos e bloqueio da resposta inflamatória com uso de corticóides ou inibidores da resposta inflamatória em vários níveis (VINTEN-JOHANSEN et al., 2005).

Neste contexto, uma das formas de minimizar o comprometimento miocárdico causado pela CEC, SIRS e IIR, é o chamado pré-condicionamento isquêmico (PCI).

O PCI consiste num mecanismo natural e potente de cardioproteção aos eventos de isquemia. Indivíduos que manifestaram angina no dia precedente a um episódio de infarto agudo do miocárdio apresentaram níveis séricos mais baixos do marcador de necrose (creatino quinase – CK) e melhor evolução, com menos eventos relacionados ao infarto em trinta dias ($p=0,03$) do que aqueles em que o infarto era súbito e não precedido de angina (KLONER et al., 1998). Assim, existiria um mecanismo endógeno de cardioproteção à isquemia através de episódios prévios de isquemia miocárdica de forma subletal.

Este potente mecanismo de proteção pode ser ativado por isquemia no próprio órgão que se quer proteger, ou mesmo em outro órgão à distância, como braços ou pernas (pré-condicionamento remoto – PCIr) (GHO et al., 1996). E ainda, esta proteção se potencializa em cerca de 24 horas após o estímulo do PCIr, numa fase tardia, chamada “segunda janela” (KONSTANTINOV et al., 2004).

Desta forma, estudos clínicos em humanos vêm sendo feitos, objetivando diminuir a lesão miocárdica causada pela CEC e sua conseqüente reação inflamatória. Em todos estes estudos, imediatamente antes da cirurgia cardíaca, aplicando-se breves episódios de isquemia em membros, tem sido evidente a redução dos marcadores de necrose miocárdica, como a troponina, no grupo em que o PCIr foi realizado (CHEUNG et al., 2006; HAUSENLOY et al., 2007; VENUGOPAL et al., 2009; WENWU et al., 2010).

1.1 Hipótese

Nossa hipótese é de que pacientes submetidos ao PCI no dia anterior à cirurgia cardíaca com circulação extracorpórea (cerca de 24 horas antes do início da cirurgia) apresentam menor ativação da resposta inflamatória e menor comprometimento miocárdico do que aqueles em que o procedimento não é realizado.

1.2 Relevância do estudo

A cada ano, são operadas aproximadamente 200 crianças com cardiopatia congênita no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP-USP), sendo aproximadamente 60% com CEC. Em nosso serviço, as taxas de mortalidade das crianças submetidas à CEC são extremamente elevadas (chegando a mais que 25% em recém-nascidos e lactentes jovens com cardiopatias complexas), sendo que o óbito na grande maioria das vezes associa-se à síndrome do baixo débito cardíaco pós-operatório e disfunção de múltiplos órgãos e sistemas. Como a etiologia da síndrome do baixo débito cardíaco é multifatorial, envolvendo a IIR e a ativação da resposta inflamatória, estudos que investiguem estes mecanismos são plenamente justificados e necessários, visando o desenvolvimento de estratégias que possam contribuir para a melhora da morbi-mortalidade destas crianças.

Nossa proposta é comparar a ativação gênica e a modulação inflamatória por meio da quantificação da expressão do gene I- κ B α (que é um produto da atividade do fator de transcrição nuclear κ B (NF- κ B)), e as concentrações da citocina pró-inflamatória IL-8 e da antiinflamatória IL-10 no pós-operatório de cirurgia cardíaca com CEC, em pacientes submetidos ou não ao PCI remoto. O comprometimento miocárdico será avaliado pelas concentrações da fração amino-terminal do fator natriurético tipo B (NT-pro BNP), que reflete o grau de disfunção ventricular e pelas concentrações da troponina I cardíaca (cTnI), que reflete a ocorrência e gravidade da lesão celular miocárdica. Além disso, serão avaliados parâmetros clínicos, laboratoriais e de imagem da síndrome de baixo débito cardíaco e a necessidade de drogas vasoativas no pós-operatório (pelo score inotrópico). Trata-se de um estudo intervencionista, mas o custo-benefício do PCI remoto é muito bom, já que é relativamente inócuo e com grande potencial benéfico na evolução das crianças submetidas à cirurgia cardíaca com CEC.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Pré-condicionamento isquêmico

O fenômeno de proteção do miocárdio a um insulto isquêmico sustentado promovido por breves episódios de isquemia não-letal foi denominado “pré-condicionamento isquêmico” (PRZYKLENK et al., 1998). O termo PCI foi usado pela primeira vez em 1986 quando Murry et al. publicaram seu estudo em cães, provando que breves períodos de isquemia transitória e não letal em uma coronária eram suficientes para proteger a área irrigada de lesões maiores, após um período de isquemia prolongada na mesma coronária. Houve redução da área infartada em até 75% no grupo que recebeu o PCI em relação ao grupo controle, demonstrando-se, portanto, o efeito benéfico do PCI no local onde foi aplicado (MURRY et al., 1986).

A idéia inicial era de que o mecanismo de proteção conferido pelo PCI se limitava em efeito mecânico e bioquímico no local de irrigação do vaso acometido, até que Przyklenk et al. demonstraram em cães que a aplicação do PCI em outra artéria coronária (no caso a circunflexa), também teve o poder de proteger o miocárdio “virgem” após isquemia sustentada de outro leito arterial (aplicado à artéria descendente anterior), com redução da área infartada em relação ao grupo controle. Este trabalho sustentava a idéia de que a proteção seria mediada por fatores hormonais, com ação regional. (PRZYKLENK, 1993). A desvantagem destes procedimentos era a necessidade de gerar estresse direto ao miocárdio ou comprometimento mecânico aos grandes vasos, de forma que sua aplicabilidade clínica ficaria reduzida.

Posteriormente, um passo importante foi dado, demonstrando-se que mesmo fazendo o PCI em vasos mesentéricos ou renais, havia redução da área infartada após isquemia prolongada em coronária, de maneira tão eficiente quanto a isquemia do próprio órgão (GHO et al., 1996). Este novo mecanismo de proteção à distância recebeu o nome de pré-condicionamento isquêmico remoto (PCIr). Entretanto, seria necessário tornar isso mais prático, para que se pudesse ter aplicabilidade clínica. Um grupo de pesquisadores se empenhou no estudo do PCIr e em 2002 foi provado

em porcos que mesmo o PCIr aplicado no membro inferior era capaz de reduzir a área infartada após isquemia no coração. No mesmo trabalho foi estudada a ação do PCIr no endotélio in vivo, em voluntários, mostrando que a aplicação do PCIr em um membro superior por meio de um manguito de pressão a 200 mmHg durante cinco minutos por três vezes, alterava a ação de drogas que atuavam no endotélio do membro contralateral, reforçando a hipótese da produção de fatores hormonais de proteção durante o procedimento e demonstrando pela primeira vez a funcionalidade do PCIr em humanos utilizando-se uma técnica não invasiva, inócua e de fácil reprodutibilidade clínica (KHARBANDA et al., 2002).

O mecanismo exato de como o PCIr oferece proteção permanece desconhecido. Um dos conceitos é que substâncias produzidas durante o procedimento, como adenosina e bradicinina, são liberadas na circulação, protegendo órgãos à distância. Outros mecanismos que vêm sendo estudados são a ativação de canais de potássio, da proteína quinase C (PKC) e da proteína quinase mitógeno-ativada (MAPK). Ainda, ativação da eritropoietina, liberação de óxido nítrico, prostaglandinas, HSP (*heat shock proteins*), opióides e até de radicais livres (TAPURIA et al., 2008; KLONER, 2009). A teoria humoral foi comprovada em estudos animais, mostrando que corações de coelhos que receberam um dialisado do plasma de animais doadores ou mesmo de humanos que foram previamente submetidos ao PCIr também apresentaram redução da área de necrose após isquemia (SHIMIZU et al., 2009).

Outra teoria é que o PCI de uma região ou órgão induz uma liberação generalizada de catecolaminas ou uma resposta simpaticomimética que induziria à cardioproteção. Alguns estudos têm sugerido que certas catecolaminas podem mimetizar o efeito benéfico do PCIr. Já demonstrado que o bloqueio ganglionar abole o efeito benéfico do PCIr, suportando a idéia de um envolvimento neurogênico nesta via (GHO et al., 1996).

Além disso, demonstrou-se que o PCIr modifica a expressão de genes responsáveis pela modulação da resposta inflamatória em humanos, com ativação de fatores de proteção percebidos 15 minutos após o estímulo e com amplificação desta resposta supressora de vias inflamatórias após 24 horas, período este que foi denominado de “segunda janela” (*second window*). Exatamente este período tardio será avaliado em nosso estudo. A modulação ocorre em genes responsáveis pela codificação de proteínas envolvidas na síntese de citocinas, quimiotaxia de

leucócitos, adesão e migração, exocitose, vias de sinalização da resposta inata e apoptose (KONSTANTINOV et al., 2004).

Inúmeros estudos têm sido publicados fazendo referência ao uso da técnica do PCIr com uso do manguito de pressão nos mais diversos cenários clínicos para proteção dos rins, fígado e cérebro, além de cirurgias vasculares e outros (TAPURIA et al., 2008). Deteremos-nos na análise do PCIr como forma de diminuir o comprometimento e a resposta inflamatória no pós-operatório de cirurgia cardíaca com uso de CEC.

2.2 PCIr: do laboratório para o leito

O primeiro estudo de aplicabilidade clínica do PCIr em humanos foi realizado em 37 crianças submetidas à cirurgia cardíaca no *The Hospital for Sick Children*, Toronto, Canadá (CHEUNG et al., 2006). Imediatamente antes do início da CEC, os pacientes, já anestesiados no centro cirúrgico foram submetidos a quatro períodos de isquemia, de 5 minutos cada, por insuflação de manguito de pressão em membros inferiores, intercalados com períodos de reperfusão de 5 minutos. Dos 37 pacientes estudados, nenhum apresentou efeitos adversos locais advindos da técnica. Os autores observaram que os níveis de troponina I no grupo submetido ao PCIr foram significativamente mais baixos que no grupo controle, indicando menor lesão miocárdica no grupo de estudo. Além disso, no grupo controle, houve necessidade de doses mais elevadas de drogas vasoativas no período de 3 a 6 horas após a cirurgia. No grupo que recebeu o PCIr foi observada queda na resistência das vias aéreas com diferença significativa 6 horas após a cirurgia. No entanto, não foram detectadas diferenças significativas nas concentrações de citocinas pró e antiinflamatórias entre os dois grupos, embora tenha sido observado um aumento da variância da interleucina 10 e uma redução na variância do fator de necrose tumoral-alfa no grupo submetido ao PCIr. Os autores ressaltam que, como a “segunda janela” de proteção fornecida pelo PCI ocorre 24 a 48 horas após o estímulo, um maior impacto na resposta inflamatória induzida pela CEC poderia ser observado se o PCIr fosse realizado no dia anterior à cirurgia. Portanto, são necessários estudos que avaliem a aplicabilidade clínica do PCIr, mas promovendo

o estímulo cerca de 24 horas antes da cirurgia, para avaliar os possíveis efeitos benéficos na “segunda janela”.

Até dezembro de 2009, outros dois estudos controlados foram publicados relatando o uso do PCIr também em adultos com o uso do manguito de pressão. O primeiro foi conduzido no *London Hospital*, em Londres, Reino Unido (HAUSENLOY et al., 2007). Um total de 57 pacientes submetidos ao *bypass* coronário foram aleatoriamente divididos em dois grupos: o primeiro recebeu o PCIr por meio da insuflação do manguito de pressão a 200 mmHg no membro superior no momento da anestesia por 3 vezes durante 5 minutos, intercalando com o mesmo tempo de reperfusão (n=27). O segundo grupo chamado controle (n=30) não recebeu o procedimento. Os níveis séricos de troponina T foram dosados antes do procedimento e 6, 12, 24, 48 e 78 horas após a cirurgia. Houve uma redução significativa das concentrações de troponina com 6, 12, 24 e 48 horas no grupo controle com redução de 43% em suas concentrações quando se utilizava a área sob a curva.

Outro estudo bem conduzido pelo mesmo grupo (VENUGOPAL et al., 2009), incluiu 45 pacientes que seriam submetidos eletivamente ao *bypass* coronário (com ou sem correção de estenose aórtica associada). Destes, um grupo recebeu o PCIr semelhante ao trabalho anterior (n=23) e o restante ficou como grupo controle (n=22). A troponina T foi dosada nos mesmos períodos antes e após a cirurgia e novamente apresentou uma redução de 42% nas concentrações da troponina ao se utilizar a área sob a curva.

Em janeiro de 2010, após a conclusão do nosso estudo, foi publicado outro estudo controlado em crianças com uso de CEC, sendo o primeiro em que o PCIr foi realizado 24 horas e também 1 hora antes da cirurgia cardíaca. Participaram 60 crianças, sendo 30 no grupo PCIr e 30 no grupo controle. O estímulo foi feito também com manguito de pressão em membro superior por 3 ciclos de 5 minutos alternando isquemia e reperfusão, com uma pressão fixa de 240 mmHg para todos os envolvidos. Foram incluídas apenas crianças com menos de 7 quilos (81 a 270 dias de vida). A função pulmonar foi avaliada por medidas de complacência estática e dinâmica do pulmão no pós-operatório, que se mostraram inferiores no grupo PCIr. O comprometimento miocárdico foi mensurado por quantificação de marcadores de lesão miocárdica (troponina I, CK, CK-MB e LDH), sendo que estes marcadores se apresentaram mais elevados antes da cirurgia no grupo PCIr e posteriormente, cerca

de 12 horas após a CEC apresentaram queda significativa em relação ao grupo controle. Este mesmo comportamento foi observado ao se mensurar marcadores de atividade inflamatória (IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- α) (WENWU et al., 2010).

2.3 Mensurando a SRIS

2.3.1 Interleucinas

A SRIS constitui-se numa complexa resposta a agentes agressores ao organismo. Foi bem descrita e estudada no paciente séptico, mas é suscitada em inúmeros cenários clínicos, como a resposta inflamatória que ocorre após a cirurgia cardíaca pediátrica. A associação entre anestesia, estresse cirúrgico e a CEC elicitam uma cascata de liberação de fatores humorais e celulares, que geram em um primeiro momento um efeito pró-inflamatório que faz parte do mecanismo de defesa e tende a ser benéfico, mas se houver hiperestimulação desta primeira resposta, o efeito pode trazer malefícios, gerando disfunção em múltiplos órgãos. Entre estes, e de nosso interesse, a disfunção do miocárdio.

A avaliação da SRIS é geralmente feita por meio de quantificação de mediadores inflamatórios na circulação periférica, como citocinas, proteínas de fase aguda e estudo de componentes do conteúdo de granulócitos com atividade imunológica (BRIX-CHISTENSEN, 2001).

As citocinas ou interleucinas são produzidas por células relacionadas à defesa em resposta a vários estímulos, sendo grande parte de sua produção regulada pelo NF- κ B (fator nuclear de transcrição de RNA) e dependendo do tipo, do nível sérico e da sua inter-relação com outros fatores pode desempenhar papel benéfico ou mesmo trazer malefícios ao organismo.

Após cirurgia cardíaca, a liberação de citocinas parece ser desencadeada principalmente pela IIR e sua elevação se correlaciona bem com o tempo de CEC (WAN et al., 1997). As principais citocinas com efeito pró-inflamatório no cenário da cirurgia cardíaca são o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 6 (IL-6) e a IL-8.

A produção do TNF- α é estimulada *in loco* no miocárdio após lesão tecidual. Os níveis séricos do TNF- α apresentam resultados conflitantes em alguns estudos, ora elevados após o desclameamento aórtico e ora indetectáveis. Apesar de demonstrado que o TNF- α contribui para disfunção miocárdica e instabilidade hemodinâmica após CEC (WAN, 1999), este não se mostrou um bom marcador, assim como a IL-6, para diferenciar pacientes com e sem disfunção cardíaca em trabalho anterior do grupo (CARMONA et al., 2008).

Ainda em relação a IL-6, esta tem participação na ativação de neutrófilos, assim como a IL-8, desencadeando o estresse oxidativo e também estimulando a expressão de moléculas de adesão leucocitária nas células endoteliais com aumento da permeabilidade. (KAWAMURA et al., 1993). Seus níveis estão relacionados à extensão da lesão tecidual (BRIX-CHRISTENSEN, 2001). Pacientes submetidos à cirurgia cardíaca, com ou sem CEC, não apresentaram diferença entre os seus níveis séricos, de forma a não ser um marcador específico de lesão pela CEC (TARNOK et al, 1999).

Optamos então por fazer a quantificação da IL-8, que se mostrou um bom marcador, ajudando a diferenciar crianças com e sem disfunção miocárdica no mesmo estudo anteriormente citado (CARMONA et al, 2008).

A IL-8 é um potente quimiotático de polimorfonucleares e seu nível sérico geralmente aumenta no pós-operatório, proporcionalmente ao tempo de CEC e de injúria isquemia-reperfusão (FINN et al., 1993).

Por outro lado, as citocinas que têm efeito predominantemente antiinflamatório são a IL-10 e o inibidor do receptor da interleucina 1 (IL-1ra). A IL-10 reduz a produção *in vitro* de citocinas pró-inflamatórias (CASSATELA et al., 1993). A sua ativação é muito individual e dependente do grau da resposta pró-inflamatória inicial (BRIX-CHRISTENSEN, 2001). Concentrações elevadas de IL-10 têm sido associadas a um melhor índice cardíaco no período pós-operatório de crianças submetidas a CEC (GROSEK S et al., 2006). A avaliação da citocina individualmente pode não trazer informação, por isso a relação entre citocinas pró e antiinflamatórias também podem ser utilizadas para comparação.

As concentrações séricas de citocinas e o momento do pico de sua liberação no pós-operatório de cirurgia cardíaca têm sido muito variáveis e há controvérsias na literatura. Razões que poderiam explicar esta disparidade podem incluir diferença nos estudos, número de casos e população estudada, com conseqüente variação no

peso e idade dos pacientes, complexidade da cardiopatia, técnica de CEC e equipamentos, anestesia, técnica de cardioplegia e proteção miocárdica e o uso de corticóides durante a cirurgia (BRIX-CHRISTENSEN, 2001).

2.3.2 Fator de Transcrição (NFκB)

Ainda no início do disparo da cascata inflamatória, sob estímulo de ativadores de diversas naturezas, como componentes dos agentes agressores, citocinas, oxidantes, condições de estresse e outros, começam a agir os fatores de transcrição. Estes são proteínas capazes de modular a transcrição do RNA e a expressão de genes que codificam moléculas e mediadores pró-inflamatórios, tais como moléculas de adesão, proteínas de fase aguda, citocinas (IL-6, IL-8) e moduladores da apoptose. Portanto, o NF-κB é considerado o pivô da resposta inflamatória.

Em células não estimuladas, o NF-κB é armazenado no citoplasma, sob a forma de complexos com proteínas inibitórias (I-κB). Quando a célula é exposta a estímulos (endotoxinas, vírus, TNF-α e IL-1), as proteínas-quinase são ativadas e promovem a fosforilação e degradação do I-κB, liberando o NF-κB, que se move para o núcleo, onde se liga a seqüências específicas de genes-alvo. Entre estes genes alvo incluem-se os genes ativadores da resposta pró-inflamatória. A transcrição de RNA mensageiro de um destes genes, aquele que codifica o I-κB, também é estimulada, de forma que a produção do inibidor do NF-κB acaba por inibir a própria transcrição do gene, gerando um *feedback* negativo. Desta forma, o I-κB produzido entra no núcleo e se liga ao NF-κB, causando a dissociação de sua ligação no DNA e seu retorno ao citoplasma como complexo inativo. Logo, o NF-κB termina sua própria atividade (SENFTLEBEN; KARIN, 2002). Existem dois tipos principais de inibidores: o I-κBα e o I-κBβ. No nosso estudo trabalhamos com o primeiro.

Porém, esta liberação e translocação do NF-κB do citoplasma para o núcleo não é suficiente e não é o único determinante da ativação do mesmo. Existe uma via não canônica de ativação do NF-κB, que envolve a fosforilação do NF-κB liberado e

esta porção fosforilada amplifica a atividade final do NF- κ B (KARIN; BEN-NERIAH, 2000).

Tem sido sugerido que a ativação exagerada de NF- κ B leva à ativação descontrolada de genes que codificam mediadores pró-inflamatórios, contribuindo para a patogênese da SIRS e da disfunção de múltiplos órgãos e sistemas. Pacientes com choque séptico apresentam atividade de ligação de NF- κ B aumentada em células mononucleares do sangue periférico (ZHANG; GHOSH, 2000). Há evidências de maior ativação do NF- κ B em pacientes gravemente doentes que morrem comparados com aqueles que sobrevivem (PATERSON et al., 2000). Desta forma, como a disfunção miocárdica é mediada por citocinas e pela intensidade da resposta inflamatória, a inibição desta resposta poderia ser benéfica nos pós-operatórios de cirurgia cardíaca. Estudos em animais mostram que a inibição do NF- κ B previne o infarto após a ligação da coronária (MORISHITA et al., 1997). Além disso, há evidências de que concentrações aumentadas de I- κ B α , inibindo a ação do NF- κ B, contribuem para o aumento da contratilidade (SHAMES et al., 1998). Ratos com superexpressão de I- κ B α e, portanto, com inibição aumentada do NF- κ B, não apresentam aumento da produção de TNF- α e não desenvolvem disfunção miocárdica após injeção de LPS (HAUDEK et al., 2001).

No pós-operatório de cirurgia cardíaca pediátrica, cerca de 30% das crianças evoluem com baixo débito, apesar do uso de inotrópicos. Um estudo em animais, mostrou que porcos que receberam um inibidor do NF- κ B pré-CEC apresentaram melhor performance hemodinâmica, com melhor função cardíaca (DUFFY et al., 2009). A inibição do NF- κ B atenua a inflamação e a apoptose relacionados a IIR (YEH et al., 2005).

A resposta do organismo ao estresse envolve a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e a produção de glicocorticóides, que atuam como imunomoduladores, aumentando a síntese de proteínas antiinflamatórias e diminuindo a síntese de proteínas pró-inflamatórias, pela inibição do NF- κ B. Por interação direta proteína-proteína, os glicocorticóides impedem a ligação do NF- κ B aos genes-alvo. Além disso, induzem a síntese de I- κ B, que resulta na retenção de NF- κ B no citoplasma. Apesar da controvérsia que existe no assunto, estudos têm demonstrado que o uso de corticóide pré-CEC gera um efeito antiinflamatório com aumento da IL-10, redução de citocinas pró-inflamatórias e da liberação de endotoxinas (PAPARELLA et al., 2002).

A ativação do NF- κ B é mais bem avaliada por ensaios em gel que quantificam a proteína ligada ao DNA (*EMSA - electrophoretic mobility shift assay*). Devido a dificuldade técnica e custo destes ensaios, foi proposta a quantificação da expressão relativa do gene do I- κ B α por reação da polimerase em cadeia em tempo real (RQ-PCR), como método de avaliação indireta da atividade do NF- κ B. Este método foi validado, de forma que a quantidade de RNA mensageiro (RNAm) obtida reflete a taxa de transcrição do gene correspondente e o balanço entre a estabilização e a degradação do RNAm. Há evidências de que após ativação do NF- κ B por um determinado estímulo, ocorre concomitantemente o aumento da quantidade de RNAm do I- κ B α e que após a remoção deste estímulo, os níveis de RNAm de I- κ B α retornam à linha de base em cerca de 6 horas (BOTTERO et al., 2003):

2.4 Mensurando o Comprometimento Miocárdico

Como exposto anteriormente, durante a CEC, com o clampeamento aórtico, o coração fica hipoperfundido e sofre um processo de isquemia. Durante o processo de liberação do *clamp* o miocárdio é reperfundido com sangue ativado pela resposta inflamatória sistêmica e substâncias oxidantes, gerando a IIR. Esta disfunção miocárdica está bem documentada após CEC em crianças (BURROWS FA et al, 1987) e aumenta a morbi-mortalidade (TAGGART DP et al, 1996).

A detecção precoce de lesão miocárdica constitui um desafio, sobretudo na faixa etária pediátrica (KAPLAN, 1997), pois na criança, os sinais de falência miocárdica são inespecíficos e, quando manifestos, a condição freqüentemente já está instalada e em estágio avançado. Clinicamente, estados de baixo débito cardíaco se manifestam por alterações do estado mental (irritabilidade ou letargia), diminuição da perfusão periférica, com extremidades frias, tempo de enchimento capilar prolongado (> 2 segundos) e pulsos periféricos com amplitude diminuída, e diminuição do débito urinário. Parâmetros laboratoriais úteis incluem o aumento do lactato arterial e a acidose metabólica, por hipóxia tecidual e metabolismo anaeróbico; a diminuição da saturação venosa mista ou central (< 65-70%) e o aumento da extração de oxigênio, com diferença arteriovenosa de oxigênio maior que 25 a 30%, devido a baixo fluxo sangüíneo tecidual; e o aumento das

concentrações plasmáticas de uréia, creatinina e potássio, por diminuição do fluxo sanguíneo renal e da taxa de filtração glomerular. Tem sido demonstrado que a ecocardiografia pode ser utilizada para estimar o débito cardíaco de maneira precisa, constituindo dispositivo útil para monitorização hemodinâmica (BROWN, 2002). A monitorização invasiva do débito cardíaco pelo uso de cateteres de artéria pulmonar (Swan-Ganz) pode, em adultos, facilitar o manejo terapêutico. Porém, na população pediátrica, dificuldades técnicas colocam seu uso em segundo plano.

As dificuldades do diagnóstico precoce do comprometimento miocárdico levaram à busca de alternativas ao julgamento clínico. Recentemente, as troponinas cardíacas e os peptídeos natriuréticos têm sido utilizados como bons marcadores de necrose e disfunção miocárdica e indicadores de mortalidade e prognóstico em pacientes com insuficiência cardíaca congestiva, infarto agudo do miocárdio, sepse, choque séptico e no pós-operatório de cirurgias cardíacas (CARMONA et al., 2008; CASTILLO et al., 2004; COLLINSON et al., 2007; HORWICH et al., 2003; MEHTA et al., 2004). Alguns autores recomendam o uso da abordagem “multimarcador”, utilizando as troponinas cardíacas e os peptídeos natriuréticos em conjunto (MCCULLOUGH; FONAROW, 2003).

As troponinas cardíacas são peptídeos componentes do mecanismo contrátil das células musculares cardíacas. Existem três tipos: T, I e C, que participam da contração muscular pela interação entre a actina e a miosina, tornando o processo cálcio-dependente. O aumento da concentração sérica de troponinas cardíacas indica lesão miocárdica ou perda da integridade da membrana celular. Fatores adicionais, como hipotensão, choque ou uso de agentes inotrópicos e vasopressores também podem contribuir para o aumento da cTnI em pacientes com SIRS (AMMANN et al., 2001).

Em pacientes submetidos à cirurgia cardíaca com CEC, a liberação de cTnI correlaciona-se com a extensão da lesão miocárdica isquêmica (DEHOUX et al., 2001). Em crianças submetidas à CEC, estudos prévios já demonstraram que a cTnI é um marcador sensível e específico de necrose miocárdica e que o aumento das troponinas nesta população supera o dos adultos em até cinco vezes (TAGGART et al., 1996). Há evidências de que as concentrações séricas de troponinas no pós-operatório apresentam valor prognóstico, de modo que pacientes com concentrações mais elevadas, apresentam maior morbidade e aumento do tempo de internação (IMMER et al., 1999). Em crianças, apresenta correlação com tempo de

uso de inotrópicos, uso de ventilação mecânica e tempo de internação na unidade de terapia intensiva (MODI et al., 2003). E ainda, dois estudos demonstram que as concentrações de troponina no primeiro dia pós-operatório constituem potente marcador independente de mortalidade intra-hospitalar (MILDH LH et al., 2006; BOTTIO T et al., 2006). Em neonatos submetidos à cirurgia cardíaca com CEC, a elevação pós-operatória da cTnT foi associada à presença de disfunção miocárdica e à intensidade da reação inflamatória (HÖVELS-GÜRICH et al., 2002).

A cTnI encontra-se em níveis normais em crianças com cardiopatia congênita estável ou em outras condições pediátricas gerais. A sua concentração sérica após cirurgia com CEC é o que mais se aproxima, atualmente, do que se poderia chamar “padrão-ouro” para detecção de lesão celular miocárdica (HIRSH et al., 1998).

Os peptídeos natriuréticos estão envolvidos na regulação da pressão arterial e da volemia. São produzidos no coração e liberados na circulação em resposta ao aumento da tensão transmural (estiramento da fibra muscular), refletindo hipervolemia ou sobrecarga pressórica (WITTHAUT et al., 2003). Atuam induzindo vasodilatação arterial e venosa, aumento da natriurese e diurese, inibição do sistema renina-angiotensina-aldosterona e da atividade nervosa simpática e relaxamento da musculatura lisa (AZZAZY; CHRISTENSON, 2003). Não possuem efeito cronotrópico ou inotrópico (MCCULLOUGH et al., 2004). Existem três tipos conhecidos de peptídeos natriuréticos: A (ANP), B (BNP) e C (CNP), que atuam através de receptores específicos, aumentando a produção de guanidina monofosfato cíclico (GMPc). O ANP é predominantemente liberado nos átrios em resposta à sobrecarga de volume, o BNP é sintetizado pelos ventrículos cardíacos em resposta ao estiramento da parede ventricular e o CNP é sintetizado e liberado pelo endotélio vascular (AZZAZY; CHRISTENSON, 2003). O BNP é produzido a partir de um precursor, prepro-BNP, que é clivado a pro-BNP e liberado no sangue, onde é finalmente processado na forma ativa de 32 aminoácidos (BNP) e no metabólito inativo amino-terminal pro-BNP (NT-pro BNP) (AZZAZY; CHRISTENSON, 2003; MCCULLOUGH et al., 2004).

Está bem estabelecido que os níveis circulantes de BNP estão aumentados em pacientes com insuficiência cardíaca e se correlacionam com a gravidade da doença, sendo um bom preditor de internação e mortalidade (COLLINSON et al., 2007; FONAROW; HORWICH, 2003). A meia-vida do BNP é de 22 minutos, o que o torna um bom marcador de mudanças agudas nas condições hemodinâmicas do

paciente. Porém, a meia-vida curta inviabiliza estudos com congelamento do sangue, de forma que nestas situações, recomenda-se avaliar o NT-pro BNP (MCCULLOUGH et al., 2004).

Estudos em crianças demonstram que os níveis séricos de NT-pro BNP mais elevados no pré-operatório de cirurgia cardíaca são preditores de pior evolução no pós-operatório, com maior tempo de uso de drogas. Os estudos não têm mostrado diferença entre as quantificações quando se comparam cardiopatias acianosantes com cianosantes, contrariando algumas correntes que sugeriam que a hipoxemia estimularia a liberação do BNP. Aparentemente, o BNP em crianças parece refletir mais a gravidade dos sintomas de insuficiência cardíaca e a disfunção cardíaca propriamente dita correlacionando-se negativamente com a fração de encurtamento e de ejeção (KOCH A et al., 2006), independentemente da cardiopatia congênita de base. Correlaciona-se também com o tempo de CEC (COSTELLO et al., 2005). Este marcador também sofre elevação diante da isquemia miocárdica, mas as troponinas são melhores marcadores de necrose celular. No pós-operatório sua elevação parece estar associada à gravidade da SIRS (GESSLER P et al., 2006). Em estudo anterior do nosso grupo, tanto as concentrações séricas elevadas de NT-pro BNP antes da CEC, quanto as de cTnI 4 horas após desclameamento aórtico se mostraram bons marcadores de baixo débito cardíaco em crianças (CARMONA et al., 2008).

3 OBJETIVOS

O estudo teve por objetivos avaliar a ativação da resposta inflamatória, a ocorrência e a gravidade da disfunção e lesão miocárdica, e a morbi-mortalidade no período pós-operatório de cirurgia cardíaca com circulação extracorpórea, nos pacientes submetidos ao pré-condicionamento isquêmico remoto no dia anterior à cirurgia, comparados a um grupo controle.

4 PACIENTES E MÉTODOS

Trata-se de um estudo intervencionista controlado com alocação aleatória de pacientes, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HC-FMRP-USP e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (ANEXOS D e E). Após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido pelos pais (APÊNDICE A), foram incluídos no estudo lactentes de 1 mês até 2 anos de idade internados na enfermaria de cardiologia pediátrica do HC-FMRP-USP no período pré-operatório. Após serem submetidos à cirurgia cardíaca com CEC os pacientes foram internados no Centro de Terapia Intensiva Pediátrica (CTIP) do mesmo serviço. Os critérios de não-inclusão foram: (a) diagnóstico clínico e/ou cromossômico de síndromes genéticas; (b) presença pré-operatória de infecções não controladas; (c) imunodeficiências suspeitas ou confirmadas; (d) uso de medicações imunossupressoras; (e) não aprovação dos pais e (f) pertencer à categoria de risco I de cardiopatias do escore de risco cirúrgico RACHS-1 (JENKINS, 2004) – (ANEXO B), pois estes cursam com tempo de CEC reduzido e curta internação no CTIP. Foram excluídos aqueles pacientes em que não foi possível a aplicação completa do protocolo de pré-condicionamento isquêmico remoto por algum motivo ou quando houve solicitação dos responsáveis em qualquer etapa do estudo.

Os pacientes foram alocados aleatoriamente por meio de programa de computador e divididos em 2 grupos: o grupo de estudo, que incluiu os pacientes submetidos ao PCIr cerca de 24 horas antes da cirurgia (grupo PCIr) e o grupo controle. As equipes de saúde responsáveis pelos cuidados intra e pós-operatórios dos pacientes não tiveram conhecimento a respeito da aplicação do PCIr.

O projeto foi cadastrado junto ao registro internacional de pesquisas clínicas em humanos, chamado *Clinical Trials*, sob o número NCT00868101. Este registro foi feito por meio da internet (www.clinicaltrials.gov) em site desenvolvido pelo Instituto Nacional de Saúde Americano (*U.S. National Institutes of Health – NIH*) em colaboração com o FDA (*Food and Drugs Administration*). Consiste em uma base de dados internacional com experimentos clínicos que estão sendo feitos ou já foram concluídos ao redor do mundo.

4.1 Protocolo do pré-condicionamento isquêmico remoto

Cerca de 24 horas previamente à realização da cirurgia cardíaca, o paciente alocado para o grupo PCIr recebeu a visita do profissional responsável pelo estudo, onde foi esclarecido ao cuidador quanto ao procedimento, expostos os riscos e benefícios e lido em conjunto e assinado o termo de consentimento. O procedimento foi realizado na enfermaria de cardiologia pediátrica. Utilizando-se esfigmomanômetro eletrônico Dixtal Biomédica modelo 2710 com manguito de tamanho apropriado, o paciente teve sua pressão arterial aferida por duas vezes num dos membros inferiores, com intervalo de 2 minutos entre as medidas. Um esfigmomanômetro marca Becton Dickinson com manguito 12 x 6 cm foi então insuflado no mesmo membro inferior a uma pressão 15 mmHg acima da média encontrada para a pressão sistólica anteriormente aferida. O membro foi mantido isquêmico com insuflação do manguito por 4 períodos de 5 minutos cada, sendo que entre os períodos de isquemia foram intercalados períodos de 5 minutos de reperfusão. Utilizada sedação leve conforme a necessidade com hidrato de cloral 16% via oral (40 mg/kg) ou midazolam endovenoso (0,1 a 0,2 mg/kg) em casos de grande ansiedade com o procedimento. Os pais foram convidados a assistir e a ficar do lado do paciente durante o pré-condicionamento.

4.2 Amostras de sangue e análise

Foram colhidas amostras de sangue pelo pesquisador por meio de cateteres intravasculares instalados antes do início da cirurgia (pressão arterial invasiva ou cateter de duplo lúmen) nos seguintes momentos: 4, 12, 24 e 48 horas após o fim da CEC. Cada amostra com volume médio de 2,5 ml, sendo acondicionada em tubo com anticoagulante (EDTA), da marca BD Vacutainer Systems®, Belliver Industrial Estate, Plymouth, UK. As amostras foram imediatamente centrifugadas a 3000 rpm durante 10 minutos em centrífuga refrigerada a 10 °C. A seguir, o plasma pipetado e separado em tubos Eppendorf®. A porção celular do centrifugado foi então preparada e adicionada ao reagente de armazenamento Trizol LS® (Invitrogen

Corporation, Carlsbad, CA, USA), conforme protocolo local (ANEXO H) e então as duas partes eram armazenadas a -70°C até a ocasião do processamento e análise.

As análises foram feitas no Laboratório de Endocrinologia do HC-FMRP-USP. As concentrações séricas de IL-8, IL-10 foram analisadas pelo método imunoenzimático ELISA (*enzyme linked immuno sorbent assay*), utilizando-se o kit comercial BD OptEIA (BD Biosciences Pharmigen, San Diego, CA), conforme protocolos (ANEXOS F e G). A cTnI foi quantificada pelo método do ensaio imunoenzimático de fase sólida com leitura por quimioluminescência utilizando-se o analisador IMMULITE 1000 (Siemens Medical Solutions Diagnostics, Los Angeles, CA), com controle de qualidade do ensaio (APÊNDICE D). O NT-pro BNP foi quantificado pelo método de ensaio imunoenzimático com leitura por eletroquimioluminescência por meio do analisador Cobas E 411 (Roche Diagnostics, 2006), também com controle de qualidade (APÊNDICE E).

Procedeu-se à extração do RNA das amostras armazenadas em Trizol LS®, conforme protocolo (ANEXO I). O RNA extraído foi quantificado (Tabela 22 – Apêndice F) por espectrofotometria a 260 nm (Eppendorf® BioPhotometer Plus, Eppendorf AG, Hamburg, Germany) e posteriormente verificada sua qualidade por meio de corrida em gel de agarose a 1.2% (APÊNDICE F e ANEXO J). Posteriormente foi produzido o DNA complementar (cDNA) utilizando-se o protocolo da transcriptase reversa e este foi diluído para a utilização no aparelho de RQ-PCR (ANEXO L). A ativação do NF- κ B nas células mononucleares e neutrófilos do sangue periférico foi avaliada indiretamente pela quantificação da expressão do RNA mensageiro do gene I κ B- α por PCR em tempo real (Applied Biosystems 7500 RT-PCR System, São Paulo, SP) e posteriormente deverá ser validada por meio da análise da proteína I κ B- α por Western Blotting, conforme técnicas previamente descritas (BOTTERO et al., 2003).

Para o RQ-PCR, utilizou-se a sonda Taqman® para I- κ B α humano [referência: Hs_00153283_m1, *Reporter*: FAM] (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA) e controle endógeno Beta-actina [*Reporter*: FAM] (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA) (ANEXO L). Todas as análises foram feitas em duplicata. O cálculo da expressão gênica do I- κ B α foi feito pelo método $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ descrito previamente (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). O calibrador foi escolhido de cDNA sintetizado a partir de RNA extraído de amostras de sangue de 12 crianças saudáveis em salas de coleta de exames ambulatoriais de rotina, após autorização do responsável e assinatura do

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido específico (APÊNDICE B). O resultado é expresso em unidades arbitrárias, devendo ser interpretado como a quantidade de vezes que o gene de interesse (1-κBα) encontra-se expresso em relação ao controle endógeno e em relação a indivíduos saudáveis. O controle endógeno (beta-actina) é um gene cuja expressão permanece constante na presença de estados mórbidos. Tentou-se utilizar dois controles endógenos, entretanto, o Gus-beta [*Reporter*. VIC] (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA) não apresentou expressão gênica adequada nas amostras utilizadas.

4.3 Cirurgia

Os pacientes foram operados segundo rotina já estabelecida no serviço de anestesia e cirurgia torácica do HC-FMRP-USP. Normalmente, os pacientes são submetidos à CEC utilizando-se o aparelho Edwards Lifescience® modelo BM-6, com oxigenadores de membrana e de *prime* colóide (concentrado de hemácias irradiado e filtrado e plasma fresco congelado), com manitol 1g/kg. A solução cardioplégica normalmente utilizada é do tipo cristalóide com potássio a 27 mEq/L. Durante a hipotermia utiliza-se a técnica *alpha-stat* para manutenção do equilíbrio ácido-básico. No final da CEC é utilizada ultrafiltração modificada. Corticóide é utilizado rotineiramente em todos os pacientes, em dose única na indução anestésica (30 mg/kg de metilprednisolona). A anestesia é normalmente feita com midazolam, fentanil e vecurônio em doses habituais. Ao final da cirurgia os pacientes são assistidos no Centro de Terapia Intensiva Pediátrico do HC-FMRP-USP, conforme rotinas previamente estabelecidas (CARLOTTI, 2005).

4.4 Coleta de Dados

Os dados referentes aos parâmetros clínicos, laboratoriais e uso de inotrópicos foram coletados em ficha própria (APÊNDICE C), juntamente com as

coletas das amostras de sangue: 4, 12, 24 e 48 horas após o fim da CEC. Estes dados incluem:

(a) características clínicas do paciente: idade, peso, estatura, área de superfície corpórea, etnia, saturação arterial por pulso oxímetro e diagnóstico no momento da cirurgia, além do escore clínico de gravidade PRISM - *Pediatric Risk of Mortality* (ANEXO A), avaliado nas primeiras 24 horas da admissão no CTIP (POLLACK; RUTTIMANN; GETSON, 1988);

(b) dados referentes a hemodinâmica do paciente, devidamente anotados pela equipe de enfermagem a cada hora no período pós-operatório:

- frequência cardíaca e frequência respiratória: colhidas da monitorização não invasiva e posteriormente ajustada (dividindo-se a frequência observada pela frequência esperada para a mediana da idade – percentil 50);

- pressão arterial sistólica e pressão venosa central: colhidas por meio de cateteres invasivos, sendo que a pressão arterial sistólica foi ajustada (dividindo-se o valor observado pela pressão sistólica esperada para a mediana da idade e do sexo);

- volume de líquidos infundido, colhido da folha de balanço hídrico da enfermagem e diurese, colhida por sonda vesical de demora ou pesagem de fraldas, ambos calculados em mL/kg/hora;

(c) gravidade da síndrome de baixo débito cardíaco, estimada por meio de um escore adaptado referente ao uso de inotrópicos, assim calculado: dose de dopamina + dose de dobutamina + dose de milrinona x 10 + dose de epinefrina x 100 + dose de nor-epinefrina x 100 (WERNOVSKY et al, 1995), além da presença de disfunção de múltiplos órgãos através do escore PELOD - *Paediatric Logistic Organ Dysfunction* (ANEXO C), feito diariamente (LETEURTRE et al, 2003);

(d) exames laboratoriais colhidos na rotina do CTIP: uréia e creatinina, que avaliam a função renal; contagem de leucócitos e plaquetas para avaliação de imunidade e infecções; a saturação arterial de oxigênio e a saturação venosa de oxigênio, utilizadas para o cálculo da extração de oxigênio (saturação arterial menos a venosa) e o lactato, que são indicadores indiretos do débito cardíaco e oferta de oxigênio aos tecidos; calculado a relação entre a pressão parcial de oxigênio e a fração inspirada de oxigênio, que reflete o comprometimento pulmonar a nível alveolar;

- (e) características do ato operatório: tipo e duração da cirurgia, duração da CEC e tempo de parada anóxica ou parada circulatória total, tempo de clampeamento aórtico e técnica de proteção miocárdica;
- (f) complexidade do procedimento cirúrgico, classificada de acordo com a escala RACHS-1 - *Risk Adjustment for Congenital Heart Surgery*, (ANEXO B) (JENKINS, 2004);
- (g) dados referentes ao pré-condicionamento, como suas complicações, uso de sedativos e possíveis intercorrências;
- (h) presença de disfunção e lesão miocárdica por meio da concentração sérica de NT-pro BNP e cTnI, e resultados do ecocardiograma (fração de ejeção pelo método de Teichholz) e eletrocardiograma feitos no pós-operatório imediato, juntamente com a descrição cirúrgica de áreas de isquemia visíveis durante o procedimento;
- (i) atividade inflamatória, pela concentração das citocinas IL-8 e IL-10, juntamente com a atividade do NFκB;
- (j) evolução pós-operatória: tempo de internação no CTIP, tempo de ventilação pulmonar mecânica, infecções, arritmias, mortalidade e desfecho até a alta hospitalar.

4.5 Análise estatística

O tamanho amostral foi calculado utilizando-se a concentração sérica de IL-8 como variável independente, com poder do teste de 80% e um erro tipo I (α) de 0,05. Foi utilizado o nível sérico de IL-8 (em pg/mL) 4 horas após a cirurgia para cálculo do tamanho amostral, pois este se mostrou um bom marcador da gravidade da resposta inflamatória e bom preditor de disfunção miocárdica em trabalho prévio produzido pela mesma equipe (CARMONA, 2008). Desta forma, uma diferença entre as médias após transformação logarítmica dos dados entre os pacientes que apresentaram ou não a síndrome do baixo débito cardíaco foi de 0,8, com desvio-padrão aproximado de 0,6 (σ). Assim, foi encontrado um $n=20$, sendo 10 pacientes para o grupo do PCIr e 10 para o grupo controle.

Os resultados das tabelas estão expressos em média e desvio-padrão ou n (%). As comparações entre os grupos foram feitas utilizando-se o teste U de Mann-

Whitney para comparação de variáveis contínuas, e o teste exato de Fisher para variáveis categóricas. Para comparar a expressão relativa do gene do I- κ B α , esta foi dividida arbitrariamente em dois grupos, considerados de expressão baixa e expressão alta (menor ou igual à mediana e maior que a mediana). Para a análise dos grupos isoladamente através do tempo, comparando os resultados obtidos em cada um dos quatro tempos entre si, foi utilizado um modelo linear de efeitos mistos, que contempla a dependência entre os períodos de tempo. Para comparação da área sob a curva entre os grupos foi utilizado um modelo de regressão linear. Foram utilizados os programas estatísticos SPSS® 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), SAS® 9.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) e Graphpad Prism® 5.0 (Graphpad Software, La Jolla, CA, USA). Foram considerados significantes os resultados quando $p < 0,05$.

4.6 Potenciais riscos inerentes ao estudo

Entende-se por pré-condicionamento uma técnica de isquemia não letal de um determinado órgão, portanto o risco de lesões ou danos permanentes é praticamente inexistente. Em seu primeiro trabalho, Murry (MURRY et al., 1986), já utilizava um tempo de isquemia de cinco minutos, sem causar morte de miócitos, mesmo no miocárdio que é bem sensível à hipóxia. O PCIr no projeto é feito em um membro inferior, que é mais resistente à isquemia. O músculo estriado resiste a até 6 horas de isquemia sem morte celular; o tecido nervoso resiste até 12 horas de isquemia sem lesão permanente e a pele até 48 horas (PITTA, 2003). As complicações que podem aparecer decorrentes da compressão do território venoso, como o aparecimento de petéquias ou discreto edema, nos pacientes com fragilidade capilar alterada ou distúrbios da hemostasia. Estes são triados por meio da avaliação da coagulação nos exames pré-operatórios de rotina (tempo de protrombina, tempo de tromboplastina parcial ativada e contagem de plaquetas). A estase venosa é feita rotineiramente na execução da prova do laço pelos mesmos 5 minutos, na investigação dos pacientes com dengue, sem risco de lesões graves. Devido ao tempo diminuto de isquemia, a possibilidade de trombose venosa devido

ao procedimento é praticamente inexistente, pois esta depende de longo tempo de estase.

Como exposto, o risco de lesões permanentes ou incapacitantes devido ao procedimento são exíguos, mas se porventura existirem, os pacientes receberão assistência integral e permanece o direito à indenização, seguindo a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde nos seus itens IV.1"l" e V.6.

4.7 Financiamento

Foram utilizados resultados dos exames laboratoriais de rotina, já realizados normalmente durante a internação. Não foram solicitados exames adicionais à rotina do hospital. As análises da cTnI, NT-pro BNP, IL-8 e IL-10, assim como a quantificação da expressão do I- κ B α e sua validação foram realizadas em caráter de pesquisa, onde foi solicitado e aprovado um auxílio-pesquisa à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) para estes itens (processo 2008/05067-8).

5 RESULTADOS

5.1 Dados demográficos e epidemiológicos

No período de fevereiro de 2008 a fevereiro de 2009 foram alocadas para a pesquisa 27 crianças, sendo que 5 foram excluídas: duas por não consentimento dos pais, duas por apresentarem idade acima de 2 anos (ambas cirurgia de Glenn) e uma criança que foi a óbito no centro cirúrgico por complicações inerentes à cirurgia em si, que pertencia ao grupo controle.

Sendo assim, trabalhamos com 22 crianças que preencheram a todos os critérios de inclusão, sendo 12 alocadas no grupo que foi pré-condicionado (grupo PCIr) e 10 no grupo controle. A idade média destas 22 crianças foi de $7,3 \pm 5,7$ meses e o peso $5,7 \pm 2,4$ kilogramas. Destes, 13 (59%) eram do sexo masculino e 14 (63,6%) eram brancos. O tempo de CEC médio foi de 98 ± 40 minutos. O escore de gravidade PRISM médio foi de $8,4 \pm 5,2$ pontos, sendo 50% pertencentes ao grupo II da classificação de risco cirúrgico RACHS-1 e o restante grupos III (31,8%) e IV (18,2%).

Os dados de cada paciente, incluindo sexo, idade, o grupo alocado, o diagnóstico e a cirurgia a que foram submetidos estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Descrição geral dos pacientes

INICIAIS	SEXO	IDADE (meses)	GRUPOS	DIAGNÓSTICO	CIRURGIA
CEP	M	1,4	1	Taussig-Bing	Jatene + tunelização
APAL	F	1,8	1	CIV + PCA	Correção CIV
HFGS	F	13,9	2	DSAVT	Correção DSAVT
VHPB	M	15,8	1	Atresia tricúspide lb	Glenn
JHS	M	13,7	1	Tetralogia Fallot	Correção Fallot
KGOR	F	1,4	2	Hipoplasia Arco Ao	Correção hipoplasia
GHSS	M	14,3	1	Tetralogia Fallot	Correção Fallot
ACCR	F	3,3	2	Hipoplasia Arco Ao + CIV	Correção hipoplasia + CIV
RBS	M	12,4	2	Tetralogia Fallot	Correção Fallot
SRG	M	1,4	2	d-TGA	Jatene + CIV
SDB	M	21,1	1	Tetralogia Fallot	Correção Fallot
CAS	M	5,1	2	CIV + PCA	Correção CIV
MDIQ	M	2,1	2	l-TGA + DVSVD	Bandagem Artéria Pulmonar
MLGC	F	10,3	2	Atresia Mitral + DVSVD	Glenn
PHF	M	8,9	2	Tetralogia Fallot	Correção Fallot
ASCB	F	5,0	1	Coarctação + DVSVD	Correção CoAo + CIV
JJSF	M	1,4	1	DATVP	Correção DATVP
MRSV	F	6,7	1	DSAV parcial + EP	Correção DSAV + Abertura da VSVD
DSL	F	4,0	1	CIV + PCA	Correção CIV
PACF	M	7,2	2	CIV + Estenose Pulmonar	Correção CIV + Abertura da VSVD
AHCG	F	7,9	1	DSAV parcial + Fallot	Correção DSAV + Abertura da VSVD
JAF	M	3,0	1	CIV	Correção CIV

Legenda: 1 – grupo pré-condicionado; 2 – grupo controle; CIV – comunicação interventricular; PCA persistência do canal arterial; DSAV – defeito do septo atrioventricular; VSVD – via de saída do ventrículo direito; DATVP – drenagem anômala total de veias pulmonares; DVSVD – dupla via de saída de ventrículo direito

Num primeiro momento, procedemos a uma análise que consistiu em explorar as características gerais das crianças e confrontar as variáveis demográficas entre os dois grupos (PCIr x Controle) para definir se eles eram comparáveis. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos quando comparamos as variáveis: idade, sexo, etnia, peso, estatura, área de superfície corpórea, saturação de oxigênio em ar ambiente no período pré-operatório, tempo de cirurgia, tempo de CEC, tempo de parada anóxica, o escore de gravidade PRISM e a classificação de risco cirúrgico cardíaco RACHS-1. Quanto ao procedimento cirúrgico propriamente dito, não houve diferença entre os tempos de cirurgia, CEC ou parada anóxica, como mostrado acima. Todos os pacientes receberam corticoterapia com metilprednisolona 30 mg/kg na indução e nenhum recebeu aprotitina. Apenas um paciente do grupo controle havia feito

cirurgia anterior, sendo esta o Blalock-Taussig. O número de complicações ocorridas no centro cirúrgico também foram semelhantes, sendo que estas incluíam crises de hipertensão pulmonar, sangramentos, arritmias, bloqueios fasciculares, etc (Tabela 2).

Tabela 2: Comparação entre as variáveis que conferem homogeneidade aos grupos

	GRUPO 1 (PCIr)	GRUPO 2 (Controle)	Valor de p
Sexo (Masculino)	7	6	1,00
Etnia (Branco)	6	8	0,32
Idade no dia cirurgia (meses)	7,9 ± 6,6	6,6 ± 4,6	0,64
Peso (Kg)	6,3 ± 3,1	4,9 ± 1,2	0,59
Estatura (cm)	64 ± 12	61 ± 6	0,64
ASC (m ²)	0,32 ± 0,1	0,28 ± 0,5	0,59
Saturação Pré-Op (%)	89 ± 11	89 ± 7	0,84
Tempo de Cirurgia (min)	213 ± 55	211 ± 53	0,91
Tempo de CEC (min)	98 ± 38	97 ± 44	0,97
Tempo de Parada (min)	65 ± 34	53 ± 41	0,42
PRISM (valor médio)	6,7 ± 4	10,5 ± 6	0,11
RACHS-1 (grupos III + IV)	5	6	0,26

Legenda: valores apresentados em número absoluto de indivíduos ou média e desvio - padrão. Foi considerado significativo um $p < 0,05$.

Com relação ao procedimento de PCIr, nos 12 pacientes pré-condicionados, o manguito foi mantido insuflado por quatro períodos de cinco minutos cada, intercalados por cinco minutos de reperfusão e isto foi feito cerca de $23,3 \pm 3$ horas antes da saída de CEC. Em todos os casos a mãe ou o responsável legal pela criança esteve presente, sendo que na maioria dos casos, o PCIr foi feito com a criança no colo do cuidador. As crianças aceitaram bem o procedimento, desde que distraídas, de forma que apenas duas precisaram de sedação com hidrato de cloral 16% 40 mg/kg, sendo que uma destas precisou também de uma dose de midazolam 0,1 mg/kg endovenoso, sendo monitorizadas e não apresentaram complicações devido à sedação. Nenhuma criança apresentou complicações nos membros

inferiores que pudessem ser atribuídas à técnica, como edema, equimoses, trombose ou mesmo petéquias, antes ou após a cirurgia.

5.2 Análise das variáveis relativas à hemodinâmica dos pacientes

Foram colhidas no pós-operatório as variáveis clínicas abaixo descritas. Os gráficos utilizam-se de *box-plots* para comparação entre as distribuições (mediana e variação) entre os grupos PCIr e Controle nos quatro tempos de observação. As tabelas utilizam a média e desvio-padrão dos valores obtidos em cada tempo separados por grupo de estudo e mostram os valores de p encontrados na comparação entre os dois grupos entre si em cada tempo específico e também a comparação separada por grupo entre os diversos tempos do estudo.

Quanto à frequência cardíaca, não houve diferença estatística entre os grupos em nenhum dos quatro tempos (figura 1).

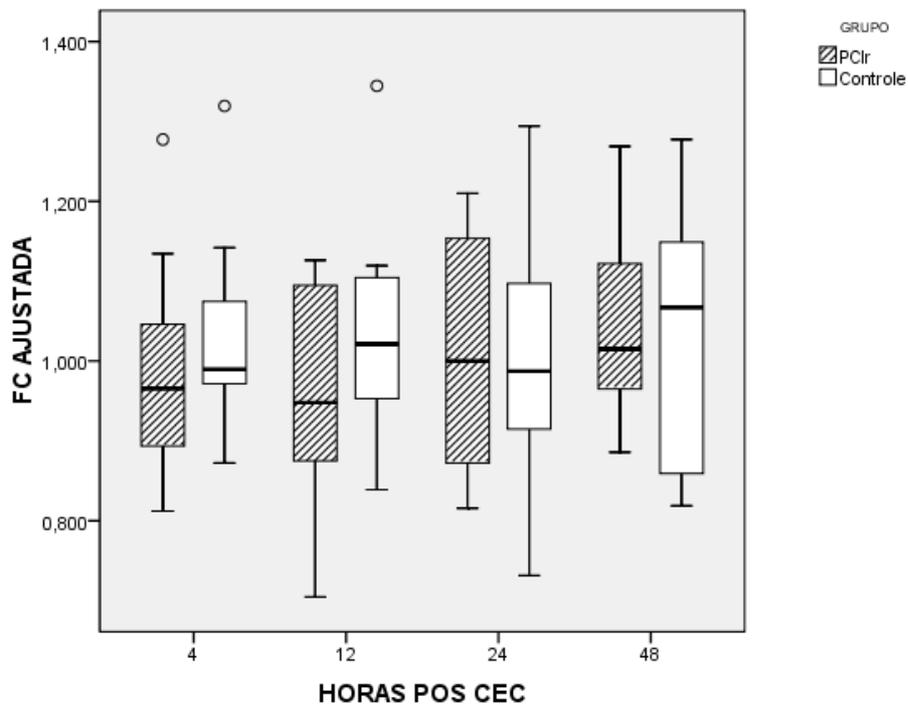


Figura 1 - Comparação da frequência cardíaca entre os grupos

Legenda: Box-plots representando a relação entre a frequência cardíaca (FC) encontrada sobre a FC ajustada para a idade através dos quatro tempos pré-definidos, comparando o grupo pré-condicionado (PCIr) com o grupo Controle

Tabela 3: análise temporal da frequência cardíaca separada por grupo

FC AJUSTADA						
		4 h	12 h	24 h	48 h	Diferenças significativas entre os tempos no mesmo grupo
GRUPO 1 (PREC)	Méd	1,02	1,00	1,02	1,06	12x48 horas
	DP	0,17	0,17	0,17	0,14	
GRUPO 2 (CONT)	Méd	0,98	0,97	0,99	1,02	
	DP	0,07	0,11	0,14	0,15	
Diferenças significativas entre os grupos no mesmo tempo						Valor de p

Legenda: Valores das médias (Méd) e desvio-padrão (DP) da frequência cardíaca (FC) ajustada para a média da idade encontradas nos diferentes tempos de estudo (4 horas, 12 horas, 24 horas e 48 horas após saída de CEC) separadas por grupo de estudo: grupo pré-condicionado (PREC) e grupo controle (CONT). O valor de p só foi descrito onde houve diferença estatística ($p < 0,05$)

Quando analisamos a evolução através do tempo (tabela 3), observamos que o grupo pré-condicionado apresentou uma frequência cardíaca significativamente maior com 48 horas em relação àquela mensurada com 12 horas ($p=0,007$).

A frequência respiratória esteve menor em todo o tempo no grupo pré-condicionado, sendo que com 48 horas (figura 2), esta diferença se mostrou significativa ($p=0,004$). Na análise temporal, houve uma queda da frequência respiratória com 48 horas apenas no grupo PCIr ($p=0,04$) (tabela 4).

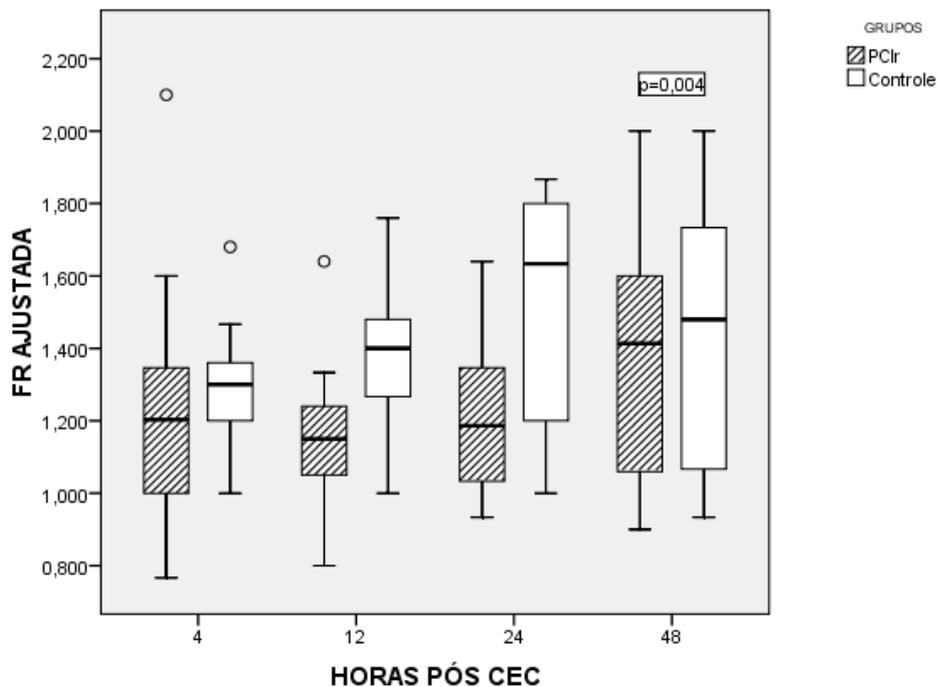


Figura 2 - Comparação da frequência respiratória entre os grupos

Legenda: Box-plots representando a relação entre frequência respiratória (FR) encontrada sobre a FR ajustada para a idade nos quatro períodos de estudo, comparando o grupo pré-condicionado (PCIr) com o grupo Controle. Houve diferença estatística em 48 horas ($p=0,004$)

Tabela 4: análise temporal da frequência respiratória separada por grupo

FR AJUSTADA							
		4 h	12 h	24 h	48 h	Diferenças significativas entre os tempos no mesmo grupo	
GRUPO 1 (PREC)	Méd	1,20	1,18	1,24	1,17	12x48 horas	0,04
	DP	0,22	0,17	0,22	0,24		
GRUPO 2 (CONT)	Méd	1,33	1,34	1,45	1,63		
	DP	0,34	0,27	0,34	0,29		
Diferenças significativas entre os grupos no mesmo tempo					0,004	Valor de p	

Legenda: Valores das médias (Méd) e desvio-padrão (DP) da frequência respiratória (FR) ajustada para a média da idade encontradas nos diferentes tempos de estudo (4 horas, 12 horas, 24 horas e 48 horas após saída de CEC) separadas por grupo de estudo: grupo pré-condicionado (PREC) e grupo controle (CONT). O valor de p só foi descrito onde houve diferença estatística ($p < 0,05$).

A pressão arterial sistólica, após ajustada, não apresentou diferença entre os grupos (figura 3). Quando analisada por grupo através do tempo também não foi observada diferença em nenhum momento (tabela 5).

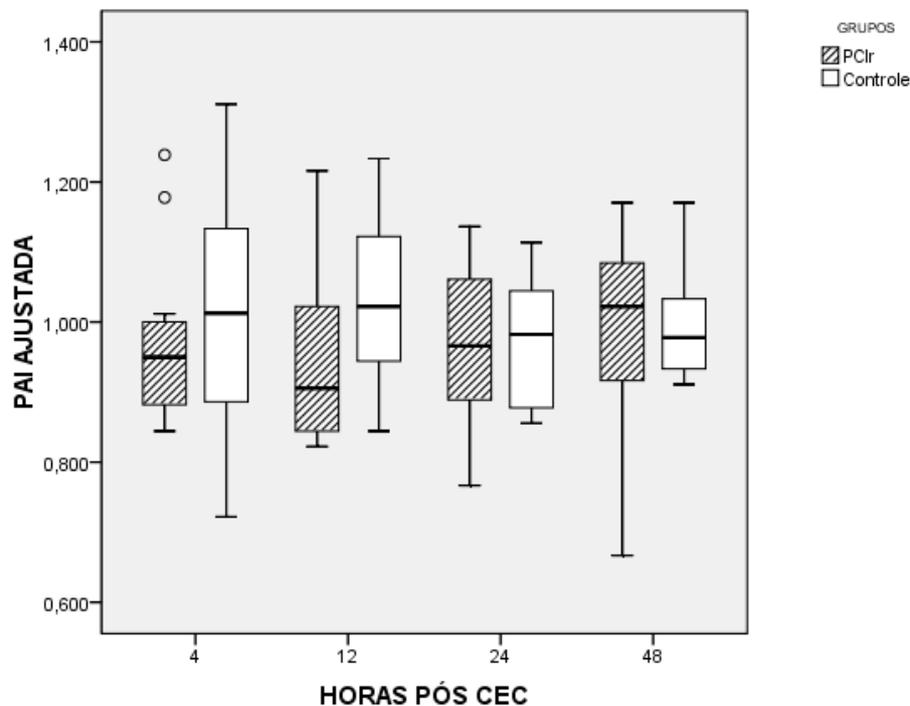


Figura 3 - Comparação da pressão arterial entre os grupos

Legenda: Box-plots representando a relação entre a pressão arterial sistólica invasiva (PAI) encontrada sobre a PAI no percentil 50 para idade e sexo, nos quatro períodos de tempo estudados, comparando o grupo pré-condicionado (PClr) e o grupo Controle.

Tabela 5: análise temporal da pressão arterial separada por grupo

PAI AJUSTADA						
		4 h	12 h	24 h	48 h	Diferenças significativas entre os tempos no mesmo grupo
GRUPO 1 (PREC)	Méd	0,98	1,00	0,97	1,01	-
	DP	0,16	0,15	0,10	0,14	
GRUPO 2 (CONT)	Méd	1,00	0,97	0,98	0,99	-
	DP	0,13	0,12	0,10	0,09	
Diferenças significativas entre os grupos no mesmo tempo						Valor de p

Legenda: Valores das médias (Méd) e desvio-padrão (DP) da pressão arterial sistólica invasiva (PAI) ajustada para a média da idade encontradas nos diferentes tempos de estudo (4 horas, 12 horas, 24 horas e 48 horas após saída de CEC) separadas por grupo de estudo: grupo pré-condicionado (PREC) e grupo controle (CONT). O valor de p só foi descrito onde houve diferença estatística ($p < 0,05$).

Não houve diferença quanto às doses de inotrópicos utilizadas nos pacientes dos dois grupos, ao se utilizar o escore inotrópico para a comparação (figura 4).

Por outro lado, houve queda significativa do uso de inotrópicos após 12 horas da saída de CEC apenas no grupo controle (tabela 6).

Ainda comparamos as médias do máximo valor do escore inotrópico encontrado nas primeiras 48 horas entre os dois grupos ($11,2 \pm 6,1$ no grupo PCIr e $11,9 \pm 8,1$ no grupo Controle), sem encontrar diferença entre estatística entre tais valores ($p=0,08$).

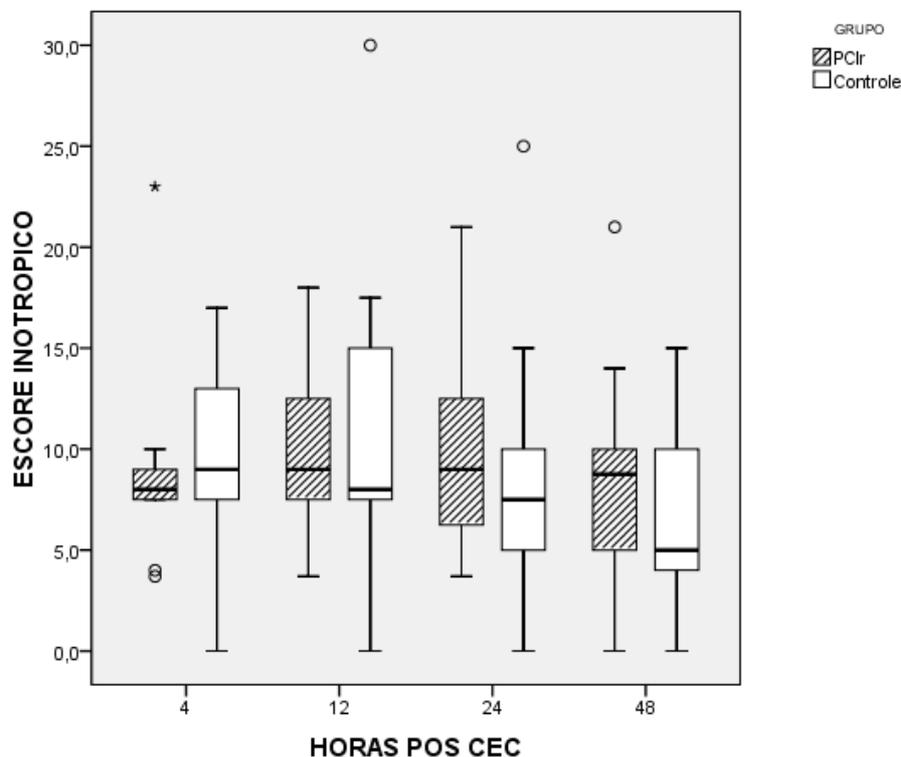


Figura 4 - Comparação do escore inotrópico entre os grupos

Legenda: Box-plots representando os escores inotrópicos encontrados nos quatro tempos do estudo, comparando o grupo pré-condicionado (PCIr) com o grupo Controle

Tabela 6: análise temporal do escore inotrópico separada por grupo

ESCORE INOTRÓPICO							
		4 h	12 h	24 h	48 h	Diferenças significativas entre os tempos no mesmo grupo	
GRUPO 1 (PREC)	Méd	8,7	10,0	10,1	8,8		
	DP	5,1	5,0	5,8	5,6		
GRUPO 2 (CONT)						4x48	0,002
	Méd	9,3	10,5	8,6	7,0	12x24	0,045
	DP	4,6	7,9	6,5	4,7	12x48 horas	0,0003
Diferenças significativas entre os grupos no mesmo tempo						Valor de p	

Legenda: Valores das médias (Méd) e desvio-padrão (DP) do escore inotrópico encontrado nos diferentes tempos de estudo (4 horas, 12 horas, 24 horas e 48 horas após saída de CEC) separadas por grupo de estudo: grupo pré-condicionado (PREC) e grupo controle (CONT). O valor de p só foi descrito onde houve diferença estatística ($p < 0,05$).

A pressão venosa central se manteve semelhante nos dois grupos (figura 5). Mesmo quando os grupos foram comparados separadamente através dos tempos não houve diferença (tabela 7).

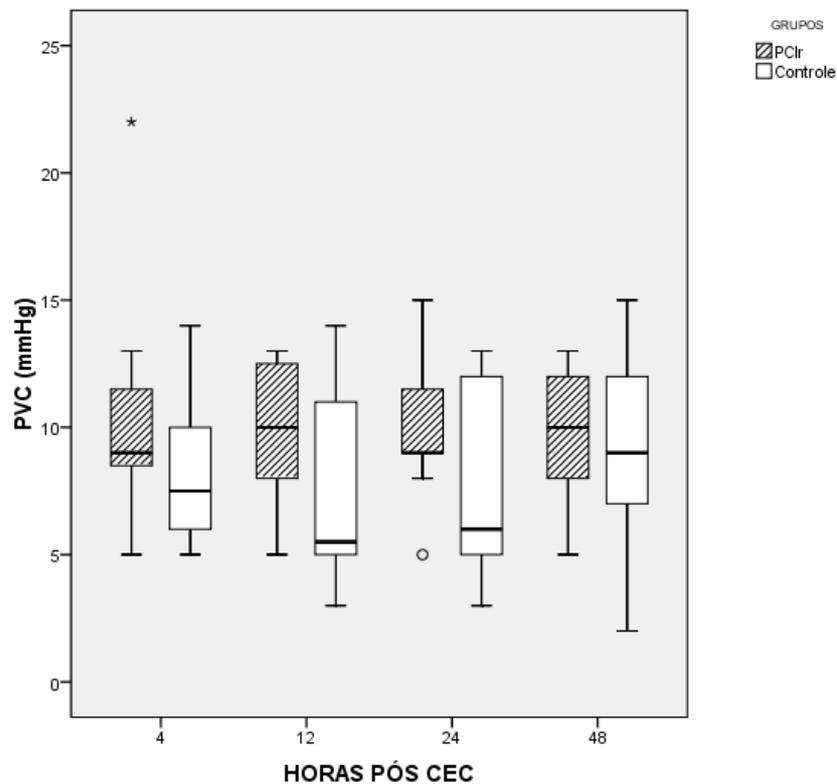


Figura 5 - Comparação da pressão venosa central entre os grupos

Legenda: Box-plots representando os valores da pressão venosa central (PVC) encontrados nos quatro tempos de estudo, comparando o grupo pré-condicionado (PCIr) com o grupo Controle

Tabela 7: análise temporal da pressão venosa central separada por grupo

PVC									
	4 h		12 h		24 h		48 h		Diferenças significativas entre os tempos no mesmo grupo
GRUPO 1 (PREC)	Méd	10,0	9,5	9,6	10,4	-			
	DP	4,9	3,2	3,6	3,9	-			
GRUPO 2 (CONT)	Méd	8,6	8,2	8,0	8,7	-			
	DP	3,1	3,7	3,4	2,8	-			
Diferenças significativas entre os grupos no mesmo tempo								Valor de p	

Legenda: Valores das médias (Méd) e desvio-padrão (DP) da pressão venosa central medida nos diferentes tempos de estudo (4 horas, 12 horas, 24 horas e 48 horas após saída de CEC) separadas por grupo de estudo: grupo pré-condicionado (PREC) e grupo controle (CONT). O valor de p só foi descrito onde houve diferença estatística ($p < 0,05$).

Não apresentaram diferenças significativas entre os grupos a taxa de volume de líquidos infundida (figura 6). Também não mostrou diferença a análise separada dos grupos através do tempo (tabela 8).

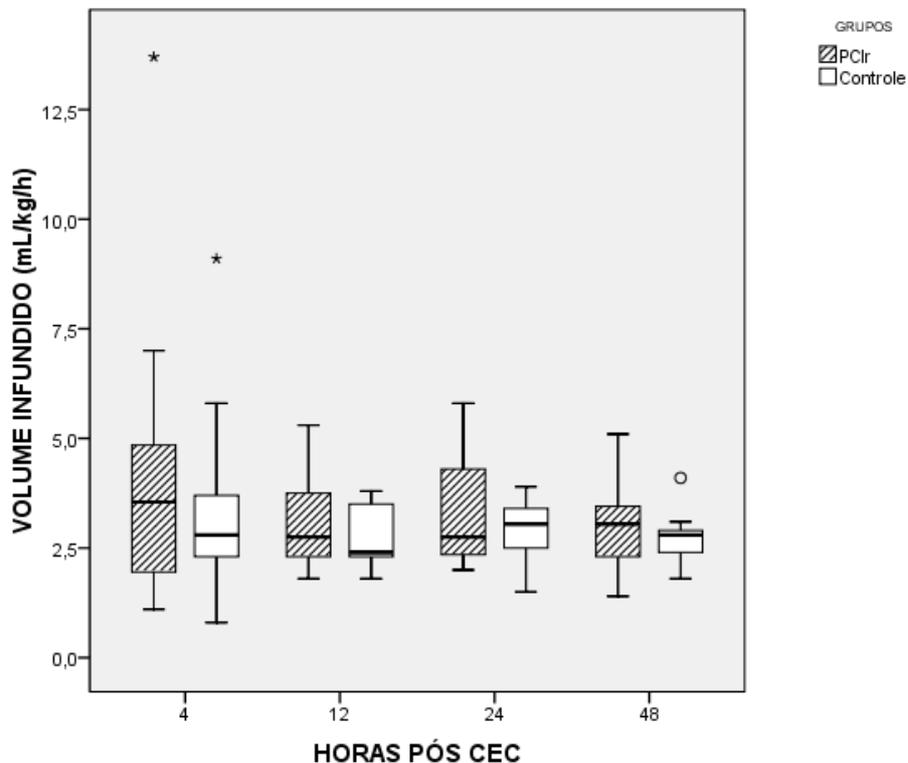


Figura 6 - Comparação do volume de líquidos infundido entre os grupos

Legenda: Box-plots representando o volume total de líquidos infundido nos quatro tempos do estudo, comparando o grupo pré-condicionado (PClr) como grupo Controle

Tabela 8: análise temporal do volume infundido separada por grupo

VOLUME						
		4 h	12 h	24 h	48 h	Diferenças significativas entre os tempos no mesmo grupo
GRUPO 1 (PREC)	Méd	3,6	2,8	2,9	2,9	-
	DP	3,8	1,1	1,2	1,1	
GRUPO 2 (CONT)	Méd	3,9	2,9	3,2	2,9	-
	DP	2,0	0,7	0,9	0,7	
Diferenças significativas entre os grupos no mesmo tempo						Valor de p

Legenda: Valores das médias (Méd) e desvio-padrão (DP) do volume infundido nos diferentes tempos de estudo (4 horas, 12 horas, 24 horas e 48 horas após saída de CEC) separadas por grupo de estudo: grupo pré-condicionado (PREC) e grupo controle (CONT). O valor de p só foi descrito onde houve diferença estatística ($p < 0,05$).

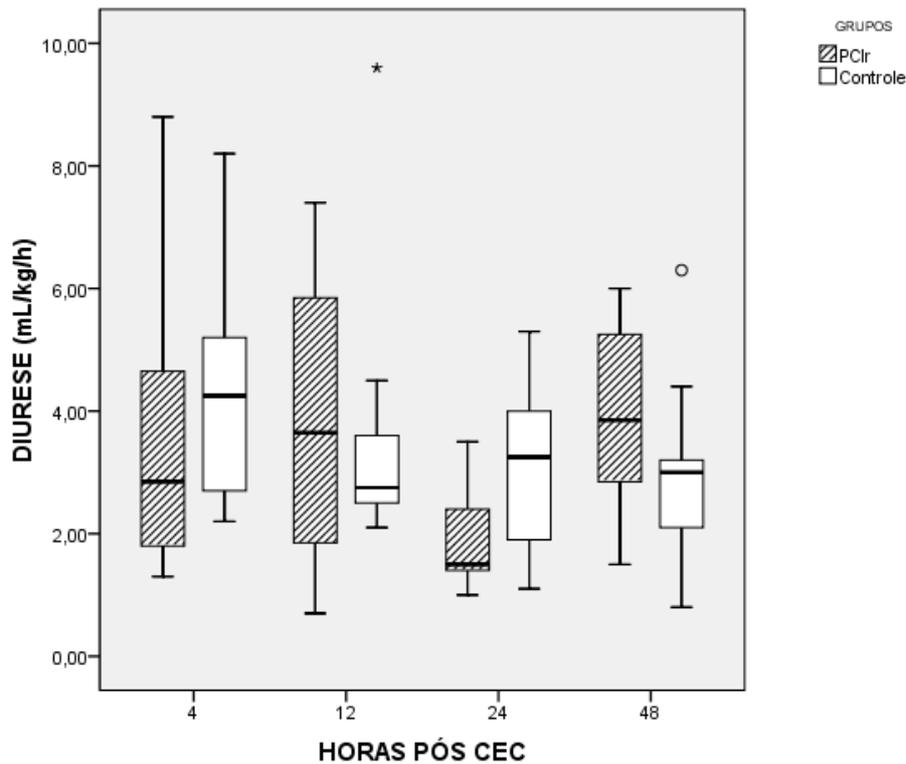


Figura 7 - Comparação da diurese entre os grupos

Legenda: Box-plots representando o volume de diurese nos quatro tempos do estudo, comparando o grupo pré-condicionado (PClr) com o grupo Controle

Com relação a diurese, não houve diferença ao se comparar os dois grupos nos diferentes tempos (figura 7), mas ao se comparar a diurese entre os tempos por grupo separadamente, notamos que houve um aumento significativo da diurese (tabela 9) com 48 horas em relação ao tempo 24 horas apenas no grupo pré-condicionado ($p=0,0009$).

Tabela 9: análise temporal do volume de diurese separada por grupo

DIURESE						
		4 h	12 h	24 h	48 h	Diferenças significativas entre os tempos no mesmo grupo
GRUPO 1 (PREC)	Méd	3,2	2,9	2,5	3,4	24x48 horas
	DP	1,2	1,6	1,3	1,6	
GRUPO 2 (CONT)	Méd	4,1	4,2	2,2	3,5	
	DP	2,5	2,6	1,2	1,6	
Diferenças significativas entre os grupos no mesmo tempo						Valor de p

Legenda: Valores das médias (Méd) e desvio-padrão (DP) do volume da diurese nos diferentes tempos de estudo (4 horas, 12 horas, 24 horas e 48 horas após saída de CEC) separadas por grupo de estudo: grupo pré-condicionado (PREC) e grupo controle (CONT). O valor de p só foi descrito onde houve diferença estatística ($p < 0,05$).

5.3 Análise dos exames laboratoriais dosados na rotina do CTIP

As concentrações de creatinina e uréia, quando comparadas entre os dois grupos, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas (figuras 8 e 9). Isto foi verdadeiro também quando comparamos as concentrações através do tempo por grupo separadamente (tabelas 10 e 11).

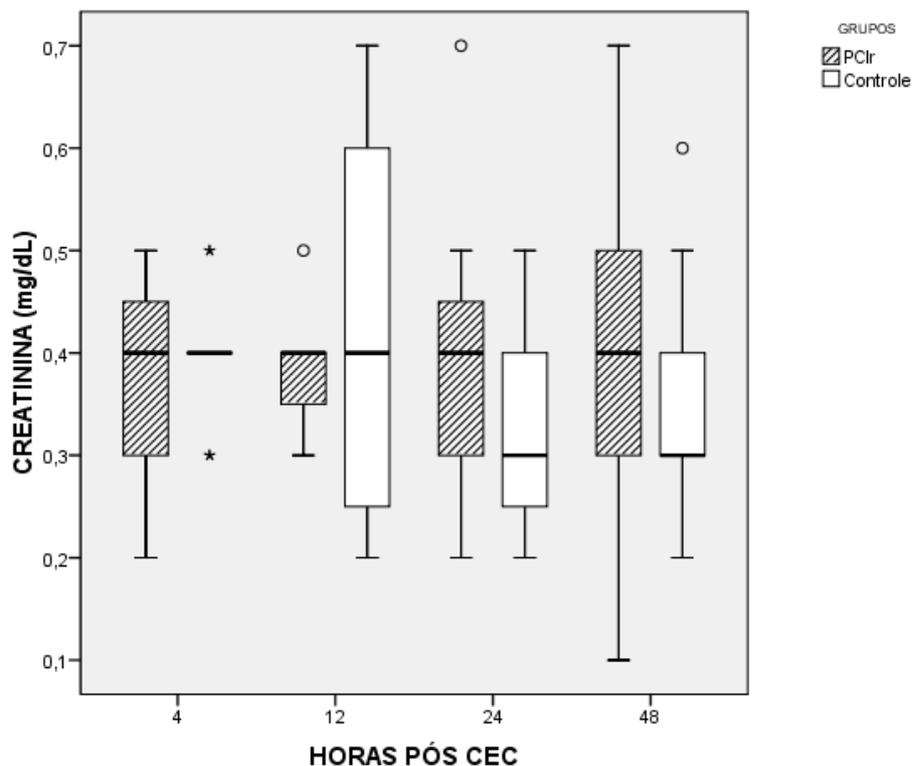


Figura 8 - Comparação da creatinina entre os grupos

Legenda: Box-plots representando as concentrações séricas de creatinina nos quatro tempos do estudo, comparando o grupo pré-condicionado (PClr) com o grupo Controle

Tabela 10: análise temporal da creatinina sérica separada por grupo

CREATININA						
		4 h	12 h	24 h	48 h	Diferenças significativas entre os tempos no mesmo grupo
GRUPO 1 (PREC)	Méd	0,4	0,4	0,3	0,3	-
	DP	0,1	0,1	0,1	0,1	
GRUPO 2 (CONT)	Méd	0,4	0,4	0,4	0,4	-
	DP	0,1	0,1	0,2	0,2	
Diferenças significativas entre os grupos no mesmo tempo						Valor de p

Legenda: Valores das médias (Méd) e desvio-padrão (DP) da concentração sérica de creatinina nos diferentes tempos de estudo (4 horas, 12 horas, 24 horas e 48 horas após saída de CEC) separadas por grupo de estudo: grupo pré-condicionado (PREC) e grupo controle (CONT). O valor de p só foi descrito onde houve diferença estatística ($p < 0,05$).

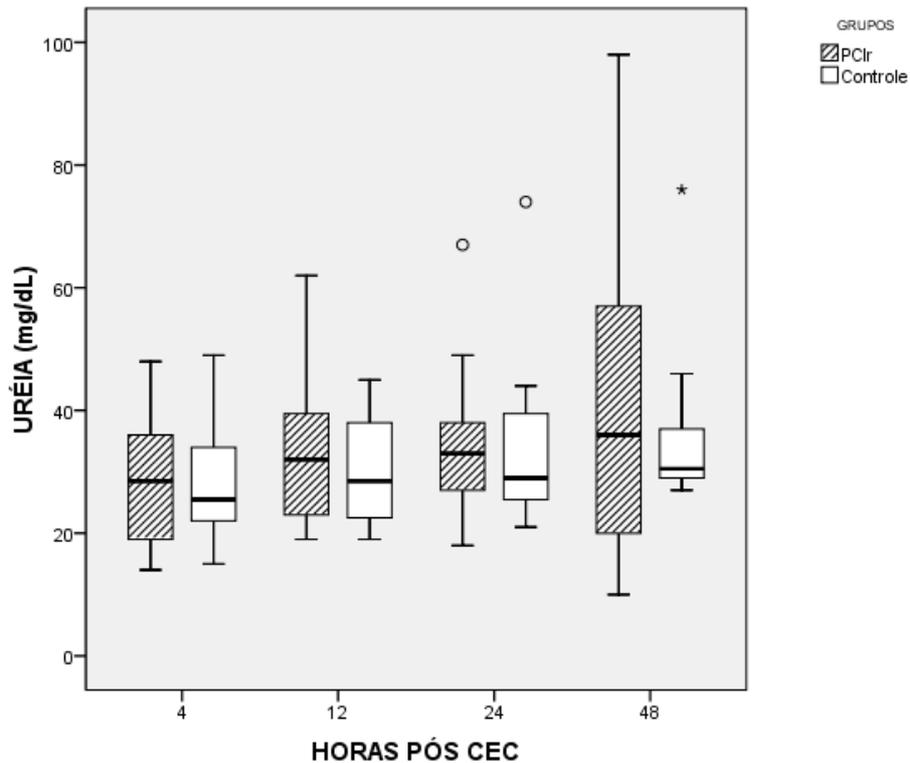


Figura 9 - Comparação da uréia entre os grupos

Legenda: Box-plots representando as concentrações séricas de uréia nos quatro tempos do estudo, comparando o grupo pré-condicionado (PClr) com o grupo Controle

Tabela 11: análise temporal da uréia sérica separada por grupo

URÉIA						
		4 h	12 h	24 h	48 h	Diferenças significativas entre os tempos no mesmo grupo
GRUPO 1 (PREC)	Méd	31,7	35,9	41,4	42,6	-
	DP	11,0	14,1	19,4	23,9	
GRUPO 2 (CONT)	Méd	27,8	33,5	29,7	40,8	-
	DP	10,7	2,6	5,3	19,4	
Diferenças significativas entre os grupos no mesmo tempo						Valor de p

Legenda: Valores das médias (Méd) e desvio-padrão (DP) da concentração sérica de uréia nos diferentes tempos de estudo (4 horas, 12 horas, 24 horas e 48 horas após saída de CEC) separadas por grupo de estudo: grupo pré-condicionado (PREC) e grupo controle (CONT). O valor de p só foi descrito onde houve diferença estatística ($p < 0,05$).

O nível sérico de lactato (em mmol/L) apresentou-se semelhante nos dois grupos em todos os tempos de coleta (figura 10). Houve uma queda significativa semelhante entre os dois grupos através do tempo (tabela 12).

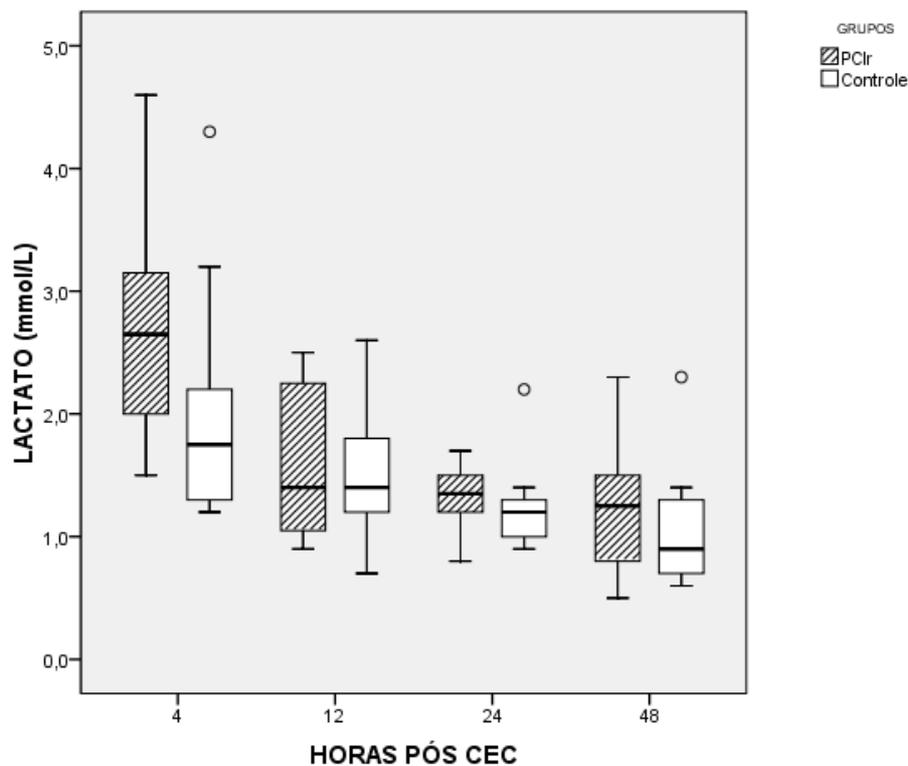


Figura 10 - Comparação do lactato entre os grupos

Legenda: Box-plots representando as concentrações séricas do lactato nos quatro tempos do estudo, comparando o grupo pré-condicionado (PClr) com o grupo Controle

Tabela 12: análise temporal do lactato separada por grupo

LACTATO							
		4 h	12 h	24 h	48 h	Diferenças significativas entre os tempos no mesmo grupo	
GRUPO 1 (PREC)	Méd	2,5	1,4	1,2	1,2	4x12	0,0001
	DP	1,1	0,2	0,2	0,5	4x24	<0,0001
GRUPO 2 (CONT)	Méd	2,3	1,7	1,4	1,1	4x48	<0,0001
	DP	0,7	0,8	0,4	0,6	12x48	0,019
Diferenças significativas entre os grupos no mesmo tempo						Valor de p	

Legenda: Valores das médias (Méd) e desvio-padrão (DP) da concentração sérica de lactato nos diferentes tempos de estudo (4 horas, 12 horas, 24 horas e 48 horas após saída de CEC) separadas por grupo de estudo: grupo pré-condicionado (PREC) e grupo controle (CONT). O valor de p só foi descrito onde houve diferença estatística ($p < 0,05$).

A saturação venosa de oxigênio, se mostrou com valores significativamente mais baixos com 12 horas ($p=0,042$) e 48 horas ($p=0,018$) após saída de CEC no grupo pré-condicionado (figura11). Isso se confirma no cálculo da extração de oxigênio (figura 12), que se mostrou mais alta neste grupo nos mesmos períodos de 12 horas ($p=0,021$) e 48 horas ($p=0,008$). Quando analisamos a extração de oxigênio entre os grupos isoladamente através do tempo (tabela 13), percebemos uma redução da extração após 12 horas apenas no grupo controle ($p=0,044$).

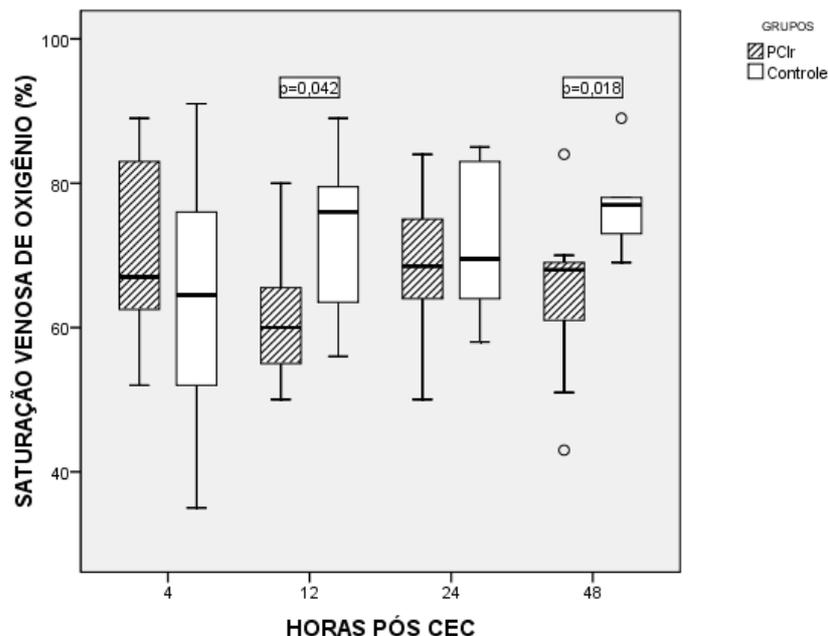


Figura 11 - Comparação da saturação venosa de oxigênio entre os grupos

Legenda: Box-plots representando a saturação venosa de oxigênio nos quatro tempos do estudo, comparando o grupo pré-condicionado (PClr) com o grupo Controle. Houve diferença estatística com 12 ($p=0,042$) e com 48 horas ($p=0,018$).

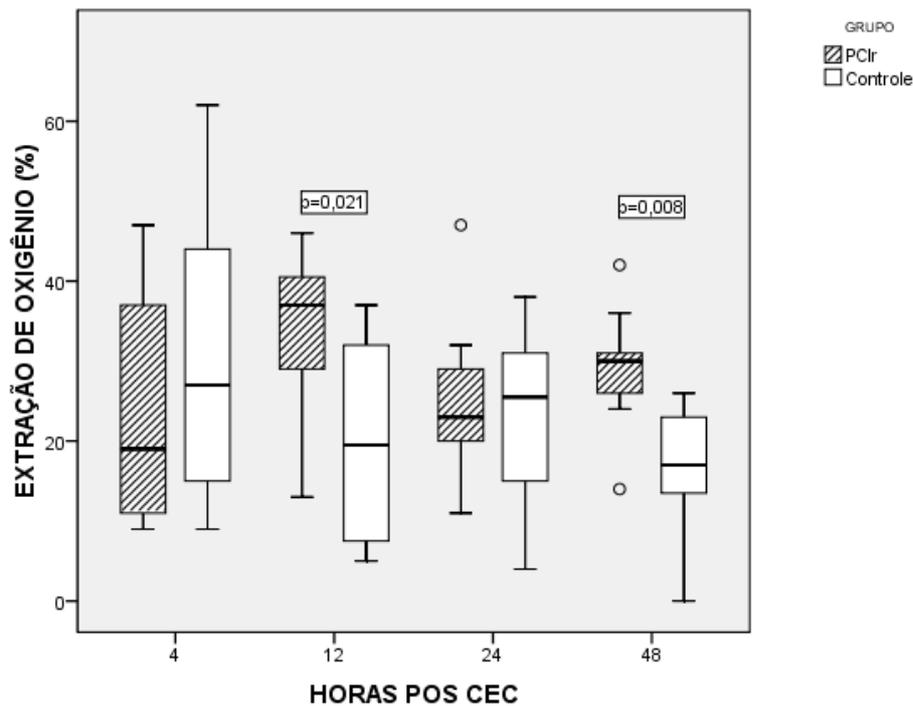


Figura 12 - Comparação da extração de oxigênio entre os grupos

Legenda: Box-plots representando a extração de oxigênio (saturação arterial - venosa) nos quatro tempos de estudo, comparando o grupo pré-condicionado (PClr) com o grupo Controle. Houve diferença estatística com 12 ($p=0,021$) e com 48 horas ($p=0,008$).

Tabela 13: análise temporal da extração de oxigênio separada por grupo

EXTRAÇÃO							
	4 h		12 h	24 h	48 h	Diferenças significativas entre os tempos no mesmo grupo	
GRUPO 1 (PREC)	Méd	22,8	32,4	25,3	28,4		
	DP	13,3	10,0	10,6	7,9		
GRUPO 2 (CONT)	Méd	30,5	22,5	23,3	21,6	4x12 horas	0,044
	DP	18,6	15,0	10,1	10,7		
Diferenças significativas entre os grupos no mesmo tempo			0,021		0,008	Valor de p	

Legenda: Valores das médias (Méd) e desvio-padrão (DP) da extração de oxigênio nos diferentes tempos de estudo (4 horas, 12 horas, 24 horas e 48 horas após saída de CEC) separadas por grupo de estudo: grupo pré-condicionado (PREC) e grupo controle (CONT). O valor de p só foi descrito onde houve diferença estatística ($p < 0,05$).

Em relação ao hemograma, ao se comparar o número de glóbulos brancos (figura 13) e contagem de plaquetas (figura 14) também não encontramos diferenças ao se comparar os grupos entre si em cada tempo.

Ao se comparar cada grupo isoladamente percebemos que o número de glóbulos brancos aumenta semelhantemente através do tempo (tabela 14). Porém, a

quantidade de plaquetas, apesar de mostrar aumento semelhante através do tempo nos dois grupos, só houve diferença estatisticamente significativa no grupo pré-condicionado (tabela 15).

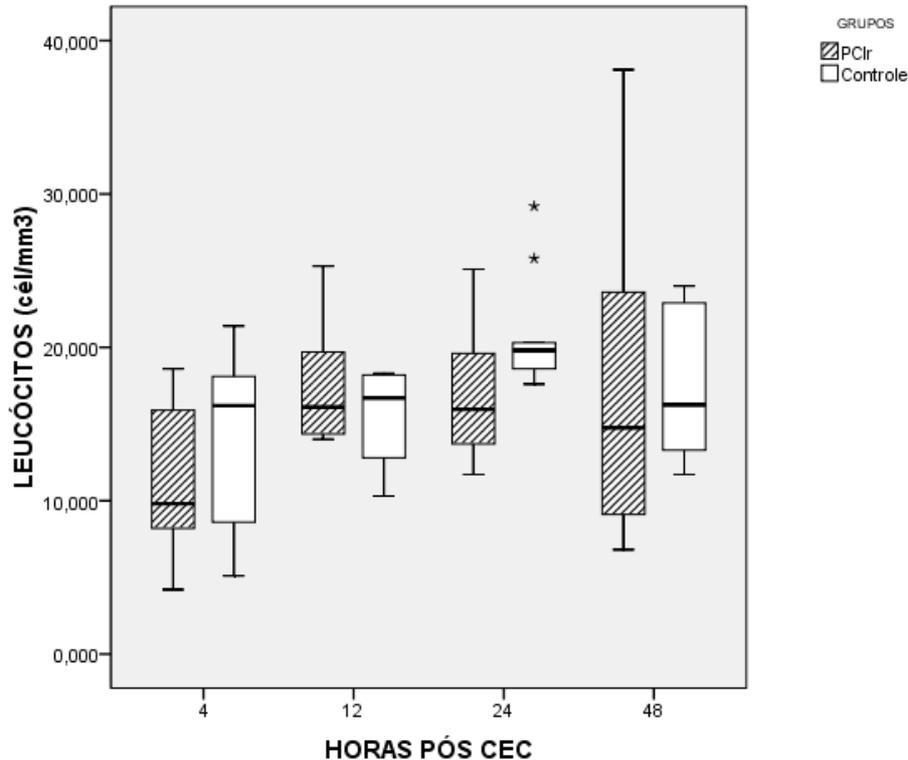


Figura 13 - Comparação da contagem de leucócitos entre os grupos

Legenda: Box-plots representando a contagem de glóbulos brancos (leucócitos) nos quatro tempos do estudo, comparando o grupo pré-condicionado (PClr) com o grupo Controle.

Tabela 14: análise temporal da contagem de glóbulos brancos separada por grupo

GLOBULOS BRANCOS						
		4 h	12 h	24 h	48 h	Diferenças significativas entre os tempos no mesmo grupo
GRUPO 1 (PREC)	Méd	13,1	16,5	18,0	16,4	4x12 0,009 4x24 0,0018 4x48 0,013
	DP	5,4	4,4	4,4	5,4	horas
GRUPO 2 (CONT)	Méd	12,7	17,0	19,9	18,4	4x24 0,0049 4x48 0,04
	DP	6,2	3,9	4,6	9,7	horas
Diferenças significativas entre os grupos no mesmo tempo						Valor de p

Legenda: Valores das médias (Méd) e desvio-padrão (DP) da contagem de glóbulos brancos nos diferentes tempos de estudo (4 horas, 12 horas, 24 horas e 48 horas após saída de CEC) separadas por grupo de estudo: grupo pré-condicionado (PREC) e grupo controle (CONT). O valor de p só foi descrito onde houve diferença estatística ($p < 0,05$).

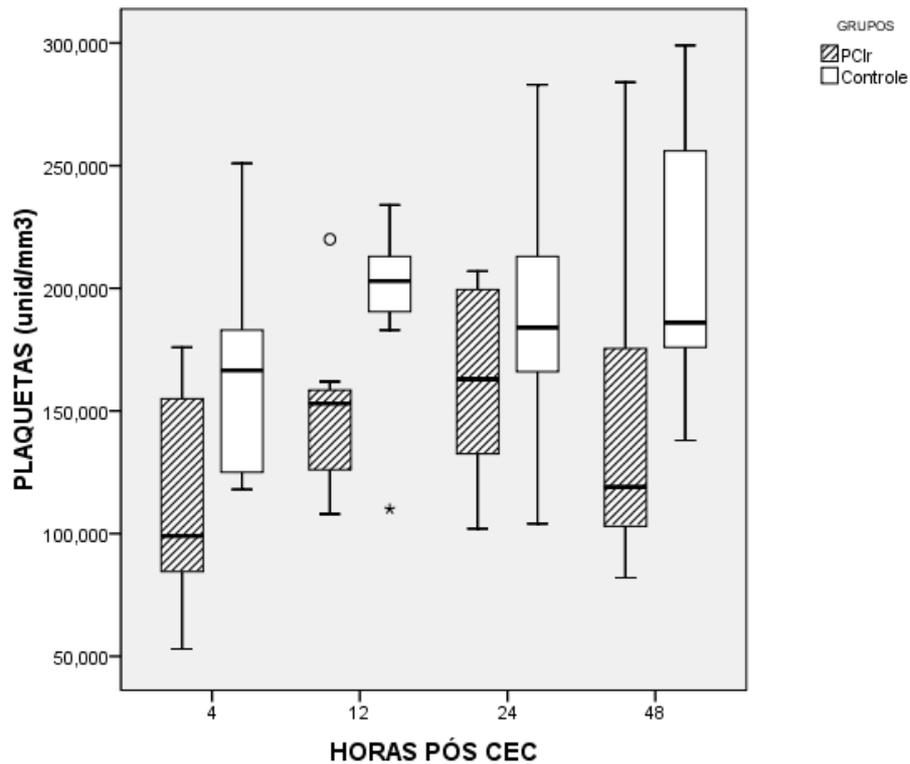


Figura 14 - Comparação da contagem de plaquetas entre os grupos

Legenda: Box-plots representando a contagem de plaquetas nos quatro tempos do estudo, comparando o grupo pré-condicionado (PClr) com o grupo Controle.

Tabela 15: análise temporal da contagem de plaquetas separada por grupo

PLAQUETAS						
	4 h		12 h	24 h	48 h	Diferenças sig- nificativas entre os tempos no mesmo grupo
GRUPO 1 (PREC)	Méd	131,5	168,8	151,6	167,3	4x12 0,001 4x24 <0,0001 4x48 0,003
	DP	57,7	44,1	43,0	67,3	
GRUPO 2 (CONT)	Méd	142,2	165,2	192,1	182,7	
	DP	38,5	39,5	44,1	67,4	
Diferenças signifi- cativas entre os grupos no mesmo tempo						Valor de p

Legenda: Valores das médias (Méd) e desvio-padrão (DP) da contagem de plaquetas nos diferentes tempos de estudo (4 horas, 12 horas, 24 horas e 48 horas após saída de CEC) separadas por grupo de estudo: grupo pré-condicionado (PREC) e grupo controle (CONT). O valor de p só foi descrito onde houve diferença estatística ($p < 0,05$).

A relação da pressão parcial arterial de oxigênio pela fração inspirada de oxigênio, foi semelhante na comparação (figura 15). Nenhum paciente necessitou de óxido nítrico inalatório para hipertensão pulmonar no pós-operatório.

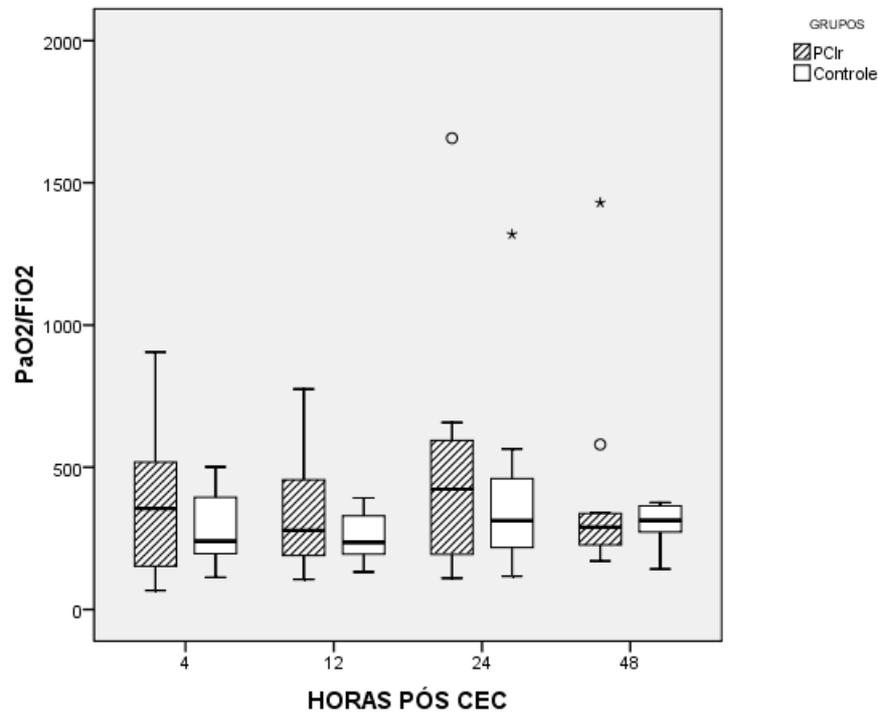


Figura 15 - Comparação da PaO₂/FiO₂ entre os grupos

Legenda: Box-plots representando a relação entre a pressão arterial parcial de oxigênio sobre fração inspirada de oxigênio (PaO₂/FiO₂) nos quatro tempos dos estudos, comparando o grupo pré-condicionado (PClr) com o grupo Controle.

Outras variáveis foram tomadas para mensurar a gravidade dos casos e disfunção de múltiplos órgãos (PRISM e PELOD) e seus valores foram expostos no item 5.6.

5.4 Análise das quantificações referentes a resposta inflamatória

Foram analisadas inicialmente as interleucinas. Mas a distribuição da liberação tanto da IL-8 (figura 16) quanto da IL-10 (figura 17) foi semelhante entre os grupos. Mesmo quando se utilizou a relação IL-8/IL-10 não houve diferença.

Quando analisados os grupos separadamente através do tempo, nota-se uma queda significativa das concentrações tanto de IL-8 (tabela 16) quanto de IL-10 (tabela 17).

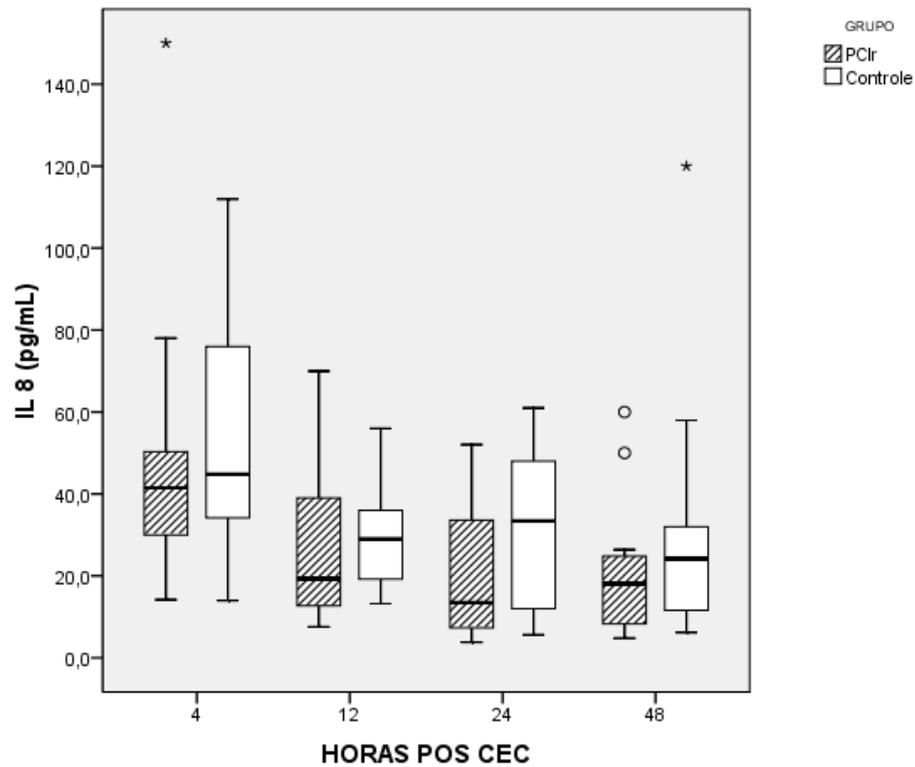


Figura 16 - Comparação da Interleucina 8 entre os grupos

Legenda: Box-plots representando a concentração sérica da Interleucina 8 (IL-8) nos quatro tempos do estudo, comparando o grupo pré-condicionado (PClr) com o grupo Controle.

Tabela 16: análise temporal da interleucina 8 separada por grupo

		IL 8				Diferenças significativas entre os tempos no mesmo grupo	
		4 h	12 h	24 h	48 h		
GRUPO 1 (PREC)	Méd	49,2	27,0	20,8	21,5	4x12	0,0021
	DP	37,9	20,7	17,2	18,2	4x24	<0,0001
GRUPO 2 (CONT)	Méd	54,0	32,8	32,2	30,9	4x48	<0,0001
	DP	27,9	12,0	19,4	32,8	12x24 horas	0,03
Diferenças significativas entre os grupos no mesmo tempo						Valor de p	

Legenda: Valores das médias (Méd) e desvio-padrão (DP) da concentração da Interleucina 8 nos diferentes tempos de estudo (4 horas, 12 horas, 24 horas e 48 horas após saída de CEC) separadas por grupo de estudo: grupo pré-condicionado (PREC) e grupo controle (CONT). O valor de p só foi descrito onde houve diferença estatística ($p < 0,05$).

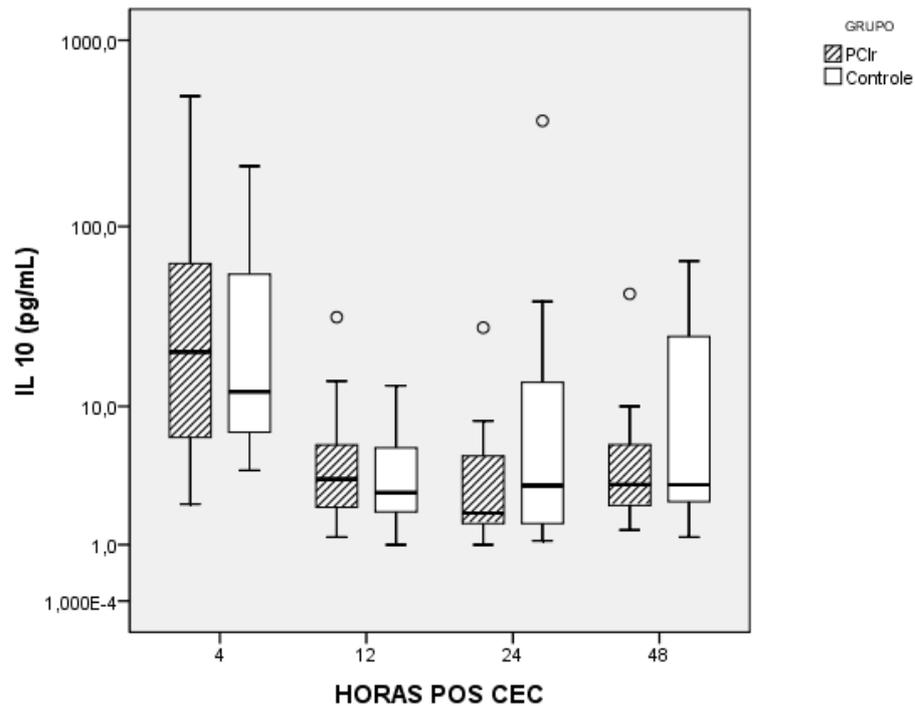


Figura 17 - Comparação da Interleucina 10 entre os grupos

Legenda: Box-plots representando as concentrações séricas de Interleucina 10 nos quatro tempos do estudo, comparando o grupo pré-condicionado (PClr) e o grupo Controle.
Obs.: a escala foi transformada em logarítmica para melhor visualização dos dados

Tabela 17: análise temporal da interleucina 10 separada por grupo

IL 10							
		4 h	12 h	24 h	48 h	Diferenças significativas entre os tempos no mesmo grupo (valor de p)	
GRUPO 1 (PREC)	Méd	75,0	5,9	5,1	7,1	4x12	0,0003
	DP	144,6	8,8	8,0	12,1	4x24	<0,0001
GRUPO 2 (CONT)	Méd	53,8	7,3	37,5	12,4	4x48	0,0003
	DP	80,7	4,6	109,9	19,6	horas	0,011
Diferenças significativas entre os grupos no mesmo tempo						Valor de p	

Legenda: Valores das médias (Méd) e desvio-padrão (DP) da concentração da Interleucina 10 nos diferentes tempos de estudo (4 horas, 12 horas, 24 horas e 48 horas após saída de CEC) separadas por grupo de estudo: grupo pré-condicionado (PREC) e grupo controle (CONT). O valor de p só foi descrito onde houve diferença estatística ($p < 0,05$).

A quantificação da expressão do gene I- κ B α também não apresentou diferença entre os grupos (figura 18), usando os valores absolutos e mesmo quando se comparava a expressão em relação à mediana (acima da mediana e abaixo da mediana, como sendo respectivamente, alta e baixa expressão). Mesmo a comparação entre os tempos separado por grupo de estudo não apresentou diferenças entre os resultados encontrados (tabela 18).

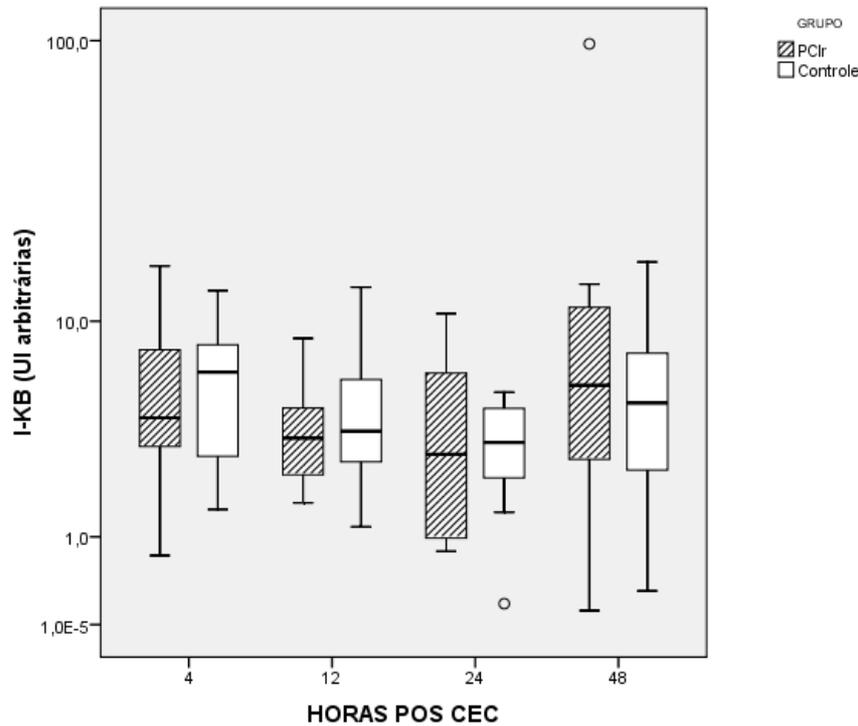


Figura 18 - Comparação da expressão do I-KB alfa entre os grupos

Legenda: Box-plots representando a quantificação relativa da expressão gênica do I-kB alfa nos quatro tempos do estudo, comparando o grupo pré-condicionado (PClr) com o grupo Controle.
Obs.: a escala foi transformada em logarítmica para melhor visualização dos dados

Tabela 18: análise temporal da expressão do I- κ B alfa separada por grupo

I κ B alfa						
	4 h		12 h	24 h	48 h	Diferenças significativas entre os tempos no mesmo grupo
GRUPO 1 (PREC)	Méd	6,9	3,7	4,1	14,7	-
	DP	5,2	2,0	3,7	27,8	
GRUPO 2 (CONT)	Méd	5,7	5,3	3,6	5,5	-
	DP	3,4	3,9	1,7	4,4	
Diferenças significativas entre os grupos no mesmo tempo						Valor de p

Legenda: Valores das médias (Méd) e desvio-padrão (DP) da expressão do I- κ B alfa nos diferentes tempos de estudo (4 horas, 12 horas, 24 horas e 48 horas após saída de CEC) separadas por grupo de estudo: grupo pré-condicionado (PREC) e grupo controle (CONT). O valor de p só foi descrito onde houve diferença estatística ($p < 0,05$).

5.5 Análise das quantificações referentes ao comprometimento miocárdico

A quantificação da cTnI que reflete a necrose celular miocárdica se mostrou sempre com concentrações mais elevadas no grupo PCIr, mas sem diferença estatisticamente significativa em nenhum dos tempos (figura 19). Ainda para a comparação entre os grupos foi calculada a diferença estatística entre a área sob a curva dos valores da cTnI, reafirmando a ausência de diferença estatística entre as concentrações encontradas nos dois grupos ($p=0,26$). Mesmo ao se comparar as médias e os desvios padrões em pg/L dos valores de pico da cTnI nos dois grupos ($33,7 \pm 21,5$ no grupo PCIr e $(22,3 \pm 19,3)$ não houve diferença estatística ($p=0,21$).

Quando se compara cada grupo separadamente através do tempo, percebemos uma redução dos níveis da troponina que ocorre independentemente do grupo estudado (tabela 19).

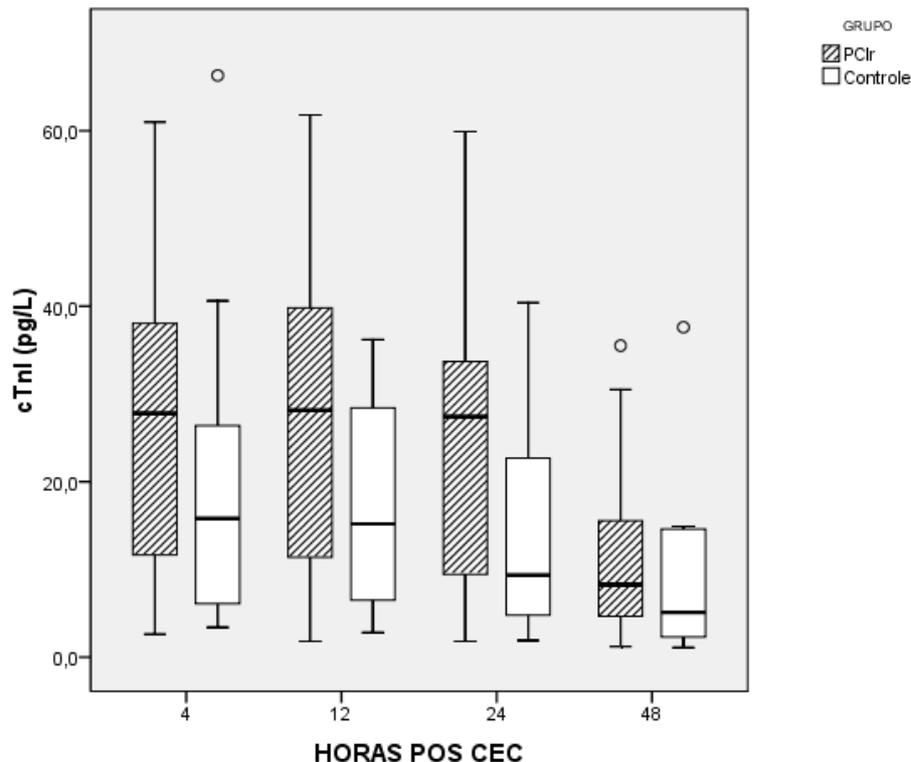


Figura 19 - Comparação da troponina I entre os grupos

Legenda: Box-plots representando a concentração sérica da Troponina I cardíaca (cTnI) nos quatro tempos de estudo, comparando o grupo pré-condicionado (PCIr) e o grupo Controle.

Tabela 19: análise temporal da concentração de troponina separada por grupo

TROPONINA							
	4 h		12 h	24 h	48 h	Diferenças significativas entre os tempos no mesmo grupo	
GRUPO 1 (PREC)	Méd	26,5	27,8	24,9	12,2	4x48	0,0001
	DP	18,1	20,0	19,1	11,3	12x48 24x48 horas	0,0001 <0,0001
GRUPO 2 (CONT)	Méd	22,1	20,5	18,8	11,4	4x24 4x48	0,006 <0,0001
	DP	18,9	11,9	12,6	10,6	12x24 12x48 24x48 horas	0,002 <0,0001 0,0001
Diferenças significativas entre os grupos no mesmo tempo						Valor de p	

Legenda: Valores das médias (Méd) e desvio-padrão (DP) da concentração sérica de troponina I nos diferentes tempos de estudo (4 horas, 12 horas, 24 horas e 48 horas após saída de CEC) separadas por grupo de estudo: grupo pré-condicionado (PREC) e grupo controle (CONT). O valor de p só foi descrito onde houve diferença estatística ($p < 0,05$).

O NT-pro BNP, um marcador de disfunção miocárdica, apresentou concentrações mais baixas em todos os tempos, sendo que esta diferença se mostrou significativa (figura 20) nos tempos 12 horas ($p=0,035$) e 24 horas ($p=0,035$). Esta diferença foi reforçada ao se calcular a diferença estatística da área sob a curva (figura 21) entre os dois grupos ($p=0,02$). Quando avaliamos as concentrações do NT-pro BNP por grupo separadamente através do tempo, percebemos um comportamento semelhante com aumento significativo em 12 e 24 horas e posterior redução (tabela 20).

Ao se comparar as médias e desvio-padrão das concentrações máximas (de pico) em pg/mL do NT-pro BNP, encontramos uma diferença estatística favorecendo o grupo PCIr (11.546 ± 6.599) comparativamente ao grupo controle (19.853 ± 9.767) e esta diferença foi estatisticamente significativa ($p=0,02$).

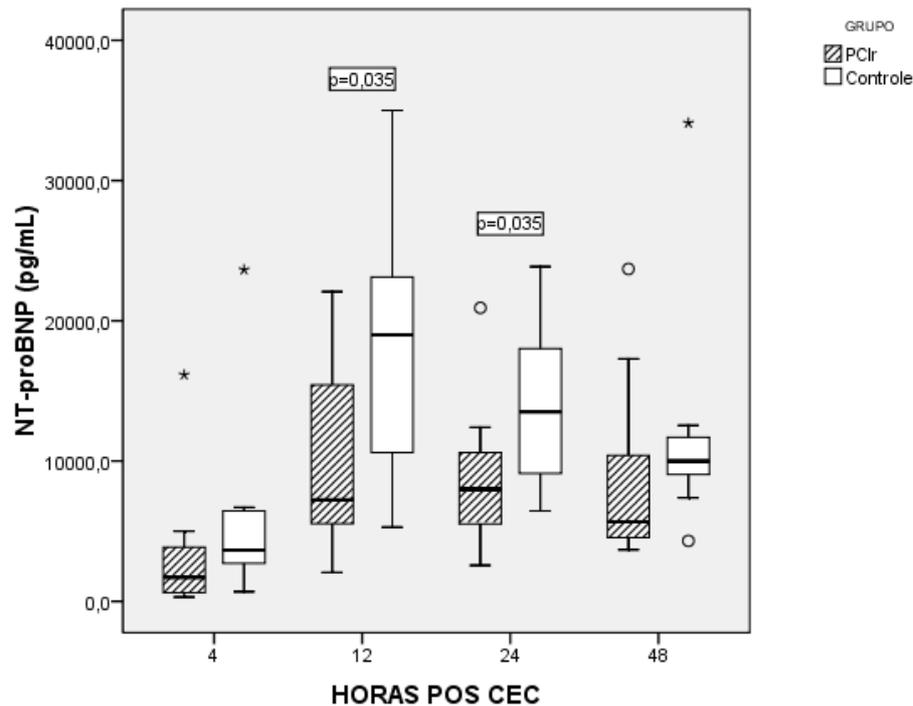


Figura 20 - Comparação do NT-pro BNP entre os grupos

Legenda: Box-plots representando as concentrações séricas do NT-pro BNP nos quatro tempos do estudo, comparando o grupo pré-condicionado (PClr) com o grupo Controle. Houve diferença estatística com 12 ($p=0,035$) e 24 horas ($p=0,035$).

Tabela 20: análise temporal da concentração de NT-pro BNP separada por grupo

NT-proBNP							
	4 h		12 h	24 h	48 h	Diferenças significativas entre os tempos no mesmo grupo	
GRUPO 1 (PREC)	Méd	3150,8	10303,3	8565,5	8904,2	4x12	<0,0001
	DP	4603,5	7122,8	5155,0	6435,0	4x24	<0,0001
GRUPO 2 (CONT)	Méd	5044,9	16022,6	12681,6	11331,8	4x48	<0,0001
	DP	6316,4	9107,1	5822,9	8077,5	horas	0,0003
Diferenças significativas entre os grupos no mesmo tempo			0,035	0,035		Valor de p	

Legenda: Valores das médias (Méd) e desvio-padrão (DP) da concentração sérica de NT-pro BNP nos diferentes tempos de estudo (4 horas, 12 horas, 24 horas e 48 horas após saída de CEC) separadas por grupo de estudo: grupo pré-condicionado (PREC) e grupo controle (CONT). O valor de p só foi descrito onde houve diferença estatística ($p < 0,05$).

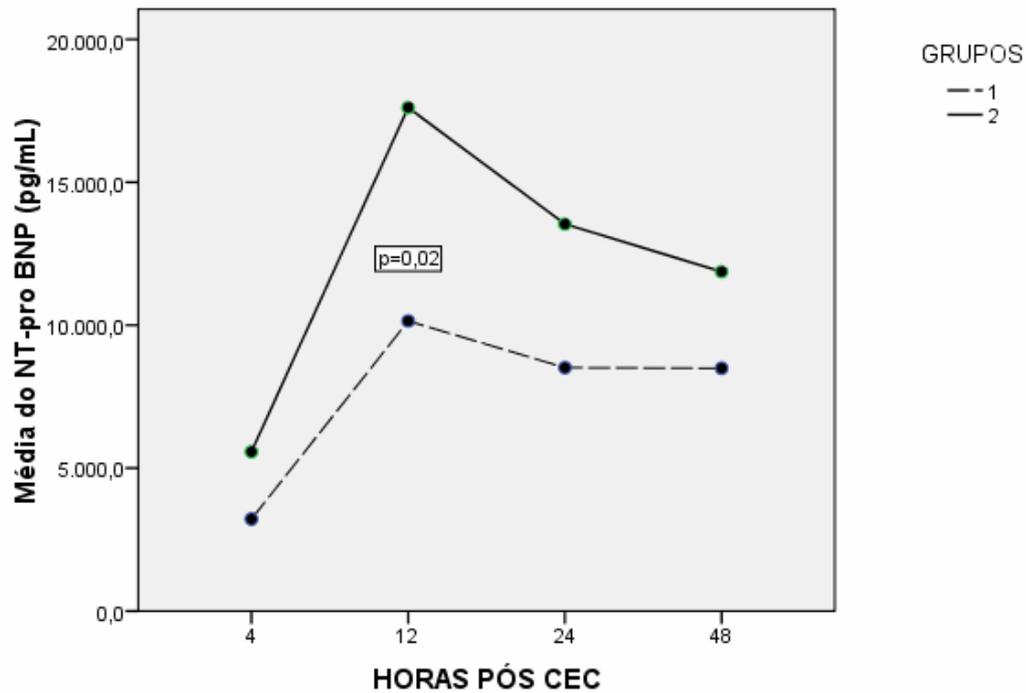


Figura 21 - Comparação entre as áreas sob a curva do NT-pro BNP entre os grupos

Legenda: Gráfico de linha com as médias das concentrações séricas do NT-pro BNP, permitindo comparar as áreas sob a curva do grupo pré-condicionado (1) com a do grupo controle (2). Houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,02$).

O ecocardiograma foi feito em todos os pacientes entre o terceiro e o décimo terceiro dia após a cirurgia (média 6 ± 3 dias), e não pode ser usado para correlação com nenhuma das variáveis que foram colhidas até 48 horas do pós-operatório. Não houve diferença entre a fração de ejeção entre os grupos (figura 22), mesmo quando se comparava em pacientes com valores acima e abaixo de 55%, sendo que só um paciente apresentou fração de ejeção menor que 50% pelo método de Teichholz, no grupo controle, mas este paciente já vinha com uma função diminuída no pré-operatório. O cirurgião não descreveu em nenhum dos casos área de infarto ou isquemia visível durante a cirurgia.

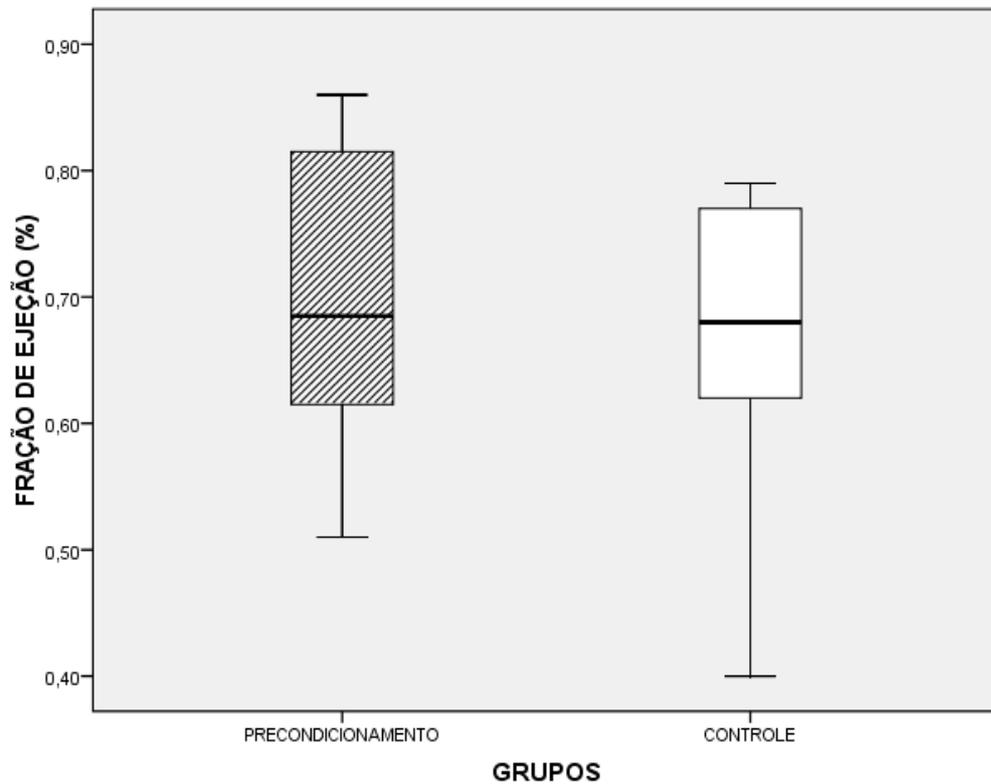


Figura 22 - Comparação entre a fração de ejeção nos dois grupos

Também nenhum dos eletrocardiogramas feitos de rotina no primeiro dia do pós-operatório apresentou lesão compatível com isquemia ou necrose de miocárdio, consideradas alterações do seguimento ST e onda T, assim como onda Q profunda.

5.6 Avaliação da morbi-mortalidade intra-hospitalar

As crianças foram seguidas durante a internação até a alta hospitalar para analisar os desfechos dos casos. Nos pacientes seguidos não houve nenhum óbito até a saída do hospital.

O tempo médio de internação hospitalar foi de $12,2 \pm 8,7$ dias para as crianças do estudo, mas não houve diferença quando se comparavam os dois grupos.

O tempo geral de internação no CTIP foi de $6,7 \pm 6,2$ dias e o de ventilação mecânica foi de $1,9 \pm 1,9$ dias. Outra vez, estes tempos foram semelhantes quando se comparavam os grupos separadamente.

O escore de disfunção de múltiplos órgãos PELOD diário foi avaliado e se mostrou semelhante entre os grupos. Todos estes dados estão expostos na tabela 21.

Tabela 21: Comparação entre variáveis de morbi-mortalidade entre os dois grupos

	GRUPO 1 (PCIr)	GRUPO 2 (Controle)	Valor de p
Tempo de Hospitalização (dias)	13 ± 10	11 ± 6	0,86
Tempo de CTIP (dias)	7 ± 7	6,5 ± 6	0,76
Tempo de Ventilação (dias)	2 ± 2	1,7 ± 1,2	0,66
Infecções Hospitalares (nº)	6	3	0,41
Arritmias	4	3	1,00
Óbitos até a alta hospitalar	0	0	1,00
Escore PELOD em 24 horas (média do maior valor)	9,2 ± 7	11,7 ± 7	0,16
Escore PELOD no segundo dia (média do maior valor)	2,5 ± 4,5	0,1 ± 0,3	0,30

Legenda: valores apresentados em número absoluto de eventos ou média e desvio-padrão

6 DISCUSSÃO

Este trabalho é o primeiro estudo clínico em humanos na linha de avaliação do PCIr que explora o efeito do pré-condicionamento exclusivamente na segunda janela, também chamado de efeito tardio, que ocorre quando o estímulo é aplicado cerca de 24 horas antes do evento isquêmico (SAXENA et al., 2009). Até o momento da conclusão do trabalho, só existiam na literatura três estudos prévios em que o evento isquêmico secundário é constituído pela cirurgia cardíaca com uso de CEC, e em todos, o PCIr foi realizado promovendo a isquemia de membro com manguito de pressão, imediatamente antes da cirurgia, com os pacientes já anestesiados (CHEUNG et al., 2006; HAUSENLOY et al., 2007; VENUGOPAL et al., 2009).

O nosso estudo confirmou, mais uma vez, que o PCIr com uso do manguito de pressão é inócuo para o membro do paciente que recebe o procedimento. Neste estudo, acrescentamos a informação de que é possível, na prática, a execução da técnica em lactentes, em grande parte, sem sedação (em menos de 1% dos casos esta foi usada).

Devido à aleatorização dos pacientes foi possível obter uma amostra mais homogênea em relação às variáveis clínicas, principalmente idade e área de superfície corpórea que são importantes na resposta do paciente à CEC, o que não foi alcançado no único estudo prévio com crianças (CHEUNG et al., 2006).

Avaliando os dados relativos à hemodinâmica do paciente, encontramos um aumento significativo da frequência cardíaca no grupo PCIr com 48 horas (ao se comparar com o valor encontrado com 12 horas após a saída de CEC). Este aumento pode ser um indicador de efeito benéfico do PCIr, visto que em lactentes o débito cardíaco é diretamente dependente da frequência cardíaca. Por outro lado, a variação da frequência cardíaca é também dependente de outros fatores, como o uso de inotrópicos, a concentração de hemoglobina, o estado da volemia do paciente, a presença de choque, dor ou ansiedade e uso de sedativos e curarizantes. Porém, nem todos estes fatores de confusão foram explorados e, portanto, não é possível afirmar que haja relação direta entre o PCIr e a alteração encontrada.

A avaliação do uso de drogas vasoativas feita por meio do escore inotrópico mostrou uma queda significativa na análise temporal apenas no grupo controle a partir de 24 horas pós-CEC). Isto poderia ser entendido como uma melhora hemodinâmica neste grupo específico. No único estudo de avaliação do escore inotrópico como marcador prognóstico em crianças pós cirurgia cardíaca (GAIES et al., 2010) foi encontrado que o valor máximo do escore nas primeiras 48 horas e não o estudo separado destes índices é que apresenta relação com a morbidade (duração da ventilação mecânica e da internação na UTI) e a mortalidade. E neste caso, usando este critério, não encontramos diferença entre os grupos.

Outro fator que corrobora o efeito benéfico do PCIr é o fato de termos encontrado uma menor frequência respiratória neste grupo em comparação ao grupo controle com 48 horas após a CEC. Este achado pode indicar uma menor disfunção pulmonar como já havia sido demonstrado em trabalhos anteriores (CHEUNG et al., 2006). Além disso, em nosso estudo, houve uma queda na frequência respiratória encontrada no grupo PCIr com o tempo, o que valida ainda mais este achado, inclusive porque esperaríamos um aumento da frequência respiratória com o tempo, visto que geralmente no primeiro dia a criança permanece intubada e sedada. Por outro lado, a relação PaO_2/FiO_2 , que é um índice que reflete a função de oxigenação dos pulmões, foi semelhante em ambos os grupos em todos os tempos estudados.

A diurese que é um importante marcador de perfusão renal adequada se mostrou semelhante nos dois grupos. Houve um aumento da diurese 48 horas pós-CEC em comparação com a diurese aferida com 24 horas, apenas no grupo PCIr. Esse dado poderia sugerir um efeito benéfico do PCIr, mas ao analisarmos os valores numéricos, percebemos uma menor diurese no tempo de 24 horas que em outros períodos. Portanto, o aumento significativo da diurese 48 horas após a saída de CEC em relação ao tempo 24 horas pode apenas refletir a queda da mesma 24 horas pós-CEC, já que não houve diferença significativa entre os valores em 48 horas em relação aos tempos de 4 e 12 horas. Na verdade, no pós-operatório de cirurgia cardíaca com CEC, após o período inicial de 2 a 4 horas em que o paciente apresenta frequentemente diurese aumentada (devido à administração de volume no intra-operatório e diurese osmótica por hiperglicemia ou uso de manitol durante a CEC), usualmente ocorre diminuição da diurese por até 48 horas, devido ao aumento da liberação do hormônio antidiurético. Em nosso estudo, o aumento da

diurese 48 horas após a saída de CEC no grupo PCIr poderia também estar associado ao uso de diuréticos: porém, este dado não foi avaliado.

Além da mensuração do débito urinário, que se manteve acima de 1 mL/kg/h em todos os tempos de estudo, em ambos os grupos, a avaliação da função renal foi feita pela medida das concentrações séricas de uréia e creatinina. Não houve diferença nas concentrações de uréia e de creatinina na comparação entre os grupos ou na análise temporal. Ressalta-se que as concentrações de creatinina, que melhor refletem a função renal em comparação com a uréia (cujas concentrações podem ser influenciadas por outros fatores, como o hipercatabolismo) permaneceram dentro da faixa de variação normal para a idade (SCHWARTZ et al., 1976) em todas as crianças do estudo. Portanto, não houve critérios para insuficiência renal na população estudada por nenhum dos critérios atualmente utilizados (AKCAN-ARIKAN et al., 2007; BELLOMO et al., 2004).

No presente estudo, foi quantificada também a concentração sérica do lactato, que é um marcador importante de metabolismo anaeróbico (hipóxia tissular prolongada) e tem relação com prognóstico em cirurgia cardíaca. Não houve diferença na concentração sérica de lactato entre os dois grupos em todos os tempos estudados. No pós-operatório de cirurgia cardíaca pediátrica com uso de CEC, além de ser um marcador de baixa perfusão tecidual, o lactato pode ser considerado um marcador prognóstico de mortalidade e do tempo de ventilação mecânica (KALYANARAMAN et al., 2008). Entretanto, seu valor isolado ou de pico tem baixa correlação com o prognóstico, mas sim o tempo em que o lactato permanece elevado (concentrações > 2 mmol/L por tempo maior que 48 horas tem forte correlação com mortalidade; $p=0,03$). Na nossa população, o lactato se mostrou elevado com 4 horas pós-CEC, mas na análise temporal houve uma queda para valores abaixo de 2 mmol/L rapidamente, de maneira semelhante nos dois grupos.

Encontramos uma menor saturação venosa de oxigênio em dois momentos no grupo PCIr, quando comparamos os dois grupos. Além disso, houve uma queda estatisticamente significativa na extração de oxigênio com a análise temporal apenas no grupo controle. Estes dados falam a favor de um melhor desempenho hemodinâmico no grupo controle, o que não estava sendo esperado na análise dos dados. Portanto, faremos uma discussão mais aprofundada sobre estes parâmetros.

A avaliação do débito cardíaco baseada apenas em parâmetros clínicos tem se mostrado falha. Desta forma, outros parâmetros invasivos que ajudem na identificação dos pacientes com baixo débito vêm sendo utilizados. Por meio de fórmulas matemáticas, sabe-se que existe uma relação entre o débito cardíaco e a saturação venosa mista de oxigênio (medida na artéria pulmonar, onde se misturam os fluxos de sangue vindos da veia cava superior, da veia cava inferior e do seio coronariano). Uma baixa saturação venosa mista de oxigênio teria uma boa correlação com baixo débito cardíaco. Como esta saturação venosa **mista** é de difícil obtenção devido à necessidade de cateter implantado na artéria pulmonar para este fim, pode ser utilizada para avaliação indireta da saturação venosa mista a saturação venosa **central** de oxigênio, geralmente obtida por coleta de sangue de cateter posicionado na desembocadura da veia cava superior no átrio direito (MARX; REINHART, 2006).

Esta medida pode ser feita por coleta intermitente, como no nosso estudo ou pode ser feita a aferição contínua em tempo real por meio de um sensor posicionado em acesso venoso central para este fim. Isto é bastante válido para o choque séptico, já tendo sido bem documentado em adultos e animais onde as variáveis que interferem na confiabilidade desta mensuração são mais constantes. Mas não existem muitos estudos validando estes dados em crianças, quanto menos no pós-operatório de cirurgia cardíaca (MARTIN; SHEKERDEMIAN, 2009).

Neste íterim, alguns questionamentos são levantados relativos à aceitação da saturação venosa central como indicador de baixo débito cardíaco no pós-operatório de crianças com uso de CEC: a) esta aferição só tem valor se as concentrações de hemoglobina permanecerem constantes no pós-operatório, o que nem sempre ocorre, devido às constantes perdas por drenos, sangramentos internos e hemodiluições por infusões de volume usadas para tratamento do choque; b) outra prerrogativa necessária é de que o consumo de oxigênio permaneça constante, o que não é verdade visto que o consumo é variável, dependendo do uso de inotrópicos, sedativos, variação da temperatura e da manipulação da criança no período pós-operatório; c) a correlação entre a saturação venosa mista e o débito cardíaco não é linear, mesmo considerando uma saturação arterial de oxigênio constante; d) em circunstâncias em que a concentração de oxigênio é mais baixa, como no comprometimento pulmonar e na presença de shunts residuais deve-se levar em conta esta redução em detrimento da avaliação isolada da saturação

venosa mista (MARTIN; SHEKERDEMIAN, 2009); e) a saturação venosa central não tem boa correlação com a saturação venosa mista no paciente com choque cardiogênico, devido as flutuações constantes do balanço regional e local de oxigênio (YAZIGI, 2008); f) a aceitação dos valores para análise depende de um posicionamento ideal de cateteres que não devem estar inseridos dentro do átrio direito, que também recebe o sangue do seio coronariano e este controle radiológico a cada coleta não foi realizado; g) as coletas geralmente foram feitas pela enfermagem sem um controle adequado da possibilidade de diluição das amostras, vistos que o cateter também era usado para infusão de diversas drogas; h) no quadro de choque, a saturação na cava superior supera a saturação venosa mista em até 5 a 18%; i) em cardiopatias congênitas univentriculares a verdadeira saturação venosa mista é mascarada pela mistura do sangue sistêmico com o pulmonar em nível atrial; a interpretação também deve ser feita com cautela, podendo as baixas saturações indicar tanto uma baixo débito, como redistribuição do fluxo com aumento do fluxo pulmonar em detrimento do fluxo sistêmico (MARTIN; SHEKERDEMIAN, 2009); j) os estudos tem demonstrado que a aferição contínua da saturação por meio de sensores apresentam um real benefício no manejo do paciente, analisando tendências em detrimento da avaliação isolada de valores num determinado momento (MARX; REINHART, 2006). Devido a todos estes fatores protocolados entendemos que este achado não invalida outros marcadores mais relevantes de real benefício do PCIr.

Ainda, a significância estatística nem sempre equivale à significância clínica. E neste contexto, sabemos que o aumento da extração de oxigênio faz parte da compensação natural do choque. A respiração anaeróbica só se inicia quando a saturação cai a valores inferiores a 50% (MARX; REINHART, 2006), e utilizando este parâmetro para comparação, percebemos apenas duas medidas em cada grupo abaixo deste valor, de forma que o comportamento em relação a choque descompensado foi semelhante entre os dois grupos.

Em relação aos glóbulos brancos e plaquetas, não houve diferença ao se comparar suas contagens nos dois grupos. A contagem de glóbulos brancos apresentou um comportamento semelhante, com um aumento semelhante nos dois grupos ao longo do tempo. A contagem de plaquetas também apresentou o mesmo comportamento, mas houve uma diferença significativa apenas no grupo PCIr ao se comparar o período de 4 horas com os tempos restantes. Isto aconteceu porque com

4 horas o grupo PCIr apresentou uma contagem de plaquetas menor, sendo que trombocitopenia (contagem de plaquetas $< 100.000 \text{ UI/mm}^3$) aconteceu em quatro pacientes no grupo PCIr com 4 horas e em dois no grupo controle. Os fatores de confusão que envolvem a queda na contagem de plaquetas não puderam ser excluídos em nosso estudo, como a técnica de coleta, sem a formação de trombos e o uso de medicações ou condições que induzem a trombocitopenia como uso de heparina ou milrinona e o grau de hipotermia (RANUTTI et al., 2009).

A avaliação da função respiratória nos dois grupos foi semelhante com os parâmetros que utilizamos. Talvez uma avaliação mais precisa pudesse oferecer resultados diferentes, como aconteceu no estudo de Cheung et al., onde foi feito o cálculo da resistência e complacência pulmonares (CHEUNG et al., 2006).

A avaliação da resposta inflamatória foi realizada utilizando-se a concentração sérica da IL-8 e IL-10. Não foi encontrada diferença na comparação entre os dois grupos em relação a estas variáveis. Os valores encontrados em nosso estudo, principalmente da IL-8 são inferiores aos encontrados em estudos anteriores em crianças pós-CEC sem o uso de corticosteróides (CHEUNG et al., 2006; CARMONA et al., 2008). O que pode justificar esta diferença foi o uso de metilprednisolona em altas doses no presente estudo (30 mg/kg na indução anestésica), o que é concordante com outros estudos que avaliaram a função inflamatória em CEC com uso de corticosteróides (WEIS et al., 2009; LIAKOPOULOS et al., 2007).

Quantificamos a expressão do gene I κ B- α por PCR em tempo real, que em estudos anteriores mostrava uma boa correlação com a ativação do NF- κ B (BOTTERO et al, 2003). Não houve diferença entre os grupos. Esperava-se que no grupo PCIr a expressão estivesse alterada, visto que a fisiologia do PCIr inclui a modulação da ativação do NF- κ B e redução da atividade inflamatória.

Entretanto, ao avaliarmos as quantificações *in vivo*, percebemos que a relação entre estes é bem complexa e a simplificação da relação direta entre um e outro não deve ser aplicada desta forma. Uma limitação desta avaliação é que a quantificação do I κ B- α não necessariamente reflete a ativação do NF- κ B, visto que não basta apenas a degradação do I κ B- α para que haja a ativação do NF- κ B. Uma etapa posterior que consiste na fosforilação do NF- κ B liberado, é essencial neste processo, pois esta porção fosforilada do NF- κ B é capaz de promover amplificação da atividade de transcrição gênica (KARIN; BEN-NERIAH, 2000). Por isso, em outro momento do nosso estudo iremos mensurar por meio da técnica de Western-

Blotting, tanto as quantidades relativas de I κ B- α fosforilado sobre o I κ B- α total, assim como do NF- κ B fosforilado e total, normalizando para a quantidade de uma proteína constitucional (beta-actina).

Outra controvérsia que aumenta a complexidade da interdependência entre os dois parâmetros em estudo é que tanto a redução do I κ B- α (por diminuição da sua degradação com proteólise do complexo I κ B- α + NF- κ B inativado) quanto sua hiperexpressão (por meio de um mecanismo de feed-back negativo) podem diminuir a atividade do NF- κ B, gerando efeitos benéficos.

São exemplos, estudos que têm demonstrado que uma redução ponderada (e não a abolição) da ativação do NF- κ B tem efeito benéfico na função miocárdica (DUFFY et al., 2009; XIYUAN et al., 2009). Ainda outros estudos mostrando que a hiperexpressão do I κ B- α também diminui a atividade do NF- κ B e exerce efeito benéfico sobre a função miocárdica (HAUDEK et al., 2001; SHAMES et al., 1998).

Portanto, a ativação do NF- κ B pode ter um papel deletério ou de proteção, dependendo de quanto e quando ocorre esta ativação. Estudos mais aprofundados na fisiopatologia do processo ainda são necessários antes de interpretações clínicas definitivas.

Com relação à avaliação do comprometimento miocárdico, encontramos uma redução ao longo do tempo nas concentrações séricas de cTnI, sem diferenças significativas nas comparações entre os grupos de estudo. Como se trata de um marcador bem validado de lesão e isquemia miocárdica como exposto anteriormente na revisão bibliográfica, concluímos que não houve lesão miocárdica substancial em nenhum dos grupos estudados, o que se confirma pela avaliação subjetiva visual do cirurgião no momento operatório e pelos eletrocardiogramas que não se encontravam alterados após a cirurgia. Apesar de não haver diferença estatística os níveis séricos se mantiveram em média um pouco mais elevados no grupo em que se realizou o PCIr em todos os tempos do estudo, o que difere de outros estudos realizados também com crianças (CHEUNG et al., 2006; WENWU et al., 2010).

Como a lesão miocárdica é um evento tardio dentro do processo de comprometimento do órgão, torna-se importante a avaliação da função do miocárdio que pode estar prejudicada, mesmo sem o processo de isquemia instalado. Utilizamos para isso a quantificação dos níveis séricos do NT-pro BNP, que se eleva devido ao estiramento da parede ventricular, apresentando boa correlação com a função ventricular (CANTINOTTI, 2008). Comparando o grupo PCIr com o grupo

controle encontramos uma diferença estatisticamente significativa com 12 e 24 horas, favorecendo o grupo PCIr, que apresentou os menores valores do hormônio. Isto se confirma ao avaliar a liberação total do NT-pro BNP nas 48 horas por meio da comparação da área sob a curva nos dois grupos. Uma ferramenta que poderia ter ajudado na confirmação desta disfunção seria a avaliação ecocardiográfica do paciente nos diferentes tempos, mas devido a dificuldades para a realização do exame por problemas logísticos do hospital onde se realizou o estudo, o ecocardiograma só foi realizado após o terceiro dia em todos os pacientes, não permitindo comparação nenhuma das variáveis nas primeiras 48 horas.

Na análise temporal, percebemos que os valores do hormônio não aumentam imediatamente após saída de CEC, apresentando aumento progressivo com pico 12 horas pós-CEC, o que já foi relatado em estudo prévio (WALSH et al., 2008), e que coincide com o nadir do débito cardíaco no pós-operatório (WERNOVSKY et al., 1995). Quando comparamos os valores de pico da liberação do NT-pro BNP, percebemos que houve maior liberação no grupo controle ($p=0,02$). Este achado se torna importante porque no estudo de Walsh et al., houve correlação entre os valores de pico de liberação do NT-pro BNP com a intensidade dos cuidados pós-operatórios, ou seja, ele possui valor prognóstico em termos de morbidade precoce.

Em relação aos desfechos, não houve nenhum óbito até o dia da alta hospitalar em ambos os grupos. O achado não surpreende visto que o óbito é um evento raro e exige um número grande de pacientes para conclusões a respeito de mortalidade. Além disso, selecionamos pacientes estáveis em enfermaria no pré-operatório e excluímos pacientes neonatais e internados previamente na UTI, que são os com maior risco de mortalidade. Da mesma forma, a avaliação do tempo de internação, de ventilação mecânica ou escore de disfunção de múltiplos órgãos foi bem semelhante entre os grupos. Um dos fatores que diminuem ou impedem a ação do PCIr é o tempo em que o órgão é submetido ao insulto isquêmico definitivo. No primeiro artigo publicado sobre o tema, Murry et al. já atentavam para a atenuação do efeito do PCI após 3 horas de isquemia do órgão a ser protegido (MURRY et al., 1986). Portanto o longo tempo de isquemia promovido pela cirurgia cardíaca e o uso da CEC podem ser fatores limitantes da ação efetiva do PCIr.

Nosso trabalho vem acrescentar a uma série de estudos sobre o PCIr seu potencial como mecanismo de proteção contra a disfunção miocárdica no pós-operatório de cirurgia cardíaca em crianças. O PCIr resultou em menor liberação de

NT-pro BNP, mas aqui cabe uma última discussão sobre o significado clínico destes achados. Outros autores também encontraram alteração em marcadores bioquímicos de disfunção de órgãos, mas não houve correlação entre estes achados e a evolução clínica e os marcadores de morbi-mortalidade. Para que o procedimento venha fazer parte da prática diária, como mais uma ferramenta efetiva de proteção miocárdica, deve-se provar que além das modificações a nível bioquímico, existem também benefícios na função cardíaca, lesão miocárdica, baixo débito e recuperação do órgão após a cirurgia. (RAHMAN; BONSER, 2009). Grandes estudos multicêntricos com poder para analisar variáveis clínicas relevantes são necessários para definição do seu real valor (KHARBANDA; NIELSEN; REDINGTON, 2009). Portanto, no ponto em que estamos atualmente, ainda não se justifica a aplicação do PCIr na prática diária, mas aponta para um caminho a ser trilhado, inspirando novas investigações de procedimentos e fármacos que amenizem a resposta inflamatória promovida pela CEC e suas consequências nos órgãos-alvo no pós-operatório de cirurgia cardíaca em crianças.

7 CONCLUSÃO

O estudo mostra que o PCIr é um procedimento inócuo. Os pacientes que receberam o PCIr antes da cirurgia cardíaca com uso de CEC apresentaram menor liberação do hormônio NT-pro BNP, que indica uma menor disfunção celular cardíaca, e um papel protetor do comprometimento miocárdico. Não houve diferença em relação a outros eventos e morte.

8 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Foram consideradas limitações do estudo: a) não coletamos sangue dos participantes no período pré-operatório para comparação posterior, por considerar que as quantificações estariam próximas ao valor normal para idade, como foi mostrado no estudo feito anteriormente na instituição (CARMONA et al, 2006); b) o número de pacientes envolvidos não tem poder para avaliar variáveis de importância clínica como mortalidade; c) não foram discriminadas doses de agentes anestésicos inalatórios halogenados, como sevoflurano ou isoflurano que vêm sendo estudados como agentes capazes de promover o pré-condicionamento farmacológico (LANDONI et al., 2009); d) todos os pacientes receberam corticosteróides em altas doses no período pré-operatório, o que dificulta a análise dos dados relativos à resposta inflamatória pós-CEC.

REFERÊNCIAS

Akcan-Arikan A. et al. Modified RIFLE criteria in critically ill children with acute kidney injury. *Kidney Int* 2007(71):1028-35.

Ammann P, Fehr T, Minder EI, Gunter C, Bertel O. Elevation of troponin I in sepsis and septic shock. *Intensive Care Med* 2001, Jun;27(6):965-9.

Azzazy HM, Christenson RH. B-type natriuretic peptide: physiologic role and assay characteristics. *Heart Failure Reviews* 2003, Oct;8(4):315-20.

Bellomo R et al. Acute renal failure – definition, outcome measure, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. *Critical Care* 2004;8:R204-12.

Bottero V, Imbert V, Frelin C, Formento JL, Peyron JF. Monitoring NF-kappa B transactivation potential via real-time PCR quantification of I kappa B-alpha gene expression. *Mol Diagn* 2003; 7(3-4):187-194.

Bottio T, Vida V, Padalino M, Gerosa G, Stelling G. Early and long-term prognostic value of Troponin-I after cardiac surgery in newborns and children. *Eur J Cardiothorac Surg* 2006; 30(2):250-5.

Braunwald E, Kloner RA. Myocardial Reperfusion: A double-edged sword? *J. Clin. Invest.* 1985;76:1713-1719.

Brix-Christensen V. The systemic inflammatory response after cardiac surgery with cardiopulmonary bypass in children. *Acta Anaesthesiol Scand* 2001;45:671-679

Brown JM. Use of echocardiography for hemodynamic monitoring. *Crit Care Med* 2002, Jun;30(6):1361-4.

Burrows FA et al. Influence of operations with cardiopulmonary bypass on polymorphonuclear leucocyte function in infants. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1987;93:253-260

Cantinotti M et al. Clinical relevance of measurement of brain natriuretic peptide and N-terminal pro-brain natriuretic peptide in pediatric cardiology. *Clinica Chimica Acta* 2008;390:12-22.

Carmona F, Manso PH, Vicente WVA, Castro M, Carlotti APC. Risk stratification in neonates and infants submitted to cardiac surgery with cardiopulmonary bypass: a multimarker

approach combining inflammatory mediators, N-terminal pro-B-type natriuretic and troponin I. *Cytokine* 2008;42:317-24.

Carlotti APCP. Manual de Rotinas de Terapia Intensiva Pediátrica. 1ª Edição. São Paulo:Tecmedd, 2005.

Cassatela MA, Meda L, Bonora S, Ceska M, Constantin G. Interleukin-10 inhibits the release of proinflammatory cytokines from human polymorphonuclear leukocytes: evidence for an autocrine role of tumor necrosis factor and IL-1 in mediating the production of IL-8 triggered by lipopolysaccharide. *J Exp Med* 1993;178:2207-11.

Castillo JR, Zagler A, Carrilo-Jimenez R, Hennekens CH. Brain natriuretic peptide: a potential marker for mortality in septic shock. *Int J Infect Dis* 2004, Sep;8(5):271-4.

Cheung MMH. et al. Randomized Controlled Trial of the Effects of Remote Ischemic Preconditioning on Children Undergoing Cardiac Surgery. First Clinical Application in Humans. *J Am Coll Cardiol* 2006;47:2277-82.

Collinson PO, Gaze DC. Biomarkers of cardiovascular damage and dysfunction – an overview. *Heart, Lung and Circulation* 2007,16:S71-S82.

Costelo JM, Backer CL, Checchia PA, Mavroudis C, Seipelt RG, Goodman DM. Effect of cardiopulmonary bypass and surgical intervention on the natriuretic hormone system in children. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005;130:822-9.

Dehoux M, Provenchere S, Benessiano J, Lasocki S, Lecharny JB, Bronchard R, Dilly MP, Phillip I. Utility of cardiac troponin measurement after cardiac surgery. *Clin Chim Acta* 2001;311:41-4.

Duffy YD, McLean KM, Lyons JM, Czaikowski AJ, Wagner CJ, Pearl JM. Modulation of nuclear factor-kappaB improves cardiac dysfunction associated with cardiopulmonary bypass and deep hypothermic circulatory arrest. *Crit Care Med* 2009;37(2):577-83.

Finn A, Naik S, Klein N. Interleukin-8 release and neutrophil degranulation after pediatric cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993;105:234-241.

Fonarow GC, Horwich TB. Combining natriuretic peptides and necrosis markers in determining prognosis in heart failure. *Reviews in Cardiovascular Med* 2003;4(Suppl 4):S20-8.

Gaies MG et al. Vasoactive-inotrope score as a predictor of morbidity and mortality in infants after cardiopulmonary bypass. *Pediatr Crit Care Med* 2010; 11(2). No prelo.

Gessler P, et al. Prognostic value of plasma N-terminal pro-BNP in children with congenital heart defects and open-heart surgery. *J Pediatr* 2006;148:372-6.

Gho BC, Schoemaker RG, van den Doel MA, Dunker DJ, Verdouw PD. Myocardial protection by brief ischemia in noncardiac tissue. *Circulation* 1996;94(9):2193-2200.

Grosek S, Primožic J, Ihan A, Wraber B, Gabrigelcic T, Kosin M. Interlekin-10, T-lymphocytes and cardiac output in children after ventricular septal defect repair: a pilot study. *Intensive Care Med* 2006;32:780-4.

Haudek SB, Spencer E, Bryant DD, White DJ, Maass D, Horton JW, Zhijian JC, Giroir BP. Overexpression of cardiac I- κ B α prevents endotoxin-induced myocardial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001;280:962-8.

Hausenloy DJ, et al. Effect of remote ischaemic preconditioning on myocardial injury in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery: a randomized controlled trial. *Lancet* 2007;370:575-579.

Hirsh R, Dent CL, Wook MK, Hudleston CB, Mendeloff EN, Balzer DT, Landt Y, Parvin CA, Canter CE, Ladenson JH, Landt M. Patterns and potential value of cardiac troponin I elevations after pediatric cardiac operations. *Ann Thorac Surg* 1998;65(5):1394-9.

Horwich TB, Patel J, MacLellan WR, Fonarow GC. Cardiac troponin I is associated with impaired hemodynamics, progressive left ventricular dysfunction, and increased mortality rates in advanced heart failure. *Circulation* 2003, Aug;108(7):833-8.

Hövels-Gürich HH, Vazquez-Jimenez JF, Silvestri A, Schumacher K, Minkenberg R, Duchateau J, Messmer BJ, von Bernuth G, Seghaye MC. Production of proinflammatory cytokines and myocardial dysfunction after arterial switch operation in neonates with transposition of the great arteries. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002;124:811-20.

Immer FF et al. Troponin I for prediction of early postoperative course after pediatric cardiac surgery. *JACC*;33(6):1719-23.

Jenkins KJ. Risk adjustment for congenital heart surgery: the RACHS-1 method. *Semin Thorac Cardiovasc Surg Pediatr Card Surg Annu* 2004;7:180-4.

Kalyanaraman M et al. Serial blood lactate levels as a predictor of mortality in children after cardiopulmonary bypass surgery. *Pediatr Crit Care Med* 2008, May;9(3):285-8.

Kaplan S. Biochemical markers of myocardial injury in children. *Circulation* 1997, Oct;96(8):2496-7.

Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: The Control of NF- κ B Activity. *Annu Rev Immunol* 2000;18:621-63.

Kawamura T, Wakusawa R, Okada K, Inada S. Elevation of cytokines during open heart surgery with cardiopulmonary bypass: Participation of interleukin 8 and 6 in reperfusion injury. *Can J Anaesth* 1993;40:1016-21.

Kharbanda RK, Mortensen UM, White PA, Kristiansen SB, Schmidt MR, Hoschitzky JA, Vogel M, Sorensen K, Redington AN, MacAllister R. Transient limb ischemia induces remote ischemic preconditioning in vivo. *J American Heart Association* 2002;106:2881-2883.

Kharbanda RK, Nielsen TT, Redington AN. Translation of remote ischemic preconditioning into clinical practice. *The Lancet* 2009;374:1557-65.

Kloner RA, Shook T, Antman EM, Cannon CP, Przyklenk K, Yoo K, McCabe CH, Braunwald E. A prospective temporal analysis of the onset of preinfarction angina versus outcome: a prospective ancillary study in TIMI-9B. *Circulation* 1998; 97(11):1042-5.

Kloner RA. Clinical application of remote ischemic preconditioning. *Circulation* 2009;119:776-8.

Koch A, Zink S, Singer H. B-type natriuretic peptide in pediatric patients with congenital heart diseases. *European Heart Journal* 2006;27:861-6.

Konstantinov IE, Arab S, Kharbanda RK, Li Jia, Cheung MMH, Cherepanov V, Downey GP, Liu PP, Cukerman E, Coles JG, Redington AN. The remote ischemic preconditioning stimulus modifies inflammatory gene expression in humans. *Physiol Genomics* 2004;19:143-150.

Landoni G. et al. Halogenated anaesthetics and cardiac protection in cardiac in non-cardiac anaesthesia. *Annals of Cardiac Anaesthesia* 2009;12(1):4-9.

Leteurtre S, Martinot A, Duhamel A, Proulx F, Grandbantien B, Cotting J, Gottesman R, Joffie A, Pfenninger J, Hubert P, Lacroix J, Leclecr F. Validation of the paediatric logistic organ dysfunction (PELOD) score: prospective, observational, multicentre study. *Lancet* 2003;362:192-7.

Liokopoulos OJ et al. Cardiopulmonary and systemic effects of methylprednisolone in patients undergoing cardiac surgery. *Ann Thorac Surg* 2007;84:110-9.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta CT) Method. *Methods* 2001, Dec;25(4):402-8.

Marx G, Reinhart K. Venous oximetry. *Curr Opin Crit Care* 12:263-268.

Martin J, Shekerdemian LS. The monitoring of venous saturations of oxygen in children with congenitally malformed hearts. *Cardiol Young* 2009; 19(1):34-39.

McCullough PA, Fonorow GC. B-type natriuretic peptide and multimarker approaches in cardiovascular medicine. *Reviews in Cardiovascular Medicine* 2003;4:S1-2.

McCullough PA, Kuncheria J, Mathur VS. Diagnostic and therapeutic utility of B-type natriuretic peptide in patients with renal insufficiency and decompensated heart failure. *Reviews in Cardiovascular Medicine* 2004;5(1):16-25.

Mehta NJ, Khan IA, Gupta V, Jani K, Gowda RM, Smith PR. Cardiac troponin I predicts myocardial dysfunction and adverse outcome in septic shock. *International Journal of Cardiology* 2004, May;95(1):13-7.

Mildh LH, Pettilä V, Sairanem HI, Rautianinen PH. Cardiac troponin T levels for risk stratification in pediatric open heart surgery. *Ann Thorac Surg* 2006;82(5):1643-8.

Modi P. et al. Pathology related Troponin I release and clinical outcome after pediatric open heart surgery. *J Card Surg* 2003;18:295-300.

Morishita R, Sugimoto T, Aoki M, Kida I, Tomita N, Moriguchi A, Maeda K, Sawa Y, Kaneda Y, Higaki J, Ogihara T. In vivo transfection of cis element "decoy" against nuclear factor κ B binding site prevents myocardial infarction. *Nature Medicine* 1997, 3:894-899.

Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986; 74:1124-36.

Paparella D, Yau TM, Young E. Cardiopulmonary bypass induced inflammation: pathophysiology and treatment. An update. *Eur Jour Card Thorac Surg* 2002;21:234-244.

Paterson RL, Galley HF, Dhillon JK, Webster NR. Increased nuclear factor κ B activation in critically ill patients who die. *Crit Care Med* 2000;28(4):1047-50.

Parr GV, Blackstone EH, Kirklin JW. Cardiac performance and mortality early after intracardiac surgery in infants and young children. *Circulation* 1975 May;51(5):867-74.

Pitta GBB, et al. Oclusão Arterial Aguda. In *Angiologia e cirurgia vascular: guia ilustrado*. 2003. Disponível em URL: <http://www.lava.med.br/livro>. Acesso em 28 mai. 2008.

Pollack MM, Ruttimann UE, Getson PR. Pediatric Risk Index Score for Mortality (PRISM). *Crit Care Med* 1988;16(11):1110.

Przyklenk K, Bauer B, Ovize M, Kloner RA, Whittaker P. Regional Ischemic "Preconditioning" Protects Remote Virgin Myocardium From Subsequent Sustained Coronary Occlusion. *Circulation* 1993;87:893-899.

Przyklenk K. Lethal Myocardial "Reperfusion injury":the opinions of Good Men. *J Thrombosis and Thrombolysis* 1997;4:5-6.

Przyklenk K, Kloner RA. Ischemic preconditioning: exploring the paradox. *Progress in Cardiovascular Diseases* 1998;40(6):517-47.

Rahman I, Bonser RS. Remote ischemic preconditioning: the current best hope for improved myocardial protection in cardiac surgery? *Heart* 2009;95:1553-5.

Ranuti M et al. Hypothermic cardiopulmonary bypass as a determinant of late thrombocytopenia following cardiac operations in pediatric patients. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2009 Set;53(8):1060-7.

Saxena P. et al. Remote Ischemic Preconditioning: Evolution of concept, mechanisms and clinical application. *J Card Surg* 2009; Jun 22. No prelo.

Senftleben U, Karin M. The IKK/NF-kappa B pathway. *Crit Care Med* 2002, Jan;30(1-Suppl):S18-26.

Shames BD, Meldrum DR, Selzman CH, Pulido EJ, Cian BS, Banerjee A, Harken AH, Meng X. Increasead levels of myocardial I κ B- α protein promote tolerance to endotoxin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1998;275:1084-91.

Shimizu M. et al. Transient limb ischemia remotely preconditions through a humoral mechanism acting directly on the myocardium: evidence suggesting cross-species protection. *Clinical Science* 2009;117(5-6):191-200.

Schwartz GJ, Haycock GB, Spitzer A. Plasma creatinine and urea concentration in children: Normal values for age and sex. *J Pediatr* 1976(88):828-30.

Souza MHL, Elias DO. Resposta do organismo humano à circulação extracorporea. In *Fundamentos da Circulação Extracorpórea*. Centro Editorial Alfa – RJ. Segunda Edição, 2006.

Tapuria N, Kumar Y, Habib MM, Amara MA, Seifalian AM, Davidson BR. Remote Ischemic Preconditioning: a novel protective method from ischemia reperfusion injury – a review. *Journal of Surgical Research* 2008;150:304-330.

Taggart DP et al. Vulnerability of paediatric myocardium to cardiac surgery. *Heart* 1996;76:214-7.

Tarnok A, Hamsch J, Emmrich F, Sack U, van Son J, Belinghausen W, Borte M, Schneider P. Complement activation, cytokines, and adhesion molecules in children undergoing cardiac surgery with or without cardiopulmonary bypass. *Pediatr Cardiol* 1999;20:113-125.

Venugopal et al. Remote ischaemic preconditioning reduces myocardial injury in patients undergoing cardiac surgery with cold blood cardioplegia: a randomized controlled trial. *Heart* 2009;95(19):1553-5.

Vinten-Johansen J, Zhao ZQ, Zatta AJ, Kin H, Halkos ME, Kerendi F. Postconditioning A new link in nature's armor against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Basic Res Cardiol* 2005;100:295-310.

Walsh R. et al. N-terminal B-type natriuretic peptide levels in pediatric patients with congestive heart failure undergoing cardiac surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2008;135: 98-105.

Wan S, Yim APC. Cytokines in myocardial injury: impact on cardiac surgical approach. *Eur J Cardiothorac Surg* 1999;16:107-111.

Wan S, LeClerc JL, Vincent JL. Cytokines responses to cardiopulmonary bypass: lessons learned from cardiac transplantation. *Ann Thorac Surg* 1997;63:269-76.

Weis F. et al. Stress dose of hydrocortisone in high-risk patients undergoing cardiac surgery: effects on Interleukine-6 to Interleukine-10 ratio and early outcome. *Crit Care Med* 2009;37(5):1685-90.

Wenwu Z et al. Limb ischemic preconditioning reduces heart and lung injury after an open heart operation in infants. *Pediatr Cardiol* 2010;31:22-9.

Wernovsky G, Wypij D, Jonas RA, Mayer JE Jr, Hanley FL, Hickey PR, Walsh AZ, Chang AC, Castaneda AR, Newburger JW, et al. Postoperative course and hemodynamic profile after the arterial switch operation in neonates and infants. A comparison of low-flow cardiopulmonary bypass and circulation arrest. *Circulation* 1995;92(8):2226-35.

Whitthaut R, Busch C, Fraunberger P, Walli A, Seidel D, Pilz G, et al. Plasma atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide are increased in septic shock: impact of interleukin-6 and sepsis-associated left ventricular dysfunction. *Intensive Care Med* 2003, Oct;29(10):1696-702.

Xiyuan L. et al. Activation of NF- κ B is a critical element in the antiapoptotic of anesthetic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009;296:1296-1304.

Yazigi A et al. Comparison of central venous to mixed venous oxygen saturation in patients with low cardiac index and filling pressures after coronary artery surgery. *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia* 2008;22(1):77-83.

Yeh CH, Chen TP, Wu YC et al. Inhibition of NF κ B activation with curcumin attenuates plasma inflammatory cytokine surge and cardiomyocyte apoptosis following cardiac ischemia/reperfusion. *J Surg Res* 2005;125:109-116.

Zhang G, Ghosh S. Molecular mechanisms of NF- κ B activation induced by bacterial lipopolysaccharide through Toll-like receptors. *J Endotoxin Res* 2000;6(6):453-7.

APÊNDICES

Apêndice A – Termo de consentimento livre e esclarecido dos pacientes

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nome da Pesquisa: Avaliação do uso do pré-condicionamento isquêmico remoto no dia precedente à cirurgia em crianças submetidas a circulação extracorpórea
Pesquisador responsável:

Marcos Alves Pavione - médico pediatra, com formação em terapia intensiva pediátrica (UTI), estagiário da cardiologia infantil e mestrando

Prezado paciente,

O senhor(a), como responsável perante a lei pelo paciente menor de idade

está sendo convidado a participar de um estudo clínico que será feito pelo pesquisador acima, Dr. Marcos Alves Pavione.

Antes de decidir se quer participar, é importante que o senhor(a) entenda a razão deste estudo e os possíveis benefícios, riscos e desconfortos.

Por favor, leia atentamente todas as informações fornecidas. Por favor, faça perguntas ao seu médico se tiver qualquer dúvida.

QUAL O OBJETIVO DESTA ESTUDO?

Seu filho nasceu com um defeito no coração e vai necessitar de uma cirurgia para corrigir este defeito. Esta será uma cirurgia grande, em que o sangue do seu filho vai ficar passando por uma máquina para receber oxigênio enquanto o cirurgião opera o coração. Quando o sangue passa por essa máquina ele sofre uma inflamação, que pode diminuir a força dos batimentos do coração e aumentar as chances de complicações após a cirurgia.

Existem trabalhos de pesquisa mostrando que a diminuição da passagem de sangue por uma das pernas, durante alguns minutos, antes da cirurgia pode fazer com que o organismo fique mais preparado para enfrentar a cirurgia, aumentando as chances de recuperação mais rápida após a operação. O objetivo do nosso estudo é verificar se o procedimento de apertar uma das pernas da criança com um aparelho usado para medir pressão, durante alguns minutos, um dia antes da

cirurgia, pode ajudar a diminuir as chances de complicação e melhorar a recuperação no pós-operatório.

COMO VAI SER O ESTUDO?

Será feito um sorteio em dois grupos: caso seu filho(a) seja sorteado para o grupo 1, um dia antes da cirurgia ele(a) será levado até uma sala para ter a pressão medida e depois o aparelho de pressão vai ficar apertando a perna da criança por um tempo de 5 minutos, por quatro vezes seguidas. Entre um procedimento e outro haverá um período de 5 minutos de descanso. O senhor(a) poderá ficar na sala durante todo o tempo. Se for sorteado para o grupo 2, ele receberá os cuidados normais de rotina que são dados às crianças antes da cirurgia cardíaca, sem nenhum prejuízo.

QUAIS OS POSSÍVEIS DESCONFORTOS e RISCOS?

A criança poderá ficar nervosa ou chorar durante o procedimento e neste caso será dado um remédio para que ela possa se tranquilizar, pela boca ou até pela veia. Se for preciso pegar a veia, ela já servirá para receber soro e medicações durante a cirurgia.

Isto já foi feito antes em outro hospital no exterior e não trouxe nenhum problema para as pernas das crianças, mas existe uma chance de ocorrer um inchaço nas pernas ou pequenas manchinhas arroxeadas depois de apertar com o aparelho de pressão.

Se porventura, quaisquer danos ou complicações resultantes da participação do seu filho no estudo acontecerem, o mesmo receberá assistência integral e terá direito a indenização, seguindo as recomendações da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, nos seus itens IV.1 "I" e V.6.

Nos dois primeiros dias depois da cirurgia, será colhido cerca de 1,5 ml (pouco mais de um conta-gotas) de sangue da criança, junto com o sangue que se colhe de rotina depois da cirurgia. O sangue será colhido por meio de tubos, que normalmente são colocados em veias durante a cirurgia, com a criança já anestesiada. Portanto, seu (sua) filho (a) não sentirá dor durante a coleta destes exames.

PRECISO PARTICIPAR?

A participação do seu(sua) filho(a) no estudo não é obrigatória. Se decidir participar, o senhor deverá assinar este documento, chamado de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Se não for participar do estudo, é importante que saiba que isso não afetará em nada o atendimento prestado ao seu (sua) filho(a) que continuará recebendo o melhor tratamento que este hospital pode oferecer. Mas mesmo se decidir participar, poderá desistir a qualquer momento, sem prejuízo ao tratamento da criança.

QUAIS OS POSSÍVEIS BENEFÍCIOS?

A realização do procedimento pode ajudar a diminuir as complicações depois da cirurgia e também diminuir o tempo de internação na UTI. Além disso, no futuro, pode permitir que outras crianças também se beneficiem, melhorando a recuperação depois da cirurgia do coração.

HAVERÁ ALGUMA REMUNERAÇÃO?

NÃO será oferecida nenhuma remuneração em dinheiro para os participantes da pesquisa.

AS INFORMAÇÕES SERÃO CONFIDENCIAIS?

As informações colhidas sobre as condições de saúde do seu filho antes e depois da cirurgia serão arquivadas e utilizadas para fazer o estudo, mas em momento nenhum o nome da criança será divulgado.

O resultado deste estudo poderá ser publicado em revistas médicas nacionais ou internacionais. Reforço que a identidade do seu filho será sempre preservada.

Se o senhor(a) tiver alguma dúvida durante o estudo ou quiser sair do estudo a qualquer momento, poderá ligar diretamente para o pesquisador pelos telefones: 0xx16 8111 1595 ou 0xx16 3963 3244.

Eu, _____,
 () mãe () pai () responsável legal pelo menor

declaro que li e entendi toda a informação que me foi fornecida sobre a participação de minha criança no presente estudo e tive a oportunidade de discutir e tirar minhas dúvidas. Todas as minhas perguntas foram satisfatoriamente respondidas e concordo voluntariamente que meu (minha) filho(a) participe do estudo. Entendo que receberei uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Autorizo também a divulgação dos resultados do estudo em revistas médicas nacionais e/ou internacionais. Entendi que todas as informações serão colhidas e processadas de maneira confidencial.

 Assinatura do responsável legal

 Assinatura do pesquisador responsável

Ribeirão Preto, _____ de _____ de _____.

Apêndice B – Termo de consentimento livre e esclarecido dos controles normais

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nome da Pesquisa: Avaliação do uso do pré-condicionamento isquêmico remoto no dia precedente à cirurgia em crianças submetidas a circulação extracorpórea

Pesquisador responsável:

Marcos Alves Pavione - médico pediatra, com formação em terapia intensiva pediátrica (UTI), cardiologia infantil e mestrando

Prezado paciente,

O senhor(a), como responsável perante a lei pelo paciente menor de idade está

sendo convidado a participar de um estudo clínico que será feito pelo pesquisador acima, Dr. Marcos Alves Pavione.

Antes de decidir se quer participar, é importante que o senhor(a) entenda a razão deste estudo e os possíveis benefícios, riscos e desconfortos.

Por favor, leia atentamente todas as informações fornecidas. Por favor, faça perguntas ao seu médico se tiver qualquer dúvida.

DE QUE SE TRATA ESTE ESTUDO?

Crianças com defeito no coração e que foram operadas estão sendo estudadas. O objetivo do nosso estudo é verificar se o procedimento de apertar uma das pernas da criança com um aparelho usado para medir pressão, durante alguns minutos, um dia antes da cirurgia, pode ajudar a diminuir as chances de complicação e melhorar a recuperação no pós-operatório.

COMO MEU FILHO PODE COLABORAR?

O sangue das crianças estudadas sofre uma inflamação durante a cirurgia e precisaremos saber se a inflamação diminui com o novo procedimento. Precisamos também comparar com o sangue de crianças normais, ainda não operadas. Para isso seria colhido 1,5 ml de sangue (pouco mais que um conta-gotas) do seu filho para comparação.

QUAIS OS POSSÍVEIS DESCONFORTOS e RISCOS?

O sangue será colhido uma única vez juntamente com o aquele que é colhido na rotina do hospital, portanto, a criança não será picada só para a pesquisa.

Se porventura, quaisquer danos ou complicações resultantes da participação do seu filho no estudo acontecerem, o mesmo receberá assistência integral e terá direito a indenização, seguindo as recomendações da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, nos seus itens IV.1 "I" e V.6.

PRECISO PARTICIPAR?

A participação do seu(sua) filho(a) no estudo não é obrigatória. Se decidir participar, o senhor deverá assinar este documento, chamado de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Se não for participar do estudo, é importante que saiba que isso não afetará em nada o atendimento prestado ao seu (sua) filho(a) que continuará recebendo o melhor tratamento que este hospital pode oferecer. Mas mesmo se decidir participar, poderá desistir a qualquer momento, sem prejuízo ao tratamento da criança.

QUAIS OS POSSÍVEIS BENEFÍCIOS?

A realização do procedimento pode ajudar a diminuir as complicações depois da cirurgia e também diminuir o tempo de internação na UTI. Além disso, no futuro, pode permitir que outras crianças também se beneficiem, melhorando a recuperação depois da cirurgia do coração.

HAVERÁ ALGUMA REMUNERAÇÃO?

NÃO será oferecida nenhuma remuneração em dinheiro para os participantes da pesquisa.

AS INFORMAÇÕES SERÃO CONFIDENCIAIS?

As informações colhidas sobre as condições de saúde do seu filho antes e depois da cirurgia serão arquivadas e utilizadas para fazer o estudo, mas em momento nenhum o nome da criança será divulgado.

O resultado deste estudo poderá ser publicado em revistas médicas nacionais ou internacionais. Reforço que a identidade do seu filho será sempre preservada.

Se o senhor(a) tiver alguma dúvida durante o estudo ou quiser sair do estudo a qualquer momento, poderá ligar diretamente para o pesquisador pelos telefones: 0xx16 8111 1595 ou 0xx16 3963 3244.

Eu, _____, ()
mãe () pai () responsável legal pelo menor

declaro que li e entendi toda a informação que me foi fornecida sobre a participação de minha criança no presente estudo e tive a oportunidade de discutir e tirar minhas dúvidas. Todas as minhas perguntas foram satisfatoriamente respondidas e concordo voluntariamente que meu (minha) filho(a) participe do estudo. Entendo que receberei uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Autorizo também a divulgação dos resultados do estudo em revistas médicas nacionais e/ou internacionais. Entendi que todas as informações serão colhidas e processadas de maneira confidencial.

Assinatura do responsável legal

Assinatura do pesquisador responsável

Ribeirão Preto, _____ de _____ de _____.

Apêndice C – Ficha para coleta dos dados

FICHA PARA COLETA DOS DADOS

INICIAIS			REGISTRO		
SEXO		Masculino	ETNIA		Branco
		Feminino			Negro
DATA NASCIM		200 ____			Pardo
IDADE		M/D			Amarelo
PESO		KG	ESTATURA		CM
ASC		KG/M2			
SATURAÇÃO PRÉ		%	FIO2		%
DIAGNÓSTICO					
HISTÓRIA:					
RAIO-X PRÉ-OP:					
ECG:					
ECO:					
CAT:					

PRÉ-CONDICIONAMENTO				
HORA		INTERC		
DROGAS	HIDRATO 16%			
	MIDAZOLAN			
MÉDIA PAS		NÚMERO MANGUITO		
COMPLICAÇÃO				
CIRURGIA				
DATA	/	/ 200	SAIDA CEC	
TIPO				
TEMPO CIRURGIA		TEMPO P. ANOX.		
TEMPO CEC		TEMPO CLAMP.		
CORTICOIDE		APROTININA		
AREAS ISQUEMIA		SIM	NÃO	DESC:
COMPLICAÇÃO				
UTI				
PRISM		RACHS - 1		
	4 HORAS	12 HORAS	24 HORAS	48 HORAS
DOPAMINA				
DOBUTAMINA				
ADRENALINA				
NORADRENALINA				
MILRINONA				
NITROPRUSSIATO				
NO (ppm)				
VOLUME de infusão (ml/kg/h)				
DIURESE média no período anterior (ml/kg/h)				
FC				
FR				
PAS invasiva				
PAS não-invasiva				

PVC					
PAO2/FIO2					
LACTATO					
GB TOTAL					
PLAQUETAS					
CREATININA					
URÉIA					
SAT VEN O2					
SAT ART O2					
EXTRAÇÃO					
PELOD					
ECO (disfunção/FE%)					
ECG					
PROGNÓSTICO					
TEMPO VM		DIAS	TEMPO UTI		DIAS
INFECÇÃO					
DESFECHO		ALTA	ÓBITO		____DIAS PO
CAUSA ÓBITO					
NECRÓPSIA					

APÊNDICE D – Método do ensaio imunoenzimático (ELISA) para determinação das concentrações séricas de troponina cardíaca I (cTnI)

Método que utiliza o aparelho IMMULITE® (DPC Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA). Trata-se de um ensaio imunoenzimático de fase sólida, onde a leitura é feita por método da quimioluminescência.

Em resumo, a amostra do paciente é incubada com o reagente durante 30 minutos. Durante este período, a troponina I forma um *sandwich* com o anticorpo monoclonal de murino anti troponina (preso a uma microesfera) e com o anticorpo policlonal de cabra anti-troponina I do reagente. Posteriormente um substrato quimioluminescente é adicionado, gerando um sinal proporcional ao número de enzimas ligadas.

Pipeta-se 150µl ou mais de soro em cada cuvete (*cup*) e o restante do método é totalmente automatizado, fornecendo o resultado em ng/ml. Tempo total para o primeiro resultado de 42 minutos. Valor de referência: < 1ng/ml.

CONTROLE DE QUALIDADE:

Durante a dosagem em uniplicata foram feitas várias dosagens de controle interno do método utilizando um calibrador próprio (*Cardiac Marker Control Module*). Este módulo auxilia na monitorização do desempenho do ensaio. É constituído por dois frascos contendo valores conhecidos de cTnI, um com níveis baixos e outro com níveis altos.

Para o aparelho utilizado, os valores ideais e seu desvio padrão (em ng/mL), juntamente com os valores encontrados em nossos controles são dados abaixo.

NIVEL BAIXO:	1,09 ± 0,10	NIVEL ALTO:	18,8 ± 1,41
Controle 1	1,0		18,7
Controle 2	1,0		18,3
Controle 3	1,0		18,4
Controle 4	1,0		18,5
Controle 5	1,0		18,2

APÊNDICE E – Método do ensaio imunoenzimático (ELISA) para determinação das concentrações séricas de NT-pro BNP

Método que utiliza o analisador Cobas E 411 (Roche Diagnostics, 2006). Trata-se de um ensaio imunoenzimático de fase sólida, onde a leitura é feita por método da eletroquimioluminescência.

Em resumo, a amostra do paciente é incubada com o reagente durante 18 minutos. Durante este período, o NT-pro BNP forma um *sandwich* com o anticorpo monoclonal biotinilado específico anti NT-pro BNP e com o anticorpo monoclonal anti NT-pro BNP marcado com rutênio. Este complexo se liga a fase sólida da estreptavidina deste com a biotina do complexo. Posteriormente, a aplicação de uma corrente elétrica ao eletrodo induz uma emissão quimioluminescente que é medida por um fotomultiplicador. Os resultados são determinados com base numa curva de calibração gerada no analisador por uma calibração de dois pontos e uma curva principal incluída no código de barras do reagente.

Pipeta-se 150µl ou mais de soro em cada cuvete (*cup*) e o restante do método é totalmente automatizado, fornecendo o resultado em ng/ml. Tempo total para o primeiro resultado de 18 minutos.

CALIBRAÇÃO:

Antes de iniciar a quantificação, o aparelho foi calibrado utilizando-se o *kit* apropriado *proBNP II CalSet*. Este consiste numa matriz de soro equino liofilizada com adição de NT-pro BNP sintético em dois níveis de concentração e fornece um valor para cada nível sérico que deve estar dentro dos valores estipulados numa tabela.

CONTROLE DE QUALIDADE:

Durante a dosagem em duplicata foram feitas várias dosagens de controle interno do método utilizando um calibrador próprio (*PreciControl Cardiac II*). Este módulo auxilia na monitorização do desempenho do ensaio. É constituído por dois

frascos contendo valores conhecidos de NT-pro BNP, um com níveis baixos e outro com níveis altos.

Para o aparelho utilizado, os valores ideais e seu desvio padrão (em pg/mL), juntamente com os valores encontrados em nossos controles no início, no meio e no final das dosagens são dados abaixo.

NIVEL BAIXO:	137 ± 25	NIVEL ALTO:	4.920 ± 885
Controle 1	123,8		4.264
Controle 2	129,4		4.362
Controle 3	123,8		4.208

Apêndice F - Resultados da quantificação e da qualidade do RNA

Protocolo de quantificação do RNA:

1. Diluir 1 µl da amostra contendo RNA em 500 µl de água contendo DEPC;
2. Fazer a leitura por espectrofotometria a 260 nm (Eppendorf® BioPhotometer Plus, Eppendorf AG, Hamburg, Germany).
3. Fazer a correção, lembrando que 1 unidade A260 = 40 µg/mL
4. Logo, deve-se multiplicar a unidade de leitura por 40 e pelo fator de diluição (no caso 500). Dividir então este valor por 1000 para obter a quantificação em µg/µL.

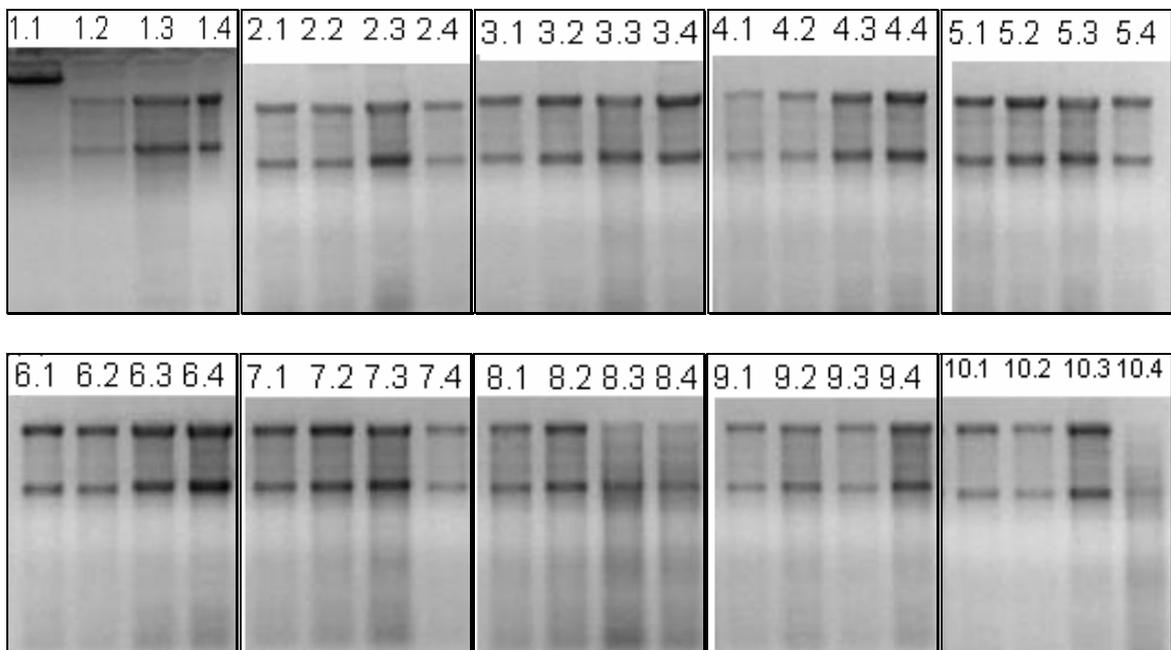
Tabela 22 – Quantificação do RNA

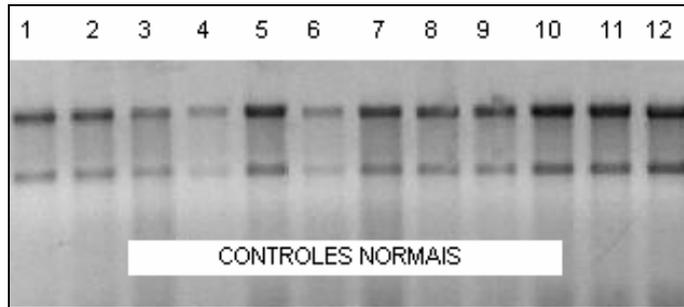
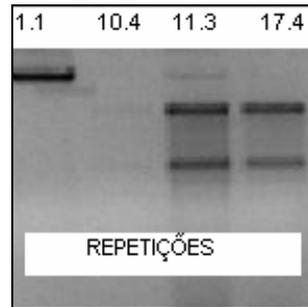
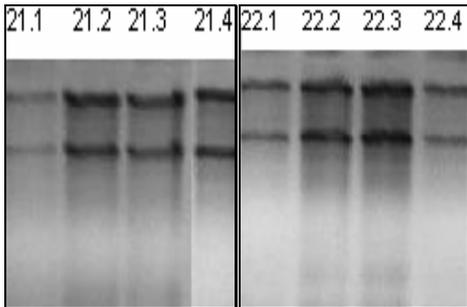
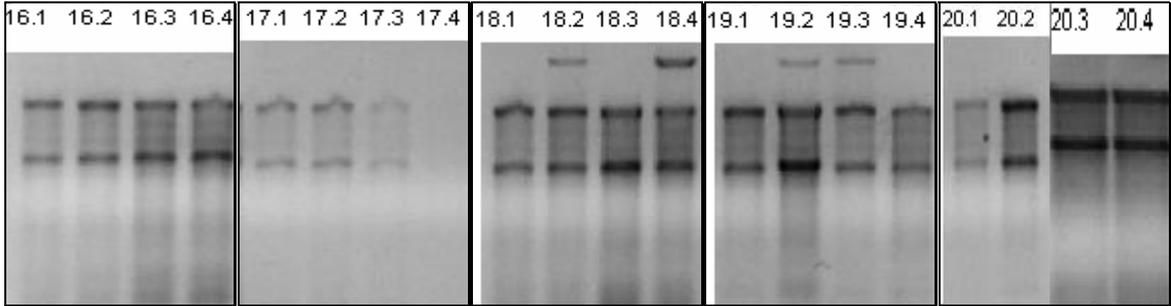
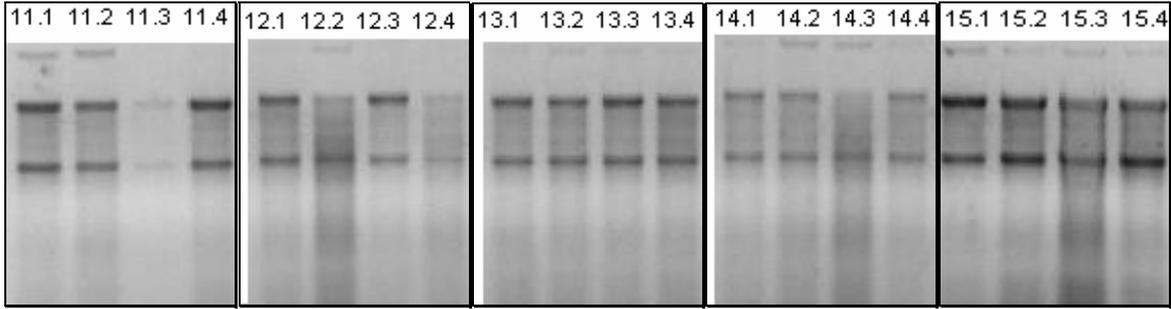
PACIENTE	4 h	12 h	24 h	48 h
1	-	62	96	52
2	88	44	116	50
3	52	76	98	124
4	68	64	106	106
5	90	138	96	16
6	70	90	124	92
7	82	128	126	52
8	58	76	100	92
9	36	70	62	66
10	46	36	76	94
11	54	46	52	48
12	48	62	60	64
13	44	48	88	82
14	68	70	96	62
15	82	156	200	156
16	54	52	72	84
17	30	26	30	30
18	42	54	88	90
19	52	108	50	40
20	24	40	72	70
21	22	54	44	44
22	32	54	84	26

Legenda : quantificação por paciente em cada horário de coleta dada em µg/mL

Resultados da avaliação da qualidade do RNA por eletroforese

A maioria das amostras estudadas exibiu as duas bandas clássicas do RNA ribossômico: 28S e 18S. Em algumas amostras, pode-se observar degradação do RNA (ex: 1.1, 10.4, etc), por isso foram repetidas de uma segunda alíquota armazenada separada e usada a melhor amostra. Apenas a amostra 1.1 (corresponde ao primeiro paciente no tempo 4 horas) não pode ser utilizada pois só aparece a banda correspondente ao DNA com degradação total do RNA. Também houve amostras com contaminação por DNA (ex: 18.4), que precisaram receber tratamento com DNase. A qualidade das amostras pode ser vista nas figuras abaixo, de maneira ilustrativa. O primeiro número corresponde ao número do paciente alocado (total de 22) e o segundo corresponde ao horário de coleta, sendo 1, 2, 3 e 4 correspondentes respectivamente aos tempos 4, 12, 24 e 48 horas da coleta. Mais abaixo estão mostrados de 1 a 12 os pacientes colhidos como controles normais na população pediátrica.





ANEXOS

ANEXO A – Pediatric Risk of Mortality (POLLACK; RUTTIMANN; GETSON, 1988)

Variáveis	Variação por idade		Pontos
	Lactentes	Maiores	
PA sistólica (mmHg)	130-160	150-200	2
	55-65	65-75	2
	>160	>200	6
	40-54	50-64	6
	<40	<50	7
PA diastólica (mmHg)		>110	6
FC (bpm)	>160	>150	4
	<90	<80	4
FR (ipm)	61-90	51-90	1
		>90	5
PaO ₂ /FiO ₂ ^a		Apnéia	5
		200-300	2
PaCO ₂ (mmHg) ^b		<200	3
		51-65	1
Escala de Coma de Glasgow ^c		>65	5
		<8	6
Reação Pupilar	Anisocóricas ou dilatadas		4
		Fixas e dilatadas	10
TP/TTPa		>1,5 x controle	2
Bilirrubina total (mg/dL) ^d		>3,5	6
		3-3,5	1
		6,5-7,5	1
Potássio (mEq/L)		<3	5
		>7,5	5
		0,8-0,85	2
Cálcio iônico (mmol/L)		1,3-1,5	2
		<0,8	6
		>1,5	6
Glicemia (mg/dL)		40-60	4
		250-400	4
		<40	8
		>400	8
Bicarbonato (mmol/L) ^e		<16	3
		>32	3

Legenda: (a) não deve ser realizado em pacientes com *shunt* intracardiaco ou insuficiência respiratória crônica; existe a necessidade de se colher uma amostra com sangue arterial; (b) pode ser realizado com uma amostra de sangue capilar; (c) não pode ser realizado em pacientes com sedação, paralisia, anestesia ou disfunção neurológica crônica; (d) somente em crianças acima de 1 mês de idade; (e) pode-se utilizar os valores medidos

ANEXO B – Classificação de complexidade de procedimentos cirúrgicos para cardiopatias congênitas RACHS-1 (Risk Adjustment for Congenital Heart Surgery), adaptado de Jenkins, 2004

Categoria de risco I

Correção de comunicação interatrial (inclui os tipos *ostium secundum*, seio venoso e *forâmen ovale*)
 Aortopexia
 Ligadura de canal arterial em idade >30 dias
 Correção de coarctação da aorta em idade >30 dias
 Correção de drenagem anômala parcial das veias pulmonares

Categoria de risco II

Valvotomia ou valvoplastia aórtica em idade >30 dias
 Ressecção de estenose sub-aórtica
 Valvotomia ou valvoplastia pulmonar
 Substituição de valva pulmonar
 Infundibulectomia ventricular direita
 Ampliação da via de saída do ventrículo direito
 Correção de fístula artério-coronária
 Correção de comunicação interatrial tipo *ostium primum*
 Correção de comunicação interventricular
 Correção de comunicação interventricular e valvotomia pulmonar ou ressecção infundibular
 Correção de comunicação interventricular e retirada de bandagem da artéria pulmonar
 Correção de defeito septal não especificado
 Correção total de tetralogia de Fallot
 Correção de drenagem anômala total de veias pulmonares em idade >30 dias
 Cirurgia de Glenn
 Correção de anel vascular
 Correção de janela aorto-pulmonar
 Correção de coarctação da aorta em idade <30 dias
 Correção de estenose da artéria pulmonar
 Transecção da artéria pulmonar
 Fechamento de átrio comum
 Correção de *shunt* do ventrículo esquerdo para átrio direito

Categoria de risco III

Substituição de valva aórtica
 Cirurgia de Ross
 Ampliação com selo na via de saída do ventrículo esquerdo
 Ventriculomiotomia
 Aortoplastia
 Valvotomia ou valvoplastia mitral
 Substituição da valva mitral
 Valvectomia tricúspide
 Valvotomia ou valvoplastia tricúspide

Substituição da valva tricúspide
 Reposicionamento da valva tricúspide para anomalia de Ebstein em idade >30 dias
 Correção de artéria coronária anômala sem túnel intrapulmonar (Takeuchi)
 Fechamento de valva semilunar, aórtica ou pulmonar
 Colocação de tubo do ventrículo direito para artéria pulmonar
 Colocação de tubo do ventrículo esquerdo para artéria pulmonar
 Correção de dupla via de saída do ventrículo direito com ou sem correção de obstrução ventricular direita
 Cirurgia de Fontan
 Correção de canal atrioventricular transicional ou completo com ou sem substituição de valva
 Bandagem da artéria pulmonar
 Correção da tetralogia de Fallot com atresia pulmonar
 Correção de *cor triatriatum*
 Realização de *shunt* arterial sistêmico-pulmonar
 Cirurgia de *atrial switch*
 Cirurgia de *arterial switch*
 Reimplante de artéria pulmonar anômala
 Anuloplastia
 Correção de coarctação de aorta e fechamento de comunicação interventricular
 Excisão de tumor intracardíaco

Categoria de risco IV

Valvotomia ou valvoplastia aórtica em idade < 30 dias
 Cirurgia de Konno
 Correção de anomalia complexa (ventrículo único) por ampliação de comunicação interventricular
 Correção de drenagem anômala total de veias pulmonares em idade < 30 dias
 Septectomia atrial
 Correção de transposição, comunicação interventricular e estenose subpulmonar (Rastelli)
 Cirurgia de *atrial ou arterial switch* com fechamento de comunicação interventricular
 Cirurgia de *atrial ou arterial switch* com correção da estenose subpulmonar
 Cirurgia de *arterial switch* com retirada de bandagem da artéria pulmonar
 Correção de truncus arteriosus communis
 Correção de hipoplasia ou interrupção do arco aórtico com ou sem fechamento de comunicação interventricular
 Enxertia no arco aórtico transverso
 Unifocalização para tetralogia de Fallot e atresia pulmonar
Double switch

Categoria de risco V

Reposicionamento da válvula tricúspide para anomalia de Ebstein em idade < 30 dias
 Correção de truncus e interrupção do arco aórtico

Categoria de risco VI

Estágio I de correção da síndrome do coração esquerdo hipoplásico (cirurgia de Norwood)
 Estágio I de correção de condições da síndrome do coração esquerdo não-hipoplásico
 Cirurgia de Damus-Kaye-Stansel

Anexo C – Escore PELOD (Paediatric Logistic Organ Dysfunction)

DISFUNÇÃO	PONTUAÇÃO			
	0	1	10	20
1- NEUROLÓGICO*				
Escala Glasgow	12-15	7-11	4-6	3
Reação Pupilar	Ambas reativas	NA e NA	Ambas fixas	NA
2- CARDIOVASCULAR §				
Frequência Cardíaca(bpm)				
<12 anos	≤195	NA	>195	NA
≥ 12 anos	≤150	NA	>150	NA
		e	ou	
Pressão Arterial Sistólica (mmHg)				
< 1 mês	>65	NA	35-65	<35
1 mês – 1 ano [∞]	>75	NA	35-75	<35
1 ano – 12 anos [∞]	>85	NA	45-85	<45
≥ 12 anos	>95	NA	55-95	<55
3- RENAL				
Creatinina (µmol/L)				
<7 dias	<140	NA	≥140	NA
7 dias – 1 ano [∞]	<55	NA	≥55	NA
1 ano – 12 anos [∞]	<100	NA	≥100	NA
≥ 12 anos	<140	NA	≥140	NA
4 - RESPIRATÓRIO£				
Relação PaO ₂ (kPa)/FiO ₂	>9,3	NA	≤9,3	NA
		e	ou	
PaCO ₂ (KPa)	≤11,7	NA	≥11,7	NA
		e		
Ventilação mecânica	Não	Sim	NA	NA
5 - HEMATOLOGICO				
Leucocitos (x10 ⁹ /L)	≥4,5	1,5-4,4	<1,5	NA
Plaquetas (x10 ⁹ /L)	≥35	<35	NA	NA
6- HEPÁTICO				
Aspartato transaminase (UI/L)	<950	≥950	NA	NA
INR	<1,4	≥1,4	NA	NA

Adaptado de LETEURTRE et al, 2003

Legenda: PaO₂ = pressão parcial arterial de oxigênio; FiO₂ = fração inspirada de oxigênio; PaCO₂ = pressão parcial arterial de gás carbônico; INR = *International normalized ratio*

* Escala de coma de Glasgow: usar o menor valor. Se o paciente estiver sedado, usar o escore anterior à sedação.

Avaliar somente pacientes com doença aguda do sistema nervoso central conhecida ou suspeitada.

Reação pupilar: pupilas arreagentes devem ter diâmetro > 3 mm. Não avaliar após dilatação pupilar iatrogênica.

§ Frequência cardíaca e pressão arterial sistólica: não avaliar durante o choro ou agitação iatrogênica.

[∞] Estritamente menor que.

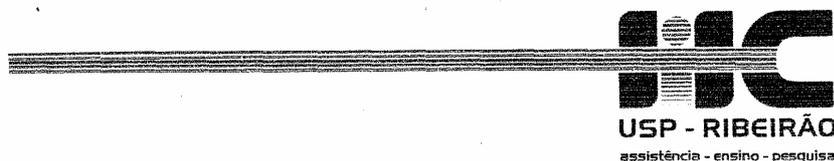
£ PaO₂: usar somente medida arterial.

A relação PaO₂/FiO₂, que não pode ser avaliada em pacientes com shunt intracardíaco, é considerada como normal em crianças com cardiopatia cianossante.

A PaCO₂ pode ser medida no sangue arterial, capilar ou venoso.

Ventilação mecânica: o uso de ventilação com máscara não deve ser considerado ventilação mecânica.

**ANEXO D – Termo de aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do
HC-FMRP-USP**



Mem. nº 1087/2008
GS-3.3/AES

Ribeirão Preto, 03 de setembro de 2008

Ilustríssimos Senhores

MARCOS ALVES PAVIONE

PROFª DRª ANA PAULA DE CARVALHO PANZERI CARLOTTI (Orientadora)

Depto. de Puericultura e Pediatria

Prezados Senhores,

Atendendo solicitação do Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP, Prof. Dr. Sérgio Pereira da Cunha, encaminho a Vossa Senhoria Parecer nº 559/2008, referente ao Projeto de Pesquisa intitulado **“AVALIAÇÃO DO USO DO PRÉ-CONDICIONAMENTO ISQUÊMICO REMOTO NO DIA PRECEDENTE À CIRURGIA EM CRIANÇAS SUBMETIDAS A CIRCULAÇÃO EXTRACORPÓREA (EFEITOS NA “SEGUNDA JANELA”)**”, de acordo com o Processo HCRP nº 8966/2007.

O parecer informa que seu projeto encontra-se **APROVADO**.
Atenciosamente.

ANTONIA EVANGELISTA DA SILVA
Encarregada do Setor de Comissões
R.F. nº 8241

**ANEXO E – Termo de aprovação da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
(CONEP)**



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

www.hcrp.fmrp.usp.br



Ribeirão Preto, 12 de junho de 2008.

Ofício Nº. 2080/2008.
CEP/MGV

PROCESSO HCRP Nº. 8966/2007

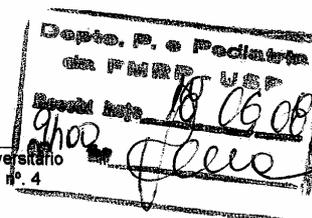
Prezado Professor,

O Comitê de Ética em Pesquisa analisou e aprovou “AD REFERENDUM” as respostas dos Investigadores às recomendações apresentadas pela CONEP, referente à pesquisa “AVALIAÇÃO DO USO DO PRÉ-CONDICIONAMENTO ISQUÊMICO REMOTO NO DIA PRECEDENTE À CIRURGIA EM CRIANÇAS SUBMETIDAS A CIRCULAÇÃO EXTRACORPÓREA (EFEITOS NA “SEGUNDA JANELA”)”.

Atenciosamente,


DR^a. MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimo Senhor
MARCOS ALVES PAVIONE
PROF^a. DR^a. ANA PAULA DE CARVALHO P. CARLOTTI (Orientadora)
 Departamento de Puericultura e Pediatria



Comitê de Ética em Pesquisa HCRP e FMRP-USP - Campus Universitário
 FWA - 0000 2733; IRB - 0000 2186 - Registro CONEP/SISNEP nº. 4
 Fone (16) 3602-2228 - E-mail : cep@hcrp.fmrp.usp.br
 Monte Alegre 14048-900 Ribeirão Preto SP

ANEXO F – Método do ensaio imunoenzimático (ELISA) para determinação das concentrações séricas de IL-8

PRIMEIRO DIA

- todos os reagentes devem estar em temperatura ambiente
- diluir o anticorpo de captura:
 - pegar 50µl do anticorpo de captura
 - adicionar 12,45ml do coating buffer
 - volume final 12,5ml, diluição final 1:250
- pipetar 100µl do anticorpo de captura diluído em cada poço
- selar e incubar overnight a 4 graus
- reconstituir o standard:
 - reconstituir o frasco com 1ml de AD, esperar 15min e misturar suavemente (a solução estoque terá 100ng/ml)
 - aliquotar a solução estoque em 20 frascos de polipropileno, de 50µl cada, e armazenar a -80 graus por até 6 meses ou a 2-8 graus por até 8 horas

SEGUNDO DIA

- aspirar e lavar 3x com $\geq 300\mu\text{l}$ de wash buffer, bater no papel
- colocar $\geq 200\mu\text{l}$ de assay diluent em cada poço
- incubar em TA por 1h
- pegar uma alíquota da solução estoque e diluir para 800pg/ml (fator de diluição 1:125)
- pegar 20µl da solução estoque e adicionar 2,48ml de assay diluent
- vortexar
- fazer diluições seriadas do standard: diluir ao meio nas seguintes concentrações: 800, 400, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.3 e 3.1pg/ml
- ao todo são 10 tubos (estoque puro, 8 diluições e o zero=assay diluent)
- aspirar e lavar 3x
- colocar 100µl de standard ou amostra ou controle em cada poço
- selar e incubar em TA por 2h
- preparar o working detector para 1 placa (12ml):
 - diluir o anticorpo de detecção em assay diluent na proporção de 1:500
 - pegar 25µl do anticorpo de detecção
 - adicionar 11,97ml de assay diluent
 - 15 minutos antes de usar, adicionar 50µl de reagente enzimático (1:250) no anticorpo de detecção diluído
- vortex
- aspirar e lavar 5x
- colocar 100µl de working detector em cada poço
- selar e incubar em TA por 1h
- aspirar e lavar 7x, deixando o wash buffer 30s-1min cada vez

- preparar a solução substrato 15min antes de usar:
 - colocar os reagentes 30min em TA
 - misturar 6ml de reagente substrato A com 6ml de reagente B

- colocar 100 μ l de solução substrato em cada poço
- incubar sem selar em TA e escuro por 30min
- colocar 50 μ l solução stop em cada poço
- ler absorbância a 450nm dentro de 30min com correção para 570nm

Anexo G – Método do ensaio imunoenzimático (ELISA) para determinação das concentrações séricas de IL-10

PRIMEIRO DIA

- todos os reagentes devem estar em temperatura ambiente
- diluir o anticorpo de captura:
 - pegar 50µl do anticorpo de captura
 - adicionar 12,45ml do coating buffer
 - volume final 12,5ml, diluição final 1:250
- pipetar 100µl do anticorpo de captura diluído em cada poço
- selar e incubar overnight a 4 graus
- reconstituir o standard:
 - reconstituir o frasco com 1ml de AD, esperar 15min e misturar suavemente (a solução estoque terá 100ng/ml)
 - aliquotar a solução estoque em 20 frascos de polipropileno, de 50µl cada, e armazenar a -80 graus por até 6 meses ou a 2-8 graus por até 8 horas

SEGUNDO DIA

- aspirar e lavar 3x com $\geq 300\mu\text{l}$ de wash buffer, bater no papel
- colocar $\geq 200\mu\text{l}$ de assay diluent em cada poço
- incubar em TA por 1h
- pegar uma alíquota da solução estoque e diluir para 2000pg/ml (fator de diluição 1:50)
- pegar 50µl da solução estoque e adicionar 2,45ml de assay diluent
- vortex
- fazer diluições seriadas do standard: diluir ao meio nas seguintes concentrações: 2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6 e 7.8pg/ml
- ao todo são 10 tubos (estoque puro, 8 diluições e o zero=assay diluent)
- aspirar e lavar 3x
- colocar 100µl de standard ou amostra ou controle em cada poço
- selar e incubar em TA por 2h
- preparar o working detector para 1 placa (12ml):
 - diluir o anticorpo de detecção em assay diluent na proporção de 1:500
 - pegar 25µl do anticorpo de detecção
 - adicionar 11,97ml de assay diluent
 - 15 minutos antes de usar, adicionar 50µl de reagente enzimático (1:250) no anticorpo de detecção diluído
- vortex
- aspirar e lavar 5x
- colocar 100µl de working detector em cada poço
- selar e incubar em TA por 1h

- aspirar e lavar 7x, deixando o wash buffer 30s-1min cada vez
- preparar a solução substrato 15min antes de usar:
 - colocar os reagentes 30min em TA
 - misturar 6ml de reagente substrato A com 6ml de reagente B
- colocar 100µl de solução substrato em cada poço
- incubar sem selar em TA e escuro por 30min
- colocar 50µl solução stop em cada poço
- ler absorbância a 450nm dentro de 30min com correção para 570nm

Receitas das soluções utilizadas nas reações ELISA para IL-8 e IL-10

1. Coating Buffer

0,1 M carbonato de sódio, pH 9.5
8,4g NaHCO₃
3,56g Na₂CO₃, q.s. 1litro, pH 9,5

Usar logo que preparar ou usar dentro de 7 dias, refrigerado em temperatura de 2 a 8°C.

2. Assay Diluent

PBS (phosphate-buffered saline) com 10% FBS (fetal bovine serum), pH 7.0
Para 2 placas: preparar 100ml = 90ml PBS + 10ml FBS

3. PBS (phosphate-buffered saline)

80g NaCl
11,6g Na₂HPO₄
2g KH₂PO₄
2g KCl
q.s. 10 litros, pH 7.0

Usar logo após o preparo ou usar dentro de 3 dias, refrigerado em temperatura de 2 a 8°C. Para 2 placas, preparar 2 litros.

4. Wash Buffer

PBS com 0,05% de Tween 20
Para 2 placas: 0,6ml Tween 20 + PBS qsp 1200ml

Usar logo após o preparo ou usar dentro de 3 dias, refrigerado em temperatura de 2 a 8°C

5. Solução Stop

1 M H₃PO₄ ou 2 N H₂SO₄

Anexo H - Protocolo para separação do plasma e conservação do RNA

1. Limpeza da bancada de trabalho, das pipetas, caixas e demais materiais com solução RNase Away® (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA). Utilizar pipetas exclusivas para RNA.
2. Centrifugação imediata do sangue coletado (3 ml em tubo com EDTA) a 3000 rpm, por 10 minutos, em centrífuga refrigerada a 4 °C.
3. Separar o plasma com uma pipeta, armazenando em tubos Eppendorf® (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) e armazenar congelado a -70 °C.
4. Técnica para preservação do RNA:
 - Colocar em um tubo Falcon® 25 ml de tampão de lise (2,5 ml de bicarbonato de amônio e 22,5 ml de cloreto de amônio) (ver receitas na próxima página);
 - Pipetar o *pellet* de células que sobrou do tubo com EDTA para o tubo o Falcon®, e misture por agitação;
 - Deixar descansando no gelo por 10 minutos;
 - Centrifugar a 3000 rpm por 15 minutos em centrífuga refrigerada a 4 °C;
 - Desprezar o sobrenadante por inversão;
 - Lavagem rápida do *pellet*.
 - Aspirar 500 µl de PBS (*phosphate-buffered saline* – ver receita na próxima página);
 - Encostar a ponteira na parede do tubo e liberar o PBS lentamente para não dissolver o *pellet*;
 - Desprezar o PBS por inversão cuidadosamente;
 - Repetir até retirar o excesso de coloração vermelha.
 - Adicionar 500 µl de PBS e 1500 µl de Trizol LS® (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA);
 - Misturar bem a solução passando várias vezes pela pipeta (*up and down*) para dissociação de complexos nucleoprotéicos. Se achar muito viscoso adicionar mais 500 µl de PBS e 1500 µl de Trizol LS®;
 - Deixar descansar por 5 minutos em temperatura ambiente, transferir a solução para tubos Eppendorf® e congelar imediatamente a -70 °C.

Receita do tampão de lise

- Misturar 9 partes (22,5 ml) de cloreto de amônio com 1 parte (2,5 ml) de bicarbonato de amônio:
- Cloreto de amônio – 0,144 M em água contendo DEPC (dietilpirocarbonato).
- Bicarbonato de amônio – 0,01 M em água contendo DEPC.

Receita de Água DEPC:

A cada 1 litro de água bidestilada acrescentar 1 mL de DEPC (dietilpirocarbamato). Misturar bem e autoclavar antes do uso.

Receita do PBS (*phosphate-buffered saline*)

- Ingredientes para 1000 ml de solução:
- Água destilada – 800 ml
- NaCl – 8 g
- KCl – 0,2 g
- Na₂HPO₄ – 1,44 g
- KH₂PO₄ – 0,24 g
- Adicionar água destilada para completar 1000 ml;
- Ajustar o pH para 7,40 usando HCl.

Anexo I - Protocolo de extração do RNA

- Descongelar no gelo os tubos contendo o *pellet* de leucócitos e Trizol LS® armazenados na etapa anterior;
- Adicionar 200 µl de clorofórmio aos tubos;
- Adicionar 20 µl de glicogênio (20 mg/ml) e misturar por inversão durante 15 segundos, deixando descansar em temperatura ambiente por 10 minutos;
- Centrifugar a 14000 rpm por 15 minutos a 4 °C;
- O resultado será a separação em 3 fases:
 - a. Fase superior (incolor): RNA
 - b. Fase intermediária (branca): DNA
 - c. Fase inferior (vermelha): proteínas
- Com o auxílio de uma pipeta, transferir cuidadosamente a fase superior (sobrenadante) contendo RNA para outros tubos Eppendorf® previamente identificados;
- Armazenar as fases restantes para posterior extração de DNA e proteínas em freezer a -70 °C;
- Adicionar ao sobrenadante transferido 500 µl de isopropanol a 100% gelado;
- Agitar manualmente por inversão e incubar *overnight* a -70 °C;
- No dia seguinte, descongelar as amostras em gelo;
- Centrifugar a 14000 rpm por 15 minutos a 4 °C;
- Verter o tubo, desprezando o sobrenadante (isopropanol), com cuidado para não desprezar o pequeno *pellet* branco (RNA);
- Adicionar 1000 µl de etanol a 75% gelado;
- Centrifugar a 14000 rpm por 15 minutos a 4 °C;
- Verter o tubo, desprezando o sobrenadante (etanol), com cuidado para não desprezar o pequeno *pellet* branco (RNA);
- Deixar secar o *pellet* lentamente, deixando o tubo meio invertido sobre papel toalha, em temperatura ambiente, até que o *pellet* fique quase invisível (transparente);
- Ressuspender o *pellet* em 15 µl de água contendo DEPC;
- Incubar por 10 minutos a 60 °C e armazenar a - 70°C.

Anexo J - Protocolo de avaliação da qualidade do RNA por eletroforese

- Diluir 1 µl de cada amostra contendo RNA em 5 µl de água contendo DEPC e adicionar 1 µl de corante Dye;
- Pipetar as amostras nos interior dos poços do gel de agarose a 1,2% cuidadosamente;
- Submeter a eletroforese com 70 volts por 45 minutos;
- Fotografar a placa em câmara escura com câmera digital (Kodak EDAS 290, Kodak Scientific Imaging Systems, Eastman Kodak Company, New Jersey, USA) e software apropriado (Kodak 1D Software v.3.6.2, Eastman Kodak Company, New Jersey, USA).
- Os resultados contendo duas bandas de RNA foram considerados satisfatórios. Quando houve contaminação com DNA, a amostra foi submetida a tratamento com DNase. Quando houve degradação do RNA, a amostra foi submetida a nova extração.

Preparação do gel de agarose a 1,2%

1. Misturar 1,2 g de agarose com 100 ml de tampão TBE (receita abaixo)
2. Aquecer no microondas por 1 minuto e 40 segundos;
3. Quando cessar a fervura, adicionar 2 µl de brometo de etídio;
4. Colocar sobre a placa de eletroforese preparada com o marcador de poços e deixar esfriar em temperatura ambiente.

Tampão TBE (Tris, Borato, EDTA)

- Tris (2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol) 107,81 g/l (0,89 M)
- EDTA (ácido etileno-diamino-tetra-acético) 5,8 g/l (0,02 M)
- Ácido bórico 55 g/l (0,89 M)

Anexo L - Protocolo de síntese do DNA complementar

A síntese do DNA complementar (cDNA) foi realizada com a utilização de kit comercialmente disponível (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems®), de acordo com as recomendações do fabricante. Para cada reação foram utilizados 2 µl de cada RNA extraído nos passos anteriores, adicionando-se:

- Buffer, 2,5 µl
- dNTP, 1 µl
- Random Primers, 2,5 µl
- Multiscribe, 1,25 µl
- RNase OUT, 0,63 µl
- Água com DEPC, 15,12 µl

O volume final da reação foi de 25 µl. A seguir, as amostras foram submetidas ao termociclador, com ciclos de PCR a 25 °C por 10 minutos, e a 37 °C por 120 minutos. As amostras de cDNA foram armazenadas em freezer a -20 °C até a realização do RQ-PCR.

Protocolo do RQ-PCR (PCR quantitativo em tempo real)

- Diluir o cDNA 1:50 (1 µl de cDNA + 49 µl de água DEPC);
- Em uma placa de PCR, adicionar em cada poço:
 - 7,5 µl de Mastermix (Taqman® Universal PCR Master Mix);
 - 0,75 µl da sonda específica (I-κBα ou β-actina);
 - 5 µl de cDNA diluído a 1:50 ou 5 µl de água DEPC (para o controle branco), completando cada poço para o volume final de 15 µl
- Centrifugar a 2000 rpm por 2 minutos a 4 °C;
- Inserir no aparelho de PCR (7500 Realtime PCR System, Applied Biosystems®):
- Modo “Standard 7500” com 40 ciclos

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](#)