

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE:
CARDIOLOGIA E CIÊNCIAS CARDIOVASCULARES**

Ativação e Apoptose Linfocitária:

**Análise Comparativa entre dois Tipos de Oxigenadores (Convencional e
com Curto-Circuito Venoso-Arterial) em Cirurgia de Revascularização
Miocárdica com Circulação Extracorpórea**

Tese de Doutorado

Aluno: Paulo Ernesto Leães

Orientadora: Profa. Dra. Nadine Clausell

**Porto Alegre
2003**

AGRADECIMENTOS

Uma tese de doutorado é produto de um esforço coletivo, que envolve instituições, recursos humanos, financeiros e tecnológicos, além de uma grande dose de estudo, tempo, dedicação e estresse. Acrescente-se a esse quadro o mais importante, as pessoas, com seu conhecimento, humanismo, otimismo, carinho, novas relações e vivências originadas em um longo convívio. Tudo isso representou, resumidamente, uma outra etapa de vida, que me proporcionou muitas alegrias. Agradeço a todos que participaram comigo dessa jornada, sabendo ser impossível expressar em palavras o quanto sou grato pela solidariedade,

à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela oportunidade desta formação em um Curso de Pós-Graduação, que é a síntese do academicismo;

à Santa Casa de Misericórdia, que propiciou o desenvolvimento de idéias baseadas na confiança, respeito e profissionalismo;

ao Instituto de Cardiologia/Fundação Universitária de Cardiologia, pela formação profissional, acadêmica (mestrado) e, fundamentalmente, pela formação do caráter médico de respeito ao indivíduo que os mestres, Drs. Leonel Lerner, Flávio Pereira, Raul Feck de Araújo Lara e Nestor Santos Daudt, me transmitiram;

à minha orientadora, Professora Nadine Clausell, introdutora, em nosso meio, da pesquisa na área inflamatória, que orientou, com segurança e competência, minha introdução na área da imunologia, tão complexa, quanto nova, nesse trabalho de doutorado. Poucas vezes

convivi com pessoa tão determinada, segura e com tamanha simplicidade, que transformou uma tarefa gigantesca em um produto aparentemente simples. A ela dedico este trabalho e minha admiração;

ao Prof. Dr. Jorge Pinto Ribeiro, entusiasta da vida acadêmica, contagiou-me de tal forma, há quatro anos, para esta formação, que esse entusiasmo se mantém até hoje;

ao Prof. Dr. Celso Blacher, irmão profissional e já de sangue, pela retidão e seriedade de seu comportamento, que se traduz em credibilidade e pela reconhecida competência profissional. Suas idéias novas abriram caminho para esta linha de pesquisa, a que hoje dou prosseguimento;

ao Dr. Jorge Neumann, chefe do Laboratório de Imunologia de Transplantes da Santa Casa de Misericórdia, pela amizade e facilidade com que me apresentou à imunologia, de tal forma que quase acreditei saber tudo sobre ela;

às bioquímicas Heloisa Sporleder e Raquel Canabarro, que realizaram as mensurações por citometria de fluxo, da parte fundamental de meu trabalho, os marcadores de superfície;

à Dra. Marcela Sales, cujo empenho para que a técnica cirúrgica dos pacientes desta tese tivesse a padronização necessária evitou vieses que pudessem comprometer os resultados;

ao Dr. João Alfredo Jung por contribuir na estruturação, revisão e crítica desta tese;

aos anestesistas: Drs. Daniela Jung, Maria Eugênia Marques, Nilton R. Delatorre e Luis Antônio V. Flores pela eficiência na padronização da anestesia e das coletas das amostras durante a cirurgia do protocolo desta tese além da amizade;

à enfermeira Cristina Ferreira, perfusionista, que padronizou a circulação extracorpórea e a aferição dos parâmetros do transoperatório, fundamentais para a qualidade dos resultados;

ao Dr. Luiz Beck da Silva Neto, novo parceiro profissional e amigo, pela inestimável ajuda na versão para a língua inglesa;

ao Dr. David Saitovich, pelas revisões que muito contribuiu para o aperfeiçoamento desta tese;

aos colegas clínicos Dr. Eraldo Lúcio, Dr. Carlos Ferreira, Dra. Ângela Bueno, Dra. Ana Paula Arbo Magalhães, que contribuíram na avaliação e acompanhamento dos pacientes bem como possibilitaram minha ausência para a conclusão desta tese;

ao Dr. Fernando Lucchese, pela facilitação e colaboração para implantar este projeto;

ao Laboratório Central, nas pessoas do Dr. Carlos Voegeli, Marisa Gutjahr Kayser e Marta Regina Goelzer, pela atenção na realização dos exames laboratoriais necessários para esta tese;

à acadêmica Laura Franciosi Hermann, pela coleta, armazenamento e análise de dados sem o que seria impossível a realização deste trabalho;

aos acadêmicos Gabriel Godóy Valim e Fernanda Azevedo, pelo empenho na coleta dos dados, mesmo durante os cansativos plantões;

aos residentes do Serviço de Cardiologia do Hospital São Francisco, que auxiliaram em um período de ausência para a finalização desta tese;

à equipe de ecocardiografia: Drs. Fábio Canellas, Márcia Puchalsky e Neyla Kreling pelo empenho na realização e análise ecocardiográficas;

à Dra. Lúcia Pellanda, com sua reconhecida competência, pelo auxílio inestimável no difícil caminho da estatística e revisão crítica deste trabalho;

ao Dr. Mário Wagner, pela realização das análises estatísticas com rapidez e precisão, e também pelo entusiasmo em mostrar-me o caminho da estatística;

à Biblioteca do Instituto de Cardiologia e Fundação Universitária de Cardiologia, na pessoa da Dona Maria, por toda a atenção nestes mais de vinte anos de informações,

à Luciana Rodrigues, pela pesquisa dos artigos científicos, que realizou efetivamente;

à Secretaria do Serviço de Cardiologia da Santa Casa, nas pessoas de Larissa, Márcia, Fernandes, Marlene e Rose, sempre com muita atenção e colaboração;

à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pela concessão de apoio através de Bolsa de Iniciação à Pesquisa;

à DPC Medlab, pelo fornecimento dos conjuntos de marcadores de injúria;

à DMG Equipamentos Médicos Ltda., pelo fornecimento dos conjuntos de marcadores de superfície celulares, sem os quais seria impossível a realização desta tese;

aos meus filhos, Luciano e Marcelo, que me dão o prazer de viver para desfrutar da sua companhia e aprender com eles;

à minha mulher Maria da Graça, bibliotecária, que tomou para si participar ativamente deste desafio de construção da tese e muito carinho.

“Sem o conhecimento da fisiopatologia, não se entendem os sintomas, não se compreendem os diagnósticos, não se justificam os tratamentos.”

Protásio L. da Luz - 2002

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DA LITERATURA	2
2.1	A circulação extracorpórea e os oxigenadores.....	2
2.2	Prevenção dos problemas gerados pela circulação extracorpórea.....	5
2.3	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica.....	6
2.4	Imunidade inata e adquirida.....	7
2.5	Marcadores de identificação e ativação das células do sistema imune.....	9
2.6	Apoptose e anexina V.....	10
2.7	A inter-relação da resposta imune e circulação extracorpórea.....	13
2.8	Estudos clínicos da imunidade adquirida.....	14
2.9	Conclusões.....	18
2.10	Referências.....	19
3	ARTIGO EM PORTUGUÊS	37
3.1	RESUMO.....	39
3.2	INTRODUÇÃO.....	41
3.3	PACIENTES E MÉTODOS.....	43
3.4	RESULTADOS	51
3.5	DISCUSSÃO	60
3.6	CONCLUSÕES	68
3.7	REFERÊNCIAS	69
4	ARTIGO EM INGLÊS	77
4.1	ABSTRACT	79
4.2	INTRODUCTION	81
4.3	PATIENTS AND METHODS	83
4.4	RESULTS	91
4.5	DISCUSSION	100
4.6	CONCLUSIONS.....	107
4.7	REFERENCES.....	108

5	ANEXOS	116
5.1	Anexo I – Ficha de randomização e avaliação pré-operatória.....	117
5.2	Anexo II A – Ficha de controle trans-operatório.....	118
5.3	Anexo II B – Ficha de controle trans-operatório - Controle da Perfusão	119
5.4	Anexo III – Ficha de controle pós-operatório	120
5.5	Anexo IV – Ficha de resultados dos exames.....	121
5.6	Anexo V – Consentimento informado.....	122

INTRODUÇÃO

A cirurgia cardíaca (CC) com circulação extracorpórea (CEC), usualmente provoca uma resposta imunoinflamatória autolimitada, denominada Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS), que pode ser responsável por complicações graves no pós-operatório, principalmente por casos de infecção.

A resposta inicial da imunidade inata (inespecífica) e posteriormente da imunidade adaptativa (específica) é atribuída, principalmente ao estresse cirúrgico e ao contato do sangue com a superfície não endotelial da CEC.

Foram estudadas estratégias farmacológicas e tecnológicas para evitar essas complicações, mas com pouco sucesso. Uma alternativa seria evitar, ao máximo, o contato do sangue com os componentes do circuito da CEC. Como o oxigenador é responsável por, aproximadamente, 70% de toda a superfície não endotelial da CEC, uma idéia a ser testada seria utilizar um curto circuito veno-arterial que desviasse parte do sangue venoso diretamente para a linha arterial, sem passar pelo oxigenador.

No pós-operatório imediato da CC com CEC, constata-se uma linfopenia, talvez como parte do processo da SIRS, principalmente dos linfócitos T (imunidade adaptativa), a qual se especula ser por apoptose. Testar essa hipótese, por meio do estudo da expressão de anexina V, uma proteína ligada a um fosfolípido dependente de cálcio, que identifica a apoptose mais precocemente do que os métodos baseados nas alterações nucleares como a fragmentação do DNA, pode contribuir para o conhecimento atual da fisiopatologia da imunidade adaptativa neste contexto.

A revisão a seguir tem por objetivo atualizar o conhecimento da inter-relação entre a imunidade adquirida e o uso da CEC.

REVISÃO DA LITERATURA

“Seria ingenuidade imaginar, que o nosso corpo tolerasse a exposição de todo o volume sanguíneo ao material estranho do circuito da circulação extracorpórea sem alguma espécie de reação defensiva”

Westaby S, 1983

A CEC apesar do avanço da CC, evitando seu uso, ainda tem ampla utilização. Entender a fisiopatologia da interação do sangue com os componentes da CEC é fundamental para o desenvolvimento de estratégias de prevenção e tratamento das complicações pós-operatórias proporcionadas pelo seu uso.

O objetivo desta revisão é atualizar o conhecimento da interação da CC com CEC com a imunidade adquirida (específica), considerando que a resposta da imunidade inata (inespecífica) tem sido amplamente estudada.

A Circulação extracorpórea e os oxigenadores

A CEC foi utilizada pela primeira vez em cirurgia cardíaca para correção de defeitos intracardíacos em 1951, sem sucesso, no Hospital da Universidade de Minnessota, Minneapolis, Estados Unidos [1].

A idéia original do Dr. John H. Gibbon, em 1930, de criar a condição para tratar cirurgicamente pacientes com embolia pulmonar maciça, promoveu o desenvolvimento da primeira máquina de CEC, utilizada por ele em 1952 em cirurgia cardíaca em seres

humanos, também sem sucesso [2]. O primeiro paciente que sobreviveu à cirurgia cardíaca com CEC foi encaminhado para correção de defeito septal atrial em maio de 1953, tendo como cirurgiões os Drs. J. Gibbon e F. Abritten, sendo a doutora Mary Gibbon Jr, esposa do cirurgião, a primeira perfusionista da história. Na época, o procedimento apresentava altas taxas de mortalidade.

Até 1954, utilizava-se, a hipotermia e a circulação cruzada para correção de defeitos cardíacos e somente dois centros realizavam essas cirurgias, a Universidade de Minesotta e a Clínica Mayo [3].

Em 1955, resultados experimentais da Clínica Mayo descreveram o uso de um oxigenador, originalmente construído pela IBM e modificado pela Clínica Mayo, utilizando o desenho de Gibbon [4].

Até a criação do oxigenador de bolhas, em 1955, haviam sido realizadas aproximadamente 140 cirurgias cardíacas, no período de 1952 a 1956. Nos dez anos seguintes realizaram-se 2581 cirurgias cardíacas [5-7]. A utilização da CEC generalizou-se e, em 1976, cerca de 90% das cirurgias cardíacas eram realizadas, utilizando oxigenador de bolhas [8], o que foi responsável pelo crescimento da cirurgia cardíaca em todo o mundo.

Em 1956, foi lançado, experimentalmente, o oxigenador de membrana. Os resultados mostravam que este apresentava benefício somente em cirurgias mais prolongadas, podendo reduzir o sangramento, a ativação inflamatória e os fenômenos embólicos [9]. Em 1967, o primeiro oxigenador de membrana para uso clínico foi utilizado, e a partir da década de 60, foram empregadas soluções salinas em substituição ao sangue como volume inicial da bomba de circulação extracorpórea, melhorando as

condições da perfusão, como menor viscosidade, evitando-se o uso de sangue e suas complicações [10]. Atualmente, os oxigenadores de bolhas e os de membrana são os mais utilizados e desde 1995 preferentemente os oxigenadores de membrana.

Os componentes do circuito da CEC compreendem toda a superfície não endotelial que entra em contato com o sangue, e foi considerada responsável, desde o início, pelas alterações que ocorrem durante e após a CC, provocando alterações importantes na homeostase do paciente.

Estes circuitos variam de acordo com o oxigenador utilizado, mas, genericamente, compreendem os seguintes componentes: o oxigenador de membrana ou de bolhas, os tubos de PVC (*poly vinyl chloride*), que conduzem o sangue vindo da canulação das veias cavas para um reservatório venoso, a bomba de CEC, o filtro arterial e o retorno pela linha arterial ao paciente. Apesar do avanço tecnológico, a morbidade e a mortalidade da cirurgia cardíaca continuaram sendo atribuídas à CEC [3, 11-16]. As manifestações clínicas apresentadas se caracterizam por alterações nas funções pulmonares, renais, na diátese hemorrágica, acúmulo de líquido no espaço intersticial, febre, leucocitose, vasoconstrição e aumento da susceptibilidade a infecções. O oxigenador é o componente da perfusão responsável pela função pulmonar durante o período da CEC. Ele permite a troca de gases, como dióxido de carbono e anestésicos, troca calor e serve como reservatório e filtro para o sangue que retorna do paciente pelos aspiradores. Os oxigenadores apenas não contemplam a função endócrina dos pulmões, o que pode ser sustado por algum tempo sem prejuízo para o paciente [17].

Prevenção dos problemas gerados pela circulação extracorpórea

Os efeitos prejudiciais da CEC poderiam ser minimizados com o desenvolvimento de três áreas: desenvolvimento de material biocompatível (mínima ativação dos elementos do sangue), modificação do circuito usado para perfusão e desenvolvimento de fármacos que pudessem neutralizar os efeitos danosos conseqüentes da exposição do sangue ao circuito da CEC [18].

Para esse fim, foram desenvolvidas diferentes estratégias, tanto na área farmacológica [19, 20], como através de técnicas cirúrgicas sem circulação extracorpórea, na qual o Brasil é um dos pioneiros [21-27], de novos componentes e circuitos da CEC [28-30], da não utilização de oxigenadores ou diminuição do tempo de contato do sangue com a superfície não endotelial da CEC [31, 32]. O sucesso dessas iniciativas, porém, foi limitado em relação aos desfechos clínicos.

Os esforços desenvolvidos na área da biocompatibilidade de materiais para a CEC com os circuitos recobertos com heparina [29, 30, 33-36] e na área de modificação do circuito da CEC, para evitar ou diminuir o tempo total de contato do sangue com a superfície não endotelial, têm produzido alternativas tecnológicas que ainda não comprovaram seu benefício. Constituem, entretanto, motivos de pesquisas recentes, como as alterações proporcionadas por um curto circuito veno-arterial no oxigenador, diminuindo o tempo total de exposição do sangue ao circuito da CEC. Até 40-50% do sangue venoso é desviado pelo curto circuito veno-arterial, podendo influenciar na diminuição da resposta imunoinflamatória e de micro-êmbolos [18, 37]. Oxigenadores recobertos com silicone, biocompatíveis, que preveniriam a disfunção de órgãos no pós-operatório [38] e a exclusão

do oxigenador do circuito da CEC, pela técnica de Drew-Anderson, vêm sendo testados[31]. Estes demonstram benefícios em desfechos substitutos, mas não está comprovado o benefício clínico e não foram integrados na rotina da CC atual.

Na área dos fármacos, os corticóides têm sido testados desde a década de 70. Reduzem a liberação do fator de necrose tumoral- α (TNF- α)[19], interleucina (IL)-1 β pelos macrófagos, IL-6 e IL-8 [39], provocam aumento de IL-10 (antiinflamatória) [40] e na imunidade adquirida, diminuindo o número de linfócitos B e T, sem demonstrar um benefício na morbidade e da mortalidade [41]. A aprotinina, um inibidor da protease, diminui o sangramento, as transfusões e níveis de D-dímeros, reduz os níveis das citocinas e das moléculas de adesão, integrinas e do TNF- α [42], mas não impede a ativação endotelial e ainda tem seu uso restrito.

Os pequenos avanços obtidos, até agora, nesta área, demonstram nosso ainda pouco conhecimento da complexa fisiopatologia da resposta imunoinflamatória provocada pela CC.

Síndrome da resposta inflamatória sistêmica

A SIRS é definida como uma resposta pró-inflamatória do organismo a vários tipos de agressão inicial, como infecção, endotoxemia, trauma cirúrgico, isquemia/necrose ou déficit de perfusão. Deve apresentar duas ou mais das seguintes condições: temperatura corporal maior que 38⁰ C, frequência cardíaca maior de 90 batimentos por minuto,

freqüência respiratória maior que 20 movimentos respiratórios por minuto, pressão de dióxido de carbono menor de 32 mmHg, leucocitose maior do que 12.000/mm³ ou menor de que 4.000/mm³ ou ainda uma taxa de mais de 10% de bastonados em relação aos neutrófilos [43]. É o início de uma alteração da homeostase, que pode ser autolimitada ou evoluir para uma falência de múltiplos órgãos (*Multiple Organs Dysfunction Syndrome* - MODS), com alta mortalidade. Ocorre em poucos dias e, seqüencialmente, evolui com insuficiência respiratória, intestinal, hepática, renal, hematológica e cardíaca.

A CEC é um dos estímulos iniciais de desencadeamento da SIRS pelo contato direto do sangue com sua superfície não endotelial [44]. O estresse cirúrgico por si só desencadeia a mesma resposta, porém mais atenuada [45]. Contribui, também, a endotoxemia, através da liberação de lipopolisacarídeo de bactéria gram-negativo, por translocação do intestino, durante a fase de isquemia [46].

Imunidade inata e adquirida

A resposta imunoinflamatória provocada pela CC estimula os dois componentes do sistema imune. A imunidade inata (inespecífica) reage rapidamente ao antígeno, sempre da mesma forma a repetidas agressões, não tem memória e é composta por elementos celulares, granulócitos polimorfonucleares, monócitos, macrófagos e células exterminadoras naturais (*natural killer*, NK); e humorais, citoquinas, radicais livres de oxigênio, complemento, proteínas de fase aguda como a proteína C reativa (PCR). A imunidade adquirida reage mais lentamente, é qualitativa, específica a um antígeno, tem

regulação, memória, e é composta pelos linfócitos T, linfócitos B, pelas células apresentadoras de antígeno e pelos fatores humorais, citocinas e anticorpos [47].

A resposta imune inata na CC com CEC foi a primeira a ser reconhecida e estudada nos anos 80. Constatou-se, então, ocorrer uma ativação precoce, principalmente do complemento e das IL-1, IL-6 [48, 49], IL-8 (FRERING B, 1994) e TNF- α [50, 51].

A resposta imune adquirida é menos conhecida e só recentemente, na década de 90, vem sendo investigada com métodos adequados. Constata-se uma linfopenia pós-operatória, principalmente dos linfócitos B e T no sub grupo dos linfócitos T auxiliares (*T helper*, Th). Sua importância deve-se ao fato que as complicações infecciosas e a MODS, pós-operatórias, sendo as infecções geralmente provocadas por germes oportunistas, e com alta mortalidade se comparadas a outras cirurgias não cardíacas, apontam para a depressão da resposta imune adquirida [52, 53].

Importante identificar que as células apresentadoras de antígeno estimulam os linfócitos T através da citocina IL-1 e que a IL-2 produzida pelos linfócitos T, estimula e amplia a resposta celular adquirida. A IL-6 é produzida pelos linfócitos T e não só ativa como media a resposta da fase aguda, junto com a IL-1 e o TNF- α .

O conhecimento da fisiopatologia da imunidade adquirida deve trazer informações adicionais do complexo mecanismo da resposta imunoinflamatória provocada pela CEC, que propiciem prevenção e tratamento dessa síndrome.

Marcadores de identificação e ativação das células do sistema imune

As células do sistema imune expressam moléculas na sua superfície, identificadas através de anticorpos monoclonais que se ligam especifica e seletivamente com estas moléculas. As subpopulações linfocitárias podem ser identificadas através da diferente expressão destes antígenos em sua superfície. Estes antígenos foram uniformizados em uma nomenclatura chamada de grupo de diferenciação ou CD (“*cluster of differentiation*”). Assim, a presença de determinados antígenos na membrana de um linfócito serve para caracterizar não só o tipo celular, como também seu estágio de maturação e de atividade. Graficamente é expresso pelo sinal +, quando estiver presente na superfície ou –, quando não estiver expresso na superfície da célula [54]

Das células tronco originadas na medula óssea derivam os linfócitos T e B. Os linfócitos T ainda imaturos migram para o timo (origem do seu nome) e neste local adquirem sua identidade de linfócitos Th ou de T citotóxicos (Tc). Os Th são caracterizados pela presença dos marcadores CD3 e CD4 e ausência de CD8 (CD3+, CD4+, CD8-), enquanto que os Tc apresentam CD8 ao invés de CD4 (CD3+, CD4-, CD8+) [47]. Os linfócitos Th, iniciam e regulam a resposta imunológica. Eles reconhecem o antígeno presente na superfície das células apresentadoras de antígeno em associação com as moléculas de classe II codificado pelo Complexo Principal de Histocompatibilidade. O Tc por sua vez reconhece os antígenos presentes na superfície de todas as demais células do organismo em associação com as moléculas de classe I codificado pelo Complexo Principal de Histocompatibilidade. O auxílio dos linfócitos Th dá-se através da secreção de citocinas estimulantes para os linfócitos B, linfócitos Tc, células tronco hematopoiéticas e

na ativação dos macrófagos, estimulando a fagocitose e a destruição de patógenos intracelulares [17].

As alterações fenotípicas induzidas pela CEC e a apoptose das células do sistema imune têm sido investigadas através de anticorpos monoclonais com análise por citometria de fluxo [55]. Há uma diminuição da expressão do CD3+ (linfócitos T), CD4+ (linfócitos Th) e CD8+ (linfócito Tc). Essas alterações são máximas no primeiro dia de pós-operatório e permanecem baixas por até uma semana [56-58].

Permanecem relativamente desconhecidos os mecanismos envolvidos na diminuição dos linfócitos T no contexto da CEC e CC. As hipóteses, como aumento dos corticosteróides pelo estresse cirúrgico, hemodiluição, consumo e destruição mecânica e redistribuição na medula óssea, tecido linfóide e sangue periférico, são sugeridas [57-59], mas não comprovadas. A apoptose e a ativação da imunidade adquirida na fase precoce da CEC vêm sendo muito estudadas recentemente com marcadores mais precisos na identificação, ativação e avaliação deste fenômeno [55, 60-64].

Apoptose e anexina V

Os marcadores de superfície, além de suas finalidades fisiológicas, permitem identificar os tipos de células do sistema imune, se estão ativadas para desenvolver uma atividade específica, saindo assim de seu estado de repouso, ou se ocorreu morte celular. Há dois tipos de morte celular, a necrose e a apoptose. A necrose ocorre quando a célula está exposta a uma grave agressão física ou química. Já a apoptose, chamada de morte

programada, é um processo fisiológico em que células desnecessárias ou indesejáveis são eliminadas. Existe uma diferença morfológica e bioquímica entre ambos os tipos. Na necrose, há uma perda da integridade da parede celular, que inicia com uma intumescência do citoplasma e da mitocôndria e termina com a lise total da célula e desintegração das organelas, que são fagocitadas por macrófagos, provocando uma resposta inflamatória importante [65].

Na apoptose, o processo se inicia pelo surgimento de vesículas na membrana celular sem perda da sua integridade. Forma-se um agregado de cromatina da membrana nuclear, iniciando um retraimento do citoplasma e condensação do núcleo que termina com a fragmentação da célula em pequenos corpos e formação de vesículas ligadas à membrana (corpos apoptóticos). Nesses casos a mitocôndria torna-se fraca devido à formação de poros envolvendo proteínas das chamadas famílias BCL-2 (caspases). Uma das principais alterações que ocorre na área de interesse desta revisão é que, na apoptose, ocorre uma assimetria da membrana e uma translocação do lado citoplasmático para o lado extracelular da fosfatidilserina, permitindo a identificação da apoptose pela ligação com a anexina V precocemente, pois as alterações da membrana plasmática e superfície celular ocorrem antes da fragmentação do DNA [54, 66].

A anexina V é um membro da família das proteínas que se liga ao cálcio e aos fosfolípidios com atividade anticoagulante. No caso de apoptose, o método que utiliza anticorpos monoclonais anti anexina V marcados com FITC (*fluorescein Isothiocyanate*) é considerado o método mais sensível, rápido e simples que os demais, como os que medem a fragmentação do DNA e morte celular por necrose. Além disto, esse método, mede diretamente e individualmente a apoptose celular, enquanto os demais métodos o fazem

indiretamente. A detecção da apoptose pela anexina V é, portanto, o método mais sensível na quantificação do número de células apoptóticas e o que tem maior exatidão [64, 67].

Os estudos clínicos de apoptose nas células da imunidade inata e adquirida estão sumarizados na Tabela 1.

Tabela 1. Literatura sobre apoptose e imunidade inata e adquirida.

Ano/Autor	Imunidade	Método
1996 - OKA M et al. (Cirurgia geral)[68]	Linfócitos T ↑ Fas (2 h após) Apoptose das células mononucleares periféricas	Fragmentação do DNA Expressão de Fas Citometria de Fluxo
1998 - KETTRITZ R et al. (In vitro) [69]	IL8 retarda a apoptose dos Neutrófilos, independente da BCL 2 (Caspase)	Fragmentação do DNA Citometria de Fluxo
1998 - SUGIMOTO M et al. (Cirurgia Geral + Cirurgia Cardíaca) [70]	Fas-L / Fas Aumento da Apoptose (PMN)	Microscopia por fluorescência
1998 - SAKAI Y et al. (Cirurgia Cardíaca) [71]	Supressão da Apoptose dos Neutrófilos Prolonga vida dos neutrófilos	Microscopia por fluorescência
2000 – KAWAHITO K et al. (Cirurgia Cardíaca) [72]	sFas – Reflete a gravidade da cirurgia	Sandwich ELISA
2000 - AEBERT H et al. (Cirurgia Cardíaca) [73]	Apoptose do endotélio vascular- 5,6 vezes maior	Microscopia por fluorescência e Contraste de fase.
2001 – VISHNU R et al. (Cirurgia Cardíaca) [74]	Supressão da Apoptose dos Neutrófilos Prolonga a vida dos neutrófilos Via Fas	Citometria de Fluxo
2002 – CHELLO M et al. (Cirurgia Cardíaca) [75]	Supressão da Apoptose dos Neutrófilos Prolonga vida dos neutrófilos Fas e FasL – Normal Atividade das Caspases - Reduzidas	Microscopia Optica anexina V
2002 – SCHMITT JP et al. (Cirurgia Cardíaca) [76]	Apoptose do Miócito Depressão da Contratilidade	Fragmentação do DNA Liberação do Citocromo c

Resumindo, dos estudos revisados sobre imunidade adquirida somente um, analisando pacientes de cirurgia geral mostrou uma indução da apoptose dos linfócitos T pela expressão do Fas/FasL na superfície celular e pela fragmentação do DNA. Todos os demais estudos relacionados com a apoptose e CEC estudaram a repercussão sobre a imunidade inata [68]. Até onde sabemos, não há estudo sobre apoptose e imunidade adquirida (linfócitos) em cirurgia cardíaca, utilizando a anexina V como expressão de apoptose.

A inter-relação da resposta imune e circulação extracorpórea

Estudos Clínicos da Imunidade Inata - Os efeitos da CEC, gerando uma resposta inflamatória exacerbada, foram inicialmente descritos por Kirklin em 1983, que atribuiu sua causa à exposição do sangue com a superfície não endotelial do circuito da CEC [5]. Foram descritas, a partir daí, a ativação da cascata da coagulação, do sistema caliceína, da fibrinólise, do complemento [77, 78] e das citocinas liberadas pelos monócitos, macrófagos e neutrófilos [16, 17, 44], provocando a adesão dos neutrófilos, ativação das células endoteliais e sua inibição por apoptose [75]. O processo se desencadeia por um aumento do complemento C3a, seguido por uma cascata de alterações dos complementos C4, C5a e C5b [79]. A resposta da imunidade inata inicial já é bem estabelecida, ocorrendo elevação das interleucinas (IL), principalmente: IL1, IL6, IL8 e TNF α (pró-inflamatórias) e IL-10 (antiinflamatória).

A imunidade adaptativa (específica) nos seus componentes humoral e celular também se altera, tanto em número, como em função na CC com CEC. Há uma diminuição dos linfócitos B e T, principalmente dos linfócitos Th e imunoglobulinas que seriam responsáveis pela morbidade e mortalidade pós-operatória, principalmente a infecção ou Disfunção de Múltiplos Órgãos (MODS) [80]. O grau da imunodepressão parece estar diretamente ligado ao porte e duração do ato cirúrgico e foi descrito em cirurgias não cardíacas, podendo ser extrapolado para a CC [81-83]. Há ainda evidências de que o tempo de cirurgia e da CEC estão correlacionados a uma maior incidência de infecção [84]. A

anestesia, aparentemente, não influencia na resposta imunológica, no tempo usual de duração da CC, em intensidade para provocar a SIRS [85- 88].

A depressão imunológica caracteriza-se por uma redução significativa das imunoglobulinas e do complemento [89, 90]. Os leucócitos diminuem no início da CEC e há um seqüestro nos tecidos após a sua ativação pelos complementos C3a e C5a. A suscetibilidade à infecção está também aumentada pelo comprometimento da capacidade quimiotática dos granulócitos [91- 93]. Da mesma forma, a hemodiluição também provoca um consumo aumentado do complemento e de todos os componentes da imunidade humoral [94]. Ocorre ainda uma diminuição do número e da função das células exterminadoras naturais [95, 96].

Portanto, a CEC deprime a resposta imunológica, deixando os pacientes mais suscetíveis a complicações com alta mortalidade [52, 53].

Estudos clínicos da imunidade adquirida

A ativação e proliferação da função linfocitária foi estudada, anteriormente, por métodos de análises *in vitro*, que avaliaram somente a fase tardia de sua ativação. Hoje, podemos estudar a fase precoce de ativação, devido aos avanços da imunologia atual. Inúmeros estudos foram publicados sobre o assunto e estão resumidos na Tabela 2, que compreende o autor, o ano da publicação, o método utilizado e as conclusões obtidas.

Tabela 2. Literatura sobre a influência da CEC na imunidade adquirida.

ANO/ AUTOR	RESULTADOS	MÉTODO
1971 - PARK KS et al. [82]	↓ Ativação Linfócitos	Phytohemagglutinin
1975 - CULLEN BF et al. [81]	↓ Linfócitos	Phytohemagglutinin
1978 - SALO M et al [86]	↓ Linfócitos T	Phytohemagglutinin, Concavalin A
1979 - RYHÄNEN P et al [95]	↓ Linfócitos T	Phytohemagglutinin, PWN
1981 - ROTH JA et al [59]	↓ Linfócitos T	Phytohemagglutinin, Concavalin A,
1981 - PETRI I et al. [97]	↓ Linfócitos ↓ Ativação Linfócitos	Phytohemagglutinin (Mitose)
1984 - ESKOLA J et al [87]	↓ Linfócitos T	Pokeweed
1985 - Van VELZEN BLAD et al. [89]	↓ Proliferação dos Linfócitos T	Phytohemagglutinin
1987 - BRODY JI et al. [57]	↓ Linfócitos T ↓ T helper (CD4) (1°)	Imunofluorescência
1989 - HISATOMI K et al. [98]	↓ Linfócitos T citotóxicos ↓ Linfócitos T Helper ↓ Linfócitos T (24 h)	Phytohemagglutinin.
1991 - DE PALMA L et al. [99]	↓ Linfócitos T ↓ Linfócitos B ↓ Linfócitos TC ↑ CD 25, HLA-DR	Citometria de Fluxo
1991 - SANTA URSULA TOLOSA JA et al. [100]	Leucocitose ↑ Neutrófilos ↓ Linfócitos	-
1992 - NGUYEN DM et al. [96]	↓ Linfócitos ↓ Função Linfócitos NK ↑ TC (CD8+) ↓ T helper ↓ Neutrófilos	Citometria de Fluxo
1993 - MARKEWITZ A et al. [53]	↑ Monócitos (IL 1 e IL 6) ↓ Linfócitos T (IL 2 e IL 6) ↓ IL 2	Microscopia Fluorescente
1993 - DE ANGELI S et al. [101]	↓ CD3 ↓ CD4 CD8 CD 8 + CD 57+	Citometria de Fluxo Concavalin A Phytohemagglutinin Microscópio Eletrônico
1997 - MISOPH M et al. [61]	↑ Leucócitos ↓ Linfócitos ↓ Linfócitos Tc ↓ Linfócitos B ↓ Linfócitos T helper CD69	Citometria de Fluxo Pela primeira vez usa CD 69
1998 - DIEGELER A et al. [102]	↓ Linfócitos ↓ Linfócitos T helper	Citometria de Fluxo
1998 - SHIMAOKA M et al. [62]	-Linfócitos CD4, CD8 PO até 7º dia ↑ CD 69 - CD4>CD8	Citometria de Fluxo
1998 - MISOPH M et al. [63]	-LT -CD71 -CD126	Citometria de Fluxo
2002 - BLACHER C et al. [105]	↓ Linfócitos T helper ↑ CD69	Citometria de Fluxo
2002 - SANO T et al. [103]	↓ Proliferação de LT ↓ CAA	CROSS REACTION SYSTEM PPD (antígeno derivado de proteína purificada)
2002 - ANKERSMIT HJ et al. [104]	-CD95 (TNF- α R1) -Apoptose	Citometria de Fluxo

Resumindo, esses estudos estabeleceram a repercussão da CEC sobre a imunidade adquirida. Ocorre uma alteração quantitativa dos linfócitos, levando a uma linfocitopenia dos linfócitos T e B, principalmente dos linfócitos Th e, qualitativamente, há uma diminuição da ativação e proliferação dos linfócitos T. Especula-se nos estudos mais recentes do final da década de 90 e início desta década, que a causa da linfopenia possa ser por apoptose [62, 104, 105].

O CD69 é um dos mais precoces antígenos de superfície celular, expresso pelas células T, depois de ativadas e pode ser detectado até uma hora da ligação da célula T e o complexo CD3. Este age como uma molécula co-estimuladora de ativação e proliferação e tem sido usado para esclarecer a função linfocitária na sua fase mais precoce [60].

O estudo de Shimaoka [62] foi dos primeiros a demonstrar a ativação dos linfócitos T, utilizando o CD69. Foram estudados oito pacientes com neoplasia de esôfago e seis com patologias cardíacas, mostrando uma ativação precoce dos linfócitos, principalmente dos linfócitos Th (CD4+). Este achado foi contrário a estudos anteriores que demonstravam uma diminuição da ativação dos linfócitos T. A discrepância entre os dados da literatura seria devida ao método utilizado, que seria mais precoce, e porque o CD69 precede a proliferação dos linfócitos, não refletindo os achados com o método que avalia a síntese do DNA, utilizado anteriormente. Outra informação importante é que a expressão do CD69 seria um precursor de apoptose, pois apresenta este comportamento em áreas como auto-imunidade, imunodeficiência e choque séptico. Na revisão realizada, a principal especulação foi a de que a ativação pelo CD69 induz a apoptose o que explicaria a linfopenia pós-operatória, sugerindo que estudos posteriores utilizem um painel de

marcadores com a medida da expressão do receptor Fas/FasL que seria uma das vias de indução de apoptose.

Os resultados de um ensaio clínico randomizado realizado em vinte e oito pacientes, comparando a RM com CEC e sem CEC, mostraram, usando o marcador de superfície de ativação CD69, que não há diferença na resposta imuno-inflamatória entre as duas técnicas cirúrgicas quanto à ativação dos mesmos, considerando o percentual dos linfócitos T (CD3+). Esse estudo conclui que aquelas alterações independem do uso da CEC. No entanto, analisando a resposta dos marcadores ao trauma cirúrgico, reunindo os dois grupos, foi demonstrado um comportamento distinto entre os linfócitos B (CD19+) e T (CD3+). Há evidência de ativação precoce de linfócitos T (CD3+), demonstrada pela elevação percentual de ativação do CD69, que se inicia logo após a indução anestésica e ascende até o fim das anastomoses (ou saída de perfusão) [105]. Esse comportamento sugere existir uma ativação linfocitária inicial, relacionada ao comprometimento imunológico existente após as grandes cirurgias, e que poderia estar relacionada a um processo ativo, possivelmente apoptose. Essa hipótese é também especulada por outros autores [68, 70]. Outros estudos recentes, também analisando a imunidade celular constataam a linfopenia pós-operatória, mas não esclarecem sua causa [61].

Markewitz e colaboradores, em ampla revisão sobre a interação da CEC com a imunidade adquirida, indicam serem necessárias mais informações sobre como reage a resposta imune, efetora e reguladora, a estímulos antigênicos. Isso permitiria o desenvolvimento de estratégias para tratamento das alterações do sistema imune. Estes autores recomendam para esse propósito que seja utilizado, especificamente, a anexina V, como marcador de apoptose [80].

Conclusões

1. As alterações provocadas pela CEC na imunidade inata e adquirida são complexas e sua fisiopatologia ainda não é bem compreendida, mas é crescente o número de pesquisas para o seu esclarecimento, prevenção e tratamento.
2. Tentativas de se atenuar a resposta imunoinflamatória através de processos ou fármacos que modifiquem sua ativação, vêm sendo testadas, mas com benefícios parciais.
3. A linfopenia pós CEC pode ser causada por um processo ativo, precoce, no qual o CD69 teria participação na indução de apoptose dos linfócitos.
4. A pesquisa da indução de apoptose dos linfócitos T no pós-operatório de CC, através da expressão da anexina V, poderia contribuir para o melhor conhecimento da sua fisiopatologia.

REFERÊNCIAS

1. Dennis C, Spreng DS Jr, Nelson GE, et al. Development of a pump-oxygenator to replace the heart and lungs: an apparatus applicable to human patients and application to one case. *Ann Surg* 1951;134:709-21.
2. Gibbon JH Jr,. Development of the artificial heart and lung extracorporeal blood circuit. *JAMA* 1968;206:1983-6.
3. Lillehei CW, DeWall RA, Read RC, et al. Direct vision intracardiac surgery in man using a simple, disposable artificial oxygenator. *Dis Chest* 1956;29:1-8.
4. Jones RE, Donald DE, Swan HJC, et al. Apparatus of the Gibbon type for mechanical bypass of the heart and lungs. *Proc Mayo Clin* 1955;30:105-13.
5. Kirklin JK, Westaby S, Blakstone EH, et al. Complement and the damaging effect of cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1983;86:845-57.
6. Westaby S. Organ dysfunction after cardiopulmonary bypass: a systemic inflammatory reaction by the extracorporeal circuit. *Intensive Care Med* 1987;13:89-95.
7. Jansen NJ, Oeveren W, Gu YJ, et al. Endotoxin release and tumor necrosis factor formation during cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1992;54:744-8.

8. Bartlett RH, Harken DE. Instrumentation for cardiopulmonary bypass-past, present, and future. *Med Instrum* 1976;10:119-24.
9. Sade RM, Bartles DM, Dearing JP, et al. A prospective randomized study of membrane and bubble oxygenators in children. *Ann Thorac Surg* 1980;29:502-11.
10. Lillehehei CW. Historical development of cardiopulmonary bypass in Minnesota. In Gravlee GP et al ed. *Cardiopulmonary bypass*. 2.ed. Philadelphia, Pa: Lippincott, 2000: 3-21.
11. Kirklin JW, Dushane JW, Patrick RT, et al. Intracardiac surgery with the aid of a mechanical pump oxygenator system (Gibbon type): report of eight cases. *Proc Mayo Clin* 1955;30:201-6.
12. Kirklin JW, Mcgoon DC, Patrick RT, et al. What is adequate perfusion? In: Allen JG, ed. *Extracorporeal circulation*. Springfield, Il: C.C. Thomas, 1958:125-38.
13. DeWall RA; Warden HE; Gott V. et al. Total body perfusion for open cardiomy utilizing the bubble oxygenator. *J Thorac Surg* 1956;32:591-603.
14. DeWall RA, Warden HE, Read RC, et al. A simple, expendable, artificial oxygenator for open heart surgery .. *Surg Clin North Am* 1956:1025-34.

15. Hodges PC, Sellers RD, Story JL, et al. The effects of total cardiopulmonary bypass procedures upon cerebral function evaluated by the electroencephalogram and a blood brain barrier test. In Allen J ed. Extracorporeal circulation. Springfield, Il: C.C. Thomas, 1958:279-94.
16. Hall RI, Smith MS, Rucker G. The systemic inflammatory response to cardiopulmonary bypass: pathophysiological, therapeutic, and pharmacological considerations. *Anesth Analg* 1997;85:766-82.
17. Hornick P, Taylor KM. Immune and inflammatory responses after cardiopulmonary bypass. In Gravlee GP, et al, ed. *Cardiopulmonary bypass: principles and practice*. 2.ed. Philadelphia, Pa.: Lippincott, 2000:303-19.
18. De Vroege, Wagemakers M, Te Velthuis, et al. Comparação de três oxigenadores de membrana (hollow fiber) disponíveis comercialmente: performance da transferência de gás e biocompatibilidade. *Asaio* 2001;47:34-44.
19. Brasil LA, Gomes WJ, Salomão R, Fonseca JHP, Branco JNR, Buffolo E. Uso de corticóide como inibidor da resposta inflamatória sistêmica induzida pela circulação extracorpórea. *R Bras Cir Cardiovasc* 1999;14:254-68.

20. Pearl JM, Nelson DP, Schwartz SM, et al. Glucocorticoids reduce ischemia-reperfusion-induced myocardial apoptosis in immature hearts . *Ann Thorac Surg* 2002;74:830-7.
21. Buffolo E, Andrade JCS, Branco JNR , Teles CA, Aguiar LF, Gomes, WJ. Coronary artery bypass grafting without cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1996; 61:63-6.
22. Wan S, Izzat MB, Lee TW, Wan IYP, Tang NLS, Yim APC. Avoiding cardiopulmonary bypass in multivessel CABG reduces cytokine response and myocardial injury. *Ann Thorac Surg* 1999;68:52-7.
23. Fransen E, Maessen J, Dentener M, Senden N, Geskes G, Buurman W. Systemic inflammation present in patients undergoing CABG without extracorporeal circulation. *Chest* 1998;113:1290-5.
24. Czerny M, Baumer H, Kilo J, et al. Inflammatory response and myocardial injury following coronary artery bypass grafting with or without cardiopulmonary bypass. *Eur J Cardio-thorac Surg* 2000;17:737-42.
25. Rumalla V, Calvano SE, Spotnitz AJ, Krause T, Lin E; Lowry E. The effects of glucocorticoid therapy on inflammatory responses to coronary artery bypass graft surgery. *Arch Surg* 2001;136:1039-44.

26. Ascione R, Lloyd CT, Underwood, MJ, Lotto AA, Pitsis AA, Angelini GD. Inflammatory response after coronary revascularization with or without cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 2000;69:1198-1204.
27. Matata BM, Sosnowski AW, Galiñanes M. Off-pump bypass graft operation significantly reduces oxidative stress and inflammation. *Ann Thorac Surg* 2000;69:785-91.
28. Butler J, Chong GL, Baigrie RJ, Pillai R, Westaby S, Rocker GM. Cytokine responses to cardiopulmonary bypass with membrane and bubble oxygenation. *Ann Thorac Surg* 1992;53:833-8.
29. Moen O, Hogasen K, Fosse E, et al. Attenuation of changes in leukocyte surface markers and complement activation with heparin-coated cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1997;63:105-11.
30. Videm V, Mollnes, TE, Fosse E, et al. Heparin-coated cardiopulmonary bypass equipment. I. Biocompatibility markers and development of complications in a high - risk population. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999;117:794-80.
31. Richter JA, Meisner H, Tassani P, Barankay A, Dietrich W, Braun SL. Drew-Anderson technique attenuates systemic inflammatory response syndrome and improves

- respiratory function after coronary artery bypass grafting. *Ann Thorac Surg* 1999;69:77-83.
32. Moraes D.J, Moraes MCJ, Dias JRJ, et al. Uso de oxigênio puro e shunt veno-arterial nos oxigenadores de membrana. *R Bras Cir Cardiovasc* 1997;12:77-82.
33. Gu YJ, Oeveren W, Akkerman C, Boonstra PW, Huyzen RJ, Wildevuur CRH. Heparin-coated circuits reduce the inflammatory response to cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1993;55:917-22.
34. Steinberg BM, Grossi EA, Schwartz DS, et al. Heparin bonding of bypass circuits reduces cytokine release during cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1995; 60:525-9.
35. Wendel HP, Ziemer G. Coating-techniques to improve the hemocompatibility of artificial devices used for extracorporeal circulation. *Eur J Cardio-thorac Surg* 1999; 16:342-50.
36. Mullen JC, Bentley MJ, Gelfand ET, et al. Coronary artery bypass surgery with heparin-coated perfusion circuits and low-dose heparinization. *J Can Chir* 2002;45: 166-72.

37. Moraes M, Dias J, Moraes Z, Novaes M, Holanda N, Junqueira D. Perfusion for cardiac surgery using venous arterial shunt and pure oxygen in membrane oxygenators; forty to fifty per cent of the venous blood recirculate and do not pass through the oxygenator. In World Congress of Cardiology, 12., Rio de Janeiro, 1998:1113-8.
38. Shimamoto A, Kanemitsu S, Fujinaga K, et al. Biocompatibility of silicone-coated oxygenator in cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 2000;69:115-20.
39. 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.
40. Tabardel Y, Duchateau J, Schmartz D, et al. Corticosteroids increase blood interleukin-10 levels during cardiopulmonary bypass in men. *Surgery* 1996;119:76-80.
41. Mayumi H, Zhang Qui-W, Nakashima A, et al. Synergistic immunosuppression caused by high-dose methylprednisolone and cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1997;63:129-37.
42. Hill GE, Alonso A, Spurze, JR, et al. Aprotinin and methylprednisolone equally blunt cardiopulmonary bypass-induced inflammation in humans. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995;110:1658-62.

43. Bone RC, Balk RA, Cerra FB et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest* 1992;101:1644-55.
44. Savaris N, Polanczyk C, Clausell N. Cytokines and troponin-I in cardiac dysfunction after coronary artery grafting with cardiopulmonary bypass. *Arq. Bras. Cardiol* 2001;77:114-9.
45. Strüber M, Cremer J, Gohrbandt B et al. Human cytokine responses to coronary artery bypass grafting with and without cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1999;68:1330-5.
46. Riddington DW, Venkatesh B, Boivin CM et al. Intestinal permeability, gastric intramucosal pH, and systemic endotoxemia in patients undergoing cardiopulmonary bypass. *JAMA* 1996;275:1007-12.
47. Roitt I, Brostoff J, Male D. *Imunologia*. São Paulo:Ed.Manole, 1999: 1-9, 13-30.
48. Butler J, Rocker GM, Westaby S. Inflammatory response to cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1993;55:552-9.
49. Steinberg JB, Kapelanski DP, Olson JD, Weiler JM. Cytokine and complement levels in patients undergoing cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993; 106:1008-16.

50. Brasil LA, Gomes WJ, Salomão R, Buffolo E. Inflammatory response after myocardial revascularization with or without cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1998;66:56-9.
51. Defraigne JO, Pincemail J, Larbuisson R, Blaffart F, Limet R. Cytokine release and neutrophil activation are not prevented by heparin-coated circuits and aprotinin administration. *Ann Thorac Surg* 2000;69:1084-91.
52. Markewitz A, Faist E, Lang S, et al. Successful restoration of cell mediated immune response after cardiopulmonary bypass by immunomodulation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993;105:15-24.
53. Markewitz A, Faist E, Weinhold C, Lang S, Endres S, Hültner L, Reichart B. Alterations of cell-mediated immune response following cardiac surgery. *Eur J Cardiothorac Surg* 1993;7:193-9.
54. Abbas A, Lichtman AH, Pober J. *Cellular and molecular immunology*. 4th.ed. Philadelphia: W.B.Saunders, 2000:20.
55. Bertho AL, Santiago MA, Coutinho SG. Flow cytometry in the study of cell death. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000;95:429-33.

56. Nguyen D, Mulder , Schennib H. Effect of cardiopulmonary surgery bypass on circulating lymphocyte function. *Ann Thorac Surg* 1992;53:611-6.
57. Brody JI, Pickering NJ, Fink GB; Behr E. Altered lymphocyte subsets during cardiopulmonary bypass. *Amer J Clin Pathol* 1987; 87:626-8.
58. Ide H, Kakiuchi T, Furuta N, et al. The effect of cardiopulmonary bypass on T cells and their subpopulations. *Ann Thorac Surg* 1987; 44:277-82.
59. Roth JA, Golub SH, Cukingnam, RA, Brazier J, Morton DL. Cell-mediated immunity is depressed following cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1981; 31:350-6.
60. Ziegler SF, Ramsdell F, Alderson MR. The activation antigen CD69. *Stem Cell* 1994; 12:456-65.
61. Misoph M, Babin-Ebell J, Schwender W, Grossmann R, Keller F, Elert O. Response of the cellular immune system to cardiopulmonary bypass in vivo. *Thorac Cardiovasc Surgeon* 1997;47: 217-23.
62. Shimaoka M, Hosotsubo K, Sugimoto M , Sakaue G, Taenaka N, Yoshya I. The influence of surgical stress on T- cells: enhancement of early phase lymphocyte activation. *Anesth Anal* 1998;87:1431-5.

63. Misoph M, Schwender W, Babin-Ebell J. Response of the cellular immune system to cardiopulmonary bypass is independent of the applied pump type and the use of heparin-coated surfaces. *Thorac Cardiovasc Surg* 1998;46:222-7.
64. Shouan Y, Feng X, O'Connell PJ. Apoptosis detection by annexin V binding: a novel method for the quantitation of cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol Methods* 1998;217:61-70.
65. Willie A, Donahue V, Fischer B, Hill D, Keeseey J, Mansow S. Apoptosis and cell proliferation. 2.ed. Mannheim: Boehringer, 1998.
66. Sun EW, Shi YF. Apoptosis: the quiet death silences the immune system. *Pharmacol and Therap* 2001;92:135-45.
67. Lecoeur H, Ledru E, Prévost MC, Gougeon ML. Strategies for phenotyping apoptotic peripheral human lymphocytes comparing ISNT, annexin-V and 7-AAD cytofluorometric staining methods. *J Immunol Meth* 1997;209:111-23.
68. Oka M, Hirazawa K, Yamamoto K, et al. Induction of Fas-mediated apoptosis on circulating lymphocytes by surgical stress. *Ann Surg* 1996;223:434-40.

69. Kettritz R, Gaido ML, Haller H, et al. Interleukin-8 delays spontaneous and tumor necrosis factor-[alpha]-mediated apoptosis of human neutrophils. *Kidney Int* 1998;53:84-91.
70. Sugimoto M, Shimaoka M, Hosotsubo K, et al. Up-regulation of Fas ligand (FasL) mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) after major surgery. *Clin Exp Immunol* 1998;112:120-5.
71. Sakai Y, Watanabe T. Inflammatory response during cardiopulmonary bypass: neutrophil apoptosis. *Kyobu Geka* 1998;51:1024-26.
72. Kawahito K, Misawa Y, Fuse K. Transient rise in serum soluble Fas (APO-1/CD95) in patients undergoing cardiac surgery. *Artif Organs* 2000;24:628-31.
73. Aebert H, Kirchner S, Keyser A, Birnbaum DE, Holler E, Andreesen R. Endothelial apoptosis is induced by serum of patients after cardiopulmonary bypass. *Eur J Cardio-Thorac Surg* 2000;18:589-93.
74. Rumalla V, Calvano SE, Spotnitz AJ, Krause T, Lin E; Lowry E. The effects of glucocorticoid therapy on inflammatory responses to coronary artery bypass graft surgery. *Arch Surg* 2001;136:1039-44.

75. Chello M, Mastroroberto P, Quirino A, Cuda G, Perticone F, Cirillo, Covino E. Inhibition of neutrophil apoptosis after coronary bypass operation with cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 2002;73:123-30.
76. Schmitt JP, Schröder, J, Schunkert, H, Birnbaum DE, Aebert H. Role of apoptosis in myocardial stunning after open heart surgery. *Ann Thorac Surg* 2002;73:1229-35.
77. Menasché P. The inflammatory response to cardiopulmonary bypass and its impact on postoperative myocardial function. *Curr Opinion Cardiol* 1995;10:597-604.
78. Royston D. The inflammatory response and extracorporeal circulation. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 1997;11:341-54.
79. Wachtfogel YT, Harpel PC, Edmunds LH, Colman RW. Formation of C1s-C1-inhibitor, kallikrein-C1-inhibitor and plasmin-alpha 2-plasmin inhibitor complexes during cardiopulmonary bypass. *Blood* 1989;73:468-71.
80. Markewitz, A, Lante W, Franke A, Marchi K, Kuhlmann WD, Weinhold C. Alterations of cell-mediated immunity following cardiac operations: clinical implications and open questions. *Shock* 2001;16:(Suppl.1)10-5.
81. Cullen B, Belle G. Lymphocyte transformation and changes in leukocyte count: effects of anesthesia and operation. *Anesthesiol* 1975;43:563-7.

82. Park SK, Brady JI, Wallace HA, Blakemore WS. Immuno-suppressive effect of surgery. *Lancet* 1971;1:53-7.
83. Roth J, Golub S, Grimm E, et al. Effect of surgery on in vitro lymphocyte function. *Surg Forum* 1974; 25:102-6.
84. Loop F, Lytle B, Cosgrove D, et al. Sternal wound complications after isolated coronary artery bypass grafting: early and late mortality, morbidity and cost of care. *Ann Thorac Surg* 1990;49:179-87.
85. Lee YTN. Effect of anesthesia and surgery on immunity. *J Surg Onc* 1977;9:425-30.
86. Salo M, Seppi E, Lassila O, et al. Effect of anaesthesia and open heart surgery on lymphocyte responses to phytohemagglutinin and concavalin A. *Acta Anaesth Scand* 1978;22:471-5.
87. Eskola J, Salo M, Vilijanen K, Ruuskanen O, et al. Impaired B lymphocyte function during open heart surgery. *Br J Anaesth* 1984; 56:333-7.
88. Brix-Christensen V, Tonnesen E, Sorensen I, Bilfinger TV, Sanchez RG, Stefano GB. Effects of anaesthesia based on high versus low doses of opioids on the cytokine and

- acute-phase protein responses in patients undergoing cardiac surgery. *Acta Anaesth Scand* 1998;42:63-70.
89. Velzen-Blad H, Dijkstra YJ, Heijnen CJ, Schurink GA, Zegers BJM, Ballieux RE. Cardiopulmonary bypass and host defense functions in human beings: II. lymphocyte function. *Ann Thorac Surg* 1985;39:212-7.
90. Hammerschmidt D, Streck D, Bowers T, et al. Complement activation and neutropenia occurring during cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1981;81:370-7.
91. Bubenink O, Meakins, J. Neutrophil chemotaxis in surgical patients: effect of cardiopulmonary bypass. *Surg Forum* 1976;27:267-9.
92. Boonstra PW, Vermeulen FE, Leusink JA, et al. Hematological advantage of a membrane oxygenator over a bubble oxygenator in long perfusion. *Ann Thorac Surg* 1986;41:297-300.
93. Burrows F, Steele R, Marmer D, et al. Influence of operations with cardiopulmonary bypass on polymorphonuclear leukocyte function in infants. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1987;93:253-60.

94. Kress HG, Gehrsitz P, Elert O. Predictive value of skin test in neutrophil migration and C-reactive protein for post-operative infections in cardiopulmonary bypass patients. *Acta Anaesth Scand* 1987;31:397-404.
95. Ryhaenem P, Huttunem K, Llonem J. Natural killer cell activity after open heart surgery. *Acta Anaesth Scand* 1984;28:490-2.
96. Nguyen D, Mulder D, Shennib H. Effect of cardiopulmonary surgery bypass on circulating lymphocyte function. *Ann Thorac Surg* 1992;53:611-6.
97. Petri I, Kaiser G, Gaál, T, Kovács G, Petri G. Cellular immune response after heart operations. *Acta Chirurg Acad Scient Hung* 1981; 22:29-36.
98. Hisatomi K, Kobaiashi A, Moriyama Y, et al. Combined suppressive effect of cardiopulmonary bypass and aging on cell mediated immunity. *J.Thorac Cardiovasc Surg* 1997;114:140-1.
99. DePalma, L, Yu M, Mcintosh CL, Swain JA, Davey RJ. Changes in lymphocyte subpopulations as a result of cardiopulmonary bypass: the effect of cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1991;101:240-4.

100. Santa Ursula Tolosa JA, Criado A.; Garcia Del Valle S, Pensado A, Barbolla A, Carmona Auriol JA. Changes in total and differential leukocyte counts during heart surgery with extracorporeal circulation. *Rev Esp Anestesiol Reanim* 1991; 38:94-7.
101. De Angeli S, Paccagnella A, Mordacchini M, et al. The effects of prolonged cardiopulmonary bypass on cell-mediated immunity. *Thorac Cardiovasc Surgeon* 1994;42: 14-20.
102. Diegeler A, Doll N, Rauch T, et al. Humoral immune response during coronary artery bypass grafting: a comparison of limited approach, "off-pump" technique, and conventional cardiopulmonary bypass. *Circulation* 2000; 102(Suppl.3):95-100.
103. Sano T, Morita S, Tominaga R, Masuda M, Tomita Y, Yasutsune T, Yasui H. Adaptive immunity is severely impaired by open heart surgery. *Jp J Thorac Cardiovasc Surg* 2002;50:201-5.
104. Ankersmit HJ, Wieselthaler G, Moser B, Gerlitz S, Roth G, Boltz-Nitulescu G, Wolner E. Transitory immunologic response after implantation of the DeBakey VAD continuous-axial-flow pump. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002;123:557-61.
105. Blacher C, Neumann J, Marques ME et al. Cirurgia de revascularização miocárdica sem circulação extracorpórea não reduz a ativação linfocitária. In Congresso da

Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul, 13, 2002, Gramado. Programa final.

Porto Alegre: SCRGS, 2002:34.

ARTIGO EM PORTUGUÊS

**Ativação e Apoptose Linfocitária:
Análise Comparativa entre dois Tipos de Oxigenadores (Convencional e
com Curto-Circuito Veno-Arterial) em Cirurgia de Revascularização
Miocárdica com Circulação Extracorpórea**

Paulo Ernesto Leães e Nadine Clausell

**Serviço de Cardiologia do Hospital São Francisco e
Programa de Pós-Graduação em Cardiologia e Ciências Cardiovasculares
da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil**

RESUMO

Introdução

A cirurgia cardíaca (CC) com circulação extracorpórea (CEC) induz uma resposta imune. Oxigenadores com novas tecnologias propõem-se a atenuar essa resposta. Por outro lado, diversos estudos especulam que a linfopenia pós-CEC poderia ser provocada por apoptose. O presente trabalho avaliou o efeito da CEC na resposta imune adquirida, comparando os efeitos de um oxigenador convencional (OxC) e um oxigenador com curto-circuito venoarterial (OxCCVA) sobre a ativação e indução de apoptose precoce dos linfócitos e sua implicação na linfopenia pós-operatória.

Pacientes e métodos

Foram colhidas amostras seriadas de sangue, para análise por citometria de fluxo, na indução anestésica e início, término, 6, 12 e 24 horas após-CEC em pacientes submetidos à cirurgia de revascularização miocárdica (CRM), randomizados para utilizarem OxC ou OxCCVA. Avaliou-se a expressão de marcadores de superfície de linfócitos (CD3, CD25, CD26, CD69) e de apoptose (anexina V).

Resultados

Dos vinte pacientes estudados ($58 \pm 8,7$ anos), dez utilizaram OxC e dez, OxCCVA. Foram semelhantes, o aumento da expressão do CD69 ($P=0,055$) e a queda da expressão da anexina V ($P=0,271$) dos linfócitos. Houve alterações significativas entre os diversos pontos no tempo, da linfopenia ($P<0,001$), da redução da expressão do CD3+ ($P<0,001$) e da anexina V ($P<0,004$) e do aumento da expressão do CD69+ ($P<0,001$).

Conclusões

A resposta imune adquirida, caracterizada pela ativação precoce (expressão de CD69) e pela apoptose (expressão de anexina V) dos linfócitos, parece não ser influenciada pelos tipos de oxigenadores estudados. A linfopenia observada não parece ser secundária a apoptose.

Palavras Chave: Apoptose, linfócitos, oxigenadores, circulação extracorpórea.

INTRODUÇÃO

A CC com CEC desencadeia uma resposta imunoinflamatória, provavelmente pelo contato do sangue com sua superfície não endotelial ou, por lesões de isquemia/reperfusão e de endotoxinas ou pelo trauma cirúrgico. Esta resposta é conhecida como Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS), responsável por complicações no período pós-operatório[1-11]. Desde o início da CC, a CEC foi considerada o principal fator desencadeante desse processo. Estudos recentes, no entanto, demonstram que a resposta imunoinflamatória ocorre também na CC sem CEC mas com menor intensidade [12-15]. Essa resposta na CC sem CEC pode estar ausente, como na produção de interleucinas específicas, por exemplo, o fator de necrose tumoral α , ou pode ser parcialmente controlada na CC com CEC com o uso de fármacos [8, 44], diminuindo as complicações pós-operatórias [16], mas conclui-se que o estresse cirúrgico, também participa do seu desencadeamento. O processo inflamatório inicial se caracteriza pela ativação de diferentes cascatas bioquímicas como a da coagulação, da caliceína, da fibrinólise e do complemento [17-19], seguindo-se uma resposta imune inata pelos granulócitos e adquirida, através da ativação dos linfócitos [20-22]. A essa ativação e resposta atribui-se uma das principais causas da morbidade e mortalidade da RM no pós-operatório, principalmente de natureza infecciosa [23]. O conhecimento ainda incompleto do processo fisiopatológico da SIRS nesse contexto dificulta o desenvolvimento de tratamento adequado para seu controle.

Novas tecnologias têm surgido com o objetivo de minimizar as complicações decorrentes da CEC [24-26]. Um oxigenador de membrana com menor área de contato

com o sangue, reduzido volume inicial e com um curto-circuito veno-arterial propiciaria um menor tempo de exposição total do sangue com a superfície não endotelial, mas os estudos com esses oxigenadores, até o momento descritos na literatura, não avaliaram sua capacidade de influenciar a resposta imune [27].

Outra hipótese sugere que a ativação dos linfócitos pelo estresse cirúrgico, parece provocar uma linfopenia pós-operatória [21, 22]. Essa linfopenia poderia ser uma resposta protetora do sistema imunológico, evitando uma exacerbação desnecessária da resposta inflamatória temporária inicial, porém seu mecanismo ainda não está esclarecido. A apoptose ou a necrose são hipóteses sugeridas e ainda não testadas para explicar esse fenômeno [28; 29].

O objetivo do presente estudo foi analisar a resposta imune nas primeiras 24 h pós-CEC, através da ativação e desenvolvimento de apoptose dos linfócitos em pacientes submetidos à CRM com CEC, comparando um OxC a um OxCCVA e a participação da apoptose na linfopenia pós-operatória.

PACIENTES E MÉTODOS

Amostra estudada

Todos os pacientes com indicação de revascularização cirúrgica do miocárdio no Hospital São Francisco de Cardiologia, de março de 2002 a outubro de 2002, foram considerados para participar neste ensaio clínico randomizado comparando dois tipos de oxigenadores durante a CEC. Foram excluídos os pacientes com: idade maior de 70 anos, cirurgia prévia com CEC, história de infarto agudo do miocárdio há menos de dois meses ou procedimento cardíaco concomitante (troca de válvula, correção de defeitos congênitos, etc.). Também não foram excluídos, portadores de insuficiência renal definida como creatinina sérica maior que 2 mg%, portadores de síndrome de imunodeficiência adquirida, corticoterapia crônica ou perioperatória, fração de ejeção menor que 40%, infecção ativa, angina instável, insuficiência cardíaca classe III e IV da NYHA. No pós-operatório foram critérios de exclusão: reoperação durante o período do estudo (primeiras 24 horas), infarto do miocárdio, sinais de baixo débito cardíaco com oligoanúria e arritmias que necessitassem de cardioversão elétrica nas 24 horas de pós-operatório. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética da instituição e os pacientes elegíveis assinaram termo de consentimento livre e esclarecido, previamente à inclusão no protocolo de pesquisa.

Logística do estudo e desfechos estudados

Dez minutos após a indução anestésica, foi realizada a primeira colheita de sangue para dosagem dos marcadores de interesse (amostra zero). Colheitas posteriores foram realizadas nos seguintes momentos: 10 minutos após a instalação da CEC, no seu término e 6, 12 e 24 horas após. Os desfechos principais deste estudo foram marcadores de ativação e de apoptose expressos em linfócitos.

Técnica anestésica e cuidados trans-operatórios

Os pacientes receberam lorazepan VO na dose de 0,02-0,04 mg/kg na noite anterior à cirurgia e 90 minutos antes da indução anestésica. Previamente a esta, foram puncionadas sob anestesia local com lidocaina a 1%, uma veia periférica (Insyte 16) e a artéria radial esquerda (Insyte 18). A monitorização trans-operatória constou de: 1) Medida contínua e invasiva das pressões intra-arteriais; 2) Eletrocardiograma nas derivações DII e V5 com análise contínua de ST em 7 derivações; 3) Pressões arteriais e capilar pulmonar além da PVC (cateter de Swan-Ganz posicionado através da veia jugular interna direita após a indução anestésica); 4) Fração expirada de CO₂; 5) Fração inspirada de O₂; 6) Oximetria de pulso; 7) Análise dos gases ins e expirados; 8) Temperatura nasal e do polegar. Estes parâmetros foram medidos pelo Sistema de Monitorização Multiparamétrico Marquette Modelo Solar 8000; 9) Diurese horária; 10) Análise laboratorial periódica dos gases arteriais, eletrólitos, hematócrito, hemoglobina e glicemia.

A indução anestésica foi realizada com midazolam (50-100 µg/kg) e propofol 1 a 2 mg/kg e o relaxamento muscular produzido por brometo de pancurônio (0,008 mg/kg). A ventilação mecânica foi conduzida com volume corrente de 10 a 12 ml/kg, frequência respiratória de 11-12 mpm, posteriormente alterada segundo resultados de amostras de gases arteriais e fração inspiratória de oxigênio (FiO₂) de 30%. A manutenção da anestesia foi realizada com infusão contínua de midazolam (0,5 a 2 µg/kg/min) e fentanil (0,04 a 0,16 µg/kg/min). Doses adicionais de midazolam (1 a 3 mg) e/ou fentanil (50 a 200 µg) foram administradas na incisão da pele, na esternotomia, no manuseio da aorta ou sempre que era suspeitada superficialização da anestesia. Após terminada a CEC, eram usadas as menores doses de infusão de ambas as drogas. A nenhum dos pacientes foram administradas drogas com ações sobre a resposta inflamatória descritas na literatura (aprotinina, ácido tranexâmico, ácido epsilon aminocapróico, anti-inflamatórios não esteróides ou qualquer glicocorticoide).

A heparinização foi feita na dose de 5 mg/kg de heparina bovina não fracionada e a sua neutralização com sulfato de protamina na relação de 1 mg por 1 mg. A monitorização do efeito da heparina e da efetividade da sua posterior neutralização foi realizada pela medida do Tempo de Coagulação Ativada (TCA) pelo sistema Hemochron Jr. O TCA foi mantido em níveis superiores a 480 segundos após a heparinização. Nos períodos pré e pós perfusão, a pressão arterial sistólica foi mantida em valores os mais próximos possíveis de 100 a 120 mmHg com auxílio de drogas vasodilatadoras (nitroglicerina e/ou nitroprussiato de sódio) ou vasopressora (noradrenalina) em infusões contínuas, associada a ajustes no plano anestésico, conforme citado acima. A frequência cardíaca foi mantida entre 60 e 80 bpm com betabloqueador (metoprolol) ou marcapasso, sempre que possível, com

estimulador atrial. A isquemia miocárdica, suspeitada através da análise contínua do segmento de ST, pelo surgimento de arritmias persistentes associadas à manipulação do coração ou pela perda regional da contratilidade, foi tratada pela eliminação dos fatores etiológicos envolvidos (taquicardia, modificações da pré e pós carga) e nitroglicerina. As quedas do débito cardíaco foram tratadas de acordo com a análise dos seus determinantes (pré-carga, resistência vascular periférica ou pulmonar, frequência cardíaca, ritmo e contratilidade). Foi utilizada para este fim a infusão de dopamina (2 a 5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$). A reposição hídrica foi realizada com solução fisiológica, em volume suficiente para, ao fim da cirurgia, somando-se os volumes contidos no circuito de circulação extracorpórea, totalmente devolvidos ao paciente, fossem atingidos cerca de 7 ml/kg/h. A reposição do sangue perdido foi realizada com concentrado de hemácias, sempre que o hematócrito fosse menor que 25%, a hemoglobina menor que 8%, ou houvessem evidências clínicas ou hemodinâmicas de hipovolemia com comprometimento circulatório.

Circulação extracorpórea

Os seguintes equipamentos foram utilizados para o estabelecimento da CEC: oxigenador de membrana adulto convencional sem curto-circuito e outro com curto-circuito veno-arterial (DMG-Equipamentos Médicos Ltda), ambos com membrana de polipropileno máquina de CEC Sarns 8000 com bomba de roletes e misturador Sechrist[®] de gases. A porção arterial do circuito da CEC era composta por tubos de PVC de 3/8 com aproximadamente 1,5m de comprimento (DMG – Equipamentos Médicos Ltda) e

interposição de filtro “cata bolhas” de 40 micra. Na porção venosa, foram utilizados tubo de PVC de ½ polegada e 1,5 m de comprimento. Utilizaram-se três aspiradores de campo, compostos de linhas de PVC de ¼ de polegada por 2 m de comprimento, rolete arterial de ½ polegada e reservatório venoso de até 4 litros. O sistema de cardioplegia constou de reservatório rígido de 1000 ml com tubos de PVC de ¼ de polegada. Para as modificações de temperatura, foram utilizados termo permutador, incluído no corpo do oxigenador, e água circulante pela bomba termo permutadora SARNS 8000. Além da monitorização usualmente empregada em qualquer perfusão extracorpórea: pressão arterial média, volume inicial, temperatura nasal e periférica, saturação venosa de oxigênio (SvO_2), diurese, etc, foram monitoradas as saturações arterial e venosa da hemoglobina em Oxigênio e a própria concentração de hemoglobina, de maneira contínua, através de sensores específicos interpostos nas porções arterial e venosa do circuito. No OxCCVA também foi interposto um medidor contínuo de fluxo sanguíneo. O enchimento do sistema extracorpóreo foi realizado com solução de ringer com lactato, num volume de 1750 ml. A adição de concentrado de hemácias ao volume de enchimento ou, posteriormente, durante a própria perfusão extracorpórea, obedeceu à necessidade de manutenção de hematócrito não inferior a 25% ou hemoglobina menor que 8 g%. A perfusão foi realizada com fluxo arterial de 2,4 l/min/m² para temperaturas nasais superiores a 32 ° C e 2,0 l/min/m² para temperaturas entre 32 e 28 ° C. Nos pacientes pertencentes ao grupo em que foi utilizado o CCVA, após a estabilização da perfusão, o clamp regulador era aberto permitindo então que uma porção do retorno venoso do paciente para a máquina passasse diretamente para a linha arterial, e retornasse ao paciente, após misturar-se com a porção de sangue que passou pelo oxigenador. O fluxo medido através do CCVA era regulado para que a SaO_2 não caísse a

valores abaixo de 90%.

Técnica Cirúrgica

Todos os pacientes foram submetidos à esternotomia mediana e, após a dissecação da artéria torácica interna esquerda e da safena magna de melhor qualidade, foi realizada a canulação aórtica e a introdução da cânula única de duplo estágio em átrio direito. Estabelecida a CEC, foi realizado o clampeamento aórtico que se seguiu pela administração de solução cardioplégica (Sistema Braile Biomédica com uma indução e doses de manutenção a cada 10 minutos). Foram realizadas, inicialmente, as anastomoses distais com prolene 7-0 (sutura contínua) e, posteriormente, as anastomoses proximais com prolene 6-0. Os pacientes foram transferidos para a Unidade de Tratamento Intensivo com pressão arterial média entre 60-70mmHg, recebendo volume ou drogas vasoativas conforme avaliações clínicas, laboratoriais e hemodinâmicas realizadas frequentemente (até a cada 10 minutos).

Colheita e armazenamento das amostras e mensuração dos marcadores

As amostras de sangue foram colhidas em tubos Vacutainer, sem anticoagulante, marca BD (Becton Dickinson UK Ltd, Plymouth, England) imediatamente centrifugadas e os soros armazenados a -20°C para posterior análise bioquímica de CK MB Massa e Troponina I. As dosagens das troponinas foram realizadas por quimioluminescência, em

equipamentos Immulite (DPC - Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, USA). As dosagens de creatinafosfoquinase fração MB (CK-MB) massa foram realizadas por método cinético automatizado, em equipamento Integra 700 (Roche Diagnostic Systems, Besel, Switzerland).

A amostra destinada à avaliação dos linfócitos foi colhida e mantida em tubos Vacutainer contendo K₃EDTA (ácido etileno diamino tetra-acético tripotássico), a temperatura ambiente, até o processamento ser realizado em período inferior a 24 horas. Foi empregada a técnica de imunofluorescência direta, utilizando FITC, PE e PErCP com fluorocromos, em um painel com os seguintes marcadores de superfície: CD3, CD25, CD45, CD26, CD69. As amostras foram incubadas com anticorpos monoclonais fluorescentes, lisadas (FACS Lysing Solution), lavadas e ressuspensas em paraformaldeído 0,1% para posterior análise no citômetro de fluxo (BD FACS Calibur, San Jose, USA) e os dados analisados através do programa Cell Quest.

Para a análise da expressão da anexina V empregou-se o conjunto de detecção de apoptose pela FITC (*fluorescein isothiocyanate*), contendo os seguintes componentes, anexin V-FITC, solução de coloração de iodeto de propídio (PI) e tampão de ligação à anexina V, concentrado 10 vezes. A coloração seguiu o seguinte método: as células foram lavadas duas vezes com PBS (*phosphate buffered saline*) gelado e então ressuspensas uma vez em tampão de fixação na concentração de 1×10^2 células/ml, transferiram-se 100 microlitros da solução (1×10^5 células) para um tubo de cultura de 5 ml. Acrescentou-se 5 microlitros de anexina V-FITC e 5 microlitros de PI. Agitaram-se suavemente as células que foram incubadas por 15 minutos em tubo refrigerado a 25⁰ C no escuro, acrescentando

400 microlitros de tampão, diluído uma vez para cada tubo. A análise por citometria de fluxo dentro de uma hora.

Análise estatística

As variáveis contínuas foram descritas pela média \pm desvio padrão ou mediana (amplitude interquartil: P25 - P75). As variáveis categóricas foram descritas por frequências e percentuais. A comparação entre os grupos OxC e OxCCVA no momento basal foi inicialmente realizada utilizando o teste do qui-quadrado para variáveis categóricas e o teste *t* de Student para populações independentes nas variáveis contínuas. Para avaliar a evolução das variáveis contínuas de interesse ao longo do tempo e comparar os grupos OxC e OxCCVA foi utilizada a análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas com duplo fator de classificação (*between subjects factor*). Variáveis com distribuição assimétrica receberam transformação logarítmica antes da realização da ANOVA. A localização de diferenças estatisticamente significativas foi realizada por teste de comparações múltiplas baseado em procedimento de contrastes ortogonais. O nível de significância adotado foi de $\alpha = 0,05$. Os dados foram processados e analisados com o auxílio do programa SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versão 11.0 e SigmaPlot v2.0.

RESULTADOS

Características Clínicas e Cirúrgicas

Vinte indivíduos, 10 utilizando OxC e 10 utilizando OxCCVA, participaram do estudo tendo idade média de $58 \pm 8,8$ anos, sendo 15 homens (75%) e 19 brancos (95%) com IMC de $27,3 \pm 2,8$ e de baixo risco cirúrgico [46]. Os dois grupos foram semelhantes em relação às variáveis estudadas nos períodos analisados, conforme ilustra a Tabela 1

Tabela 1. Características demográficas e variáveis pré, trans e pós-operatórias.

Variável	CEC com OxC n=10	CEC com OxCCVA n=10	P
Idade (média ± DP)	59,8 ± 9,1	56,1 ± 8,4	0,359
Sexo Masculino (%)	8 (80%)	7 (70%)	0,605
Cor Branca n (%)	10 (100%)	9 (90%)	0,340
Infarto do Miocárdio Prévio n (%)	6 (54,5)	4 (40)	0,653
Insuficiência Cardíaca Congestiva I-II n (%)	0 (0)	2 (20)	0,470
Hipertensão Arterial Sistêmica n (%)	5 (50)	6 (60)	0,653
DBPOC ^a n (%)	1 (10)	2 (20)	0,531
Diabete Melito n (%)	4 (40)	6 (60)	0,371
Doença Péptica n (%)	3(30)	2 (20)	0,605
Doença Arterial Periférica n (%)	2 (20)	2 (20)	1,000
Outras Patologias (%)	6 (60)	4 (40)	0,470
Índice de Massa Corporal (média±DP)	27,8 ± 3,0	26,9 ± 2,64	0,475
Risco de Mortalidade ^b (%)	0,8±0,44	0,9±0,4	0,601
Variáveis Transoperatórias			
Tempo de Cirurgia (média ± DP) (min)	309,5 ± 44	289,5 ± 38	0,290
Tempo de CEC ^c (média ± DP) (min)	72,1 ± 24,3	64,7 ± 11,8	0,398
Tempo de Isquemia (média ± DP) (min)	55,7 ± 23,6	45,6 ± 10,5	0,232
Sangramento (média ± DP) (ml)	665±436	656±290	0,957
Transfusão (média±DP) (ml)	184±320	280±299	0,498
Variáveis Pósoperatórias			
Tempo de UTI ^d (média±DP)	60,5±38,1	50,3±8,2	0,420
Vasos Revascularizados (média ± DP) (n)	3,4±0,8	3,3±0,7	0,354
Sangramento (média ± DP) (ml)	626±389	820±478	0,333
Transfusão (média ± DP) (ml)	182 ± 246,5	167,9±284	0,905
Pico CK-MB massa (mediana± IQ ^e) (ng/ml)	12,5 (8,9-33,3)	14,5 (8,8-26,4)	0,815
Pico de Troponina I (mediana± IQ ^e) (ng/ml)	1,3 (0,88-9,75)	1,9 (0,98-6,85)	0,820

^a DBPOC–Doença Broncopulmonar Obstrutiva Crônica; ^bNorthern New England Cardiovascular Disease Study Group [46]; ^c Circulação Extra corpórea; ^dUnidade de Tratamento Intensivo ; ^eIQ – Intervalo Inter Quartis 25 75%).

Parâmetros analisados dos dois oxigenadores no período transoperatório

Os parâmetros da gasometria arterial, glicemia e potássio não foram significativamente diferentes entre os dois tipos de oxigenadores. O fluxo total da CEC nos dois grupos foi também semelhante; o percentual do fluxo de sangue desviado pelo curto-circuito veno-arterial do oxigenador foi de $30,9 \pm 8,5\%$. A saturação venosa de O_2 foi significativamente menor na CEC com OxCCVA ($P=0,001$), assim como a saturação arterial de oxigênio ($P<0,001$) (Tabela 2).

Tabela 2. Variáveis da circulação extracorpórea, comparando os dois tipos de oxigenadores

Variáveis	OxC ^a	OxCCVA ^b	P
Fluxo Total da CEC (l)	4266±376	4363±277	0,52
Fluxo Total pelo Curto Circuito (l)	0	1346±269	-
Fluxo pelo Curto Circuito (%)	0	30,9±6,0	-
Saturação Venosa de O_2 ^c (%)	75,23±2,87	67,25±2,1	0,001
Saturação Arterial de O_2 (%)	99±0,6	95,5±1,5	<0,001

^aOxigenador convencional; ^bOxigenador com Curto-Circuito veno-arterial; ^c Oxigênio

Marcadores de Injúria Miocárdica

CK MB Massa e Troponina I – As concentrações basais ficaram dentro dos níveis normais. Vinte e quatro horas após a CEC, a CK-MB massa e troponina I não foram significativamente diferentes entre os dois grupos de oxigenadores ($P=0,909$). Os picos dos valores observados nos marcadores de injúria CK-MB massa e troponina I vinte e quatro

horas pós-CEC, não indicaram a presença de infarto do miocárdio transoperatório (Tabela 1) [30].

Marcadores de Identificação, Ativação e Apoptose em Linfócitos T

A evolução dos marcadores de identificação, ativação e de apoptose dos linfócitos está descrita na Tabela 2.

Tabela 2. Dados evolutivos dos marcadores de identificação, ativação e de apoptose dos linfócitos por tipo de oxigenador (Ox).

Marcadores (%)	Tipo de Cirurgia	Indução Anestésica	Início Perfusão	Término da Perfusão	6 h Pós Perfusão	12 h Pós Perfusão	24 h Pós-Perfusão	P Tempo	P Ox
média ± DP									
CD3	OxC	77,2±6,1	76,1±7,1	73,2±9,2	55,1±13,6	55,5±12,3	62,53±13,2	<0,001	0,589
	OxCCVA	73,7±6,4	79,3±5,3	73,8±9,3	54,0±11,4	53,1±13,5	64,1±10,8		
CD26	OxC	35,2±7,2	32,9±6,4	27,5±8,0	21±10,7	20,0±9,3	26,6±11,7	<0,001	0,925
	OxCCVA	36,0±8,8	35,7±13,6	30,8±14,5	23,9±7,3	22,2±6,6	28,5±7,9		
CD69	OxC	10,4±8,18	10,0±3,58	13,6±7,5	25,5±10,1	16,32±6,3	15,8±10,41	<0,001	0,055
	OxCCVA	7,1±4,1	6,3±3,0	6,5±3,1	14,0±4,9	12,5±5,1	7,4±2,8		
Mediana IQ)*									
CD25	OxC	7,2 (4,2-10,3)	6,6 (5,4-8,6)	6,3 (4,3-7,6)	5,2 (2,8-10,0)	7,6 (3,6-11,6)	10,7 (4,7-13,3)	0,027	0,763
	OxCCVA	14,7 (7,2-18,6)	8,7 (3,7-13,6)	7,9 (3,2-11,3)	6,5 (4,0-10,0)	8,3 (5,4-10,1)	10,75 (5,9-16,5)		
ANEXINA V	OxC	3,7 (2,7-10,2)	3,3 (1,7-6,5)	4,4 (1,0-6,9)	2,8 (0,7-5,0)	2,8 (0,8-3,5)	1,2 (0,8-2,7)	<0,001	0,271
	OxCCVA	6,9 (3,7-13,5)	3,7 (1,2-15,3)	6,2 (1,8-8,4)	2,3 (0,8-6,4)	2,6 (0,4-6,1)	4,8 (1,6-9,1)		

Dados com distribuição normal expressos como média ± DP e não-paramétricos como mediana *(Intervalo Inter Quartís 25% 75%). As unidades dos marcadores são expressas em percentual (%).

Marcadores de Identificação

Expressão de CD3 - Houve uma diminuição significativa no tempo ($P < 0,001$) do percentual de expressão do marcador de superfície CD3+ ao longo do tempo ($P < 0,001$), mas sem diferença significativa entre os grupos com OxC ou OxCCVA ($P = 0,589$). Comparadas com as medidas basais da indução anestésica, houve uma diminuição da

expressão deste marcador até a hora 12 pós-CEC em ambos os grupos. Nas horas 6, 12 e 24 do período pós-CEC, considerando a média dos valores do grupo de pacientes como um todo, houve redução com significância estatística dos respectivos pontos comparados com os dados basais, analisado pelo teste de comparações múltiplas baseado em procedimento de contrastes ortogonais ($P < 0,001$) (Figura 1).

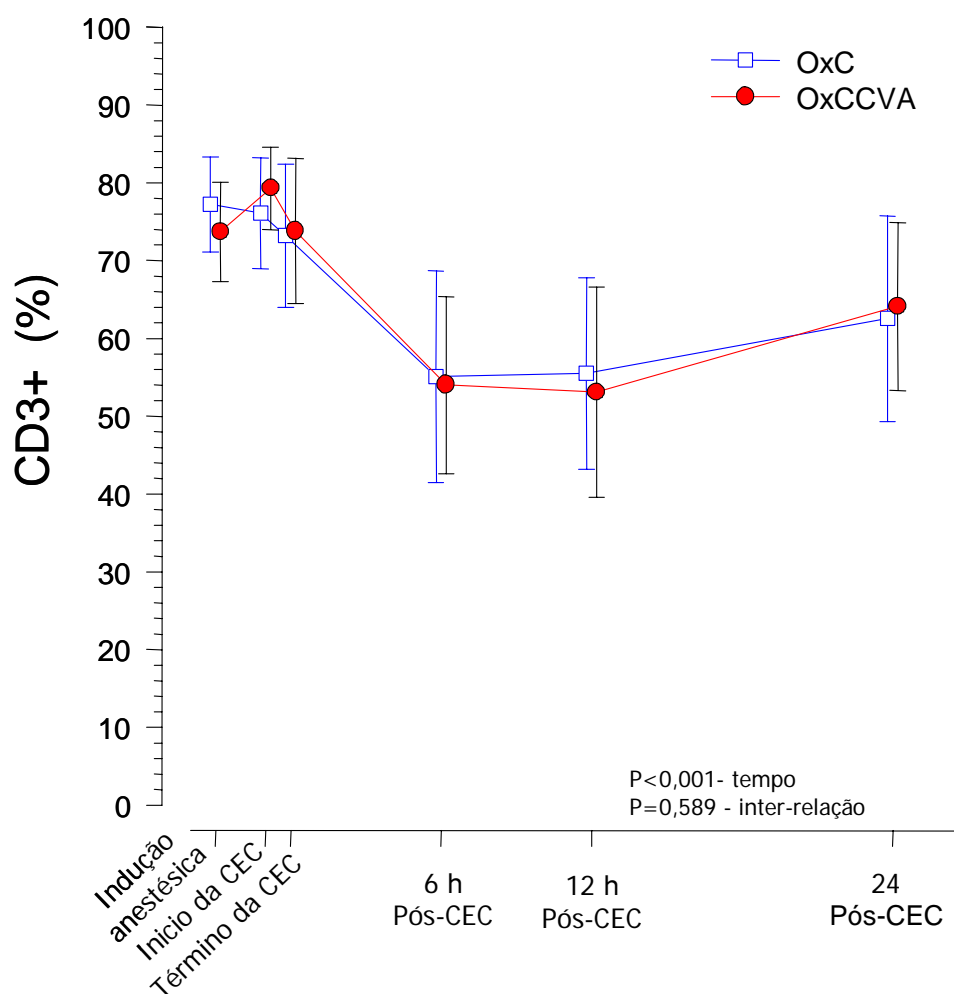


Figura 1. Perfil da variação da expressão de CD3+ nos linfócitos T em ambos os grupos, no tempo ($P < 0,001$, ANOVA, tempo) e entre os grupos ($P = 0,589$, ANOVA, inter-relação).

Expressão de CD45 - Através da análise deste marcador pan-leucocitário, observou-se que praticamente 100% da amostra foi constituída de linfócitos (dados não apresentados). Na evolução temporal, houve uma queda percentual deste marcador após o início da CEC com uma recuperação na hora 12, de forma semelhante nos dois grupos de oxigenadores ($P=0,522$).

Marcadores de Ativação

Expressão de CD25 - Houve uma pequena queda percentual na sexta hora pós CEC com retorno aos níveis basais 24 horas após a CEC não havendo, entretanto, diferença no tempo ou entre os dois grupos de oxigenadores ($P=0,763$). Dados não apresentados.

Expressão de CD26 - Observou-se uma queda da expressão inicial deste marcador até 12 horas após a CEC, retornando, praticamente, aos níveis basais 24 horas após, com comportamento similar ao longo do tempo e nos dois grupos de oxigenadores ($P=0,925$). Dados não apresentados.

Expressão de CD69 - Em ambos os grupos houve uma variação significativa ao longo do tempo na expressão deste marcador, ocorrendo um aumento do percentual de linfócitos ativados até a décima segunda hora do pós-operatório, comparativamente aos valores basais ($P < 0,001$) e redução na vigésima quarta hora, havendo uma maior inibição da ativação com o uso do OxCCVA, em valores absolutos, porém sem significância estatística ($P=0,055$).

Nas horas 6 e 24 após CEC houve uma variação significativa, considerando a média dos valores do grupo de pacientes como um todo $P < 0,01$ e $P = 0,03$, respectivamente, em relação aos níveis basais (Teste de comparações múltiplas baseado em procedimento de contrastes ortogonais) (Figura 2).

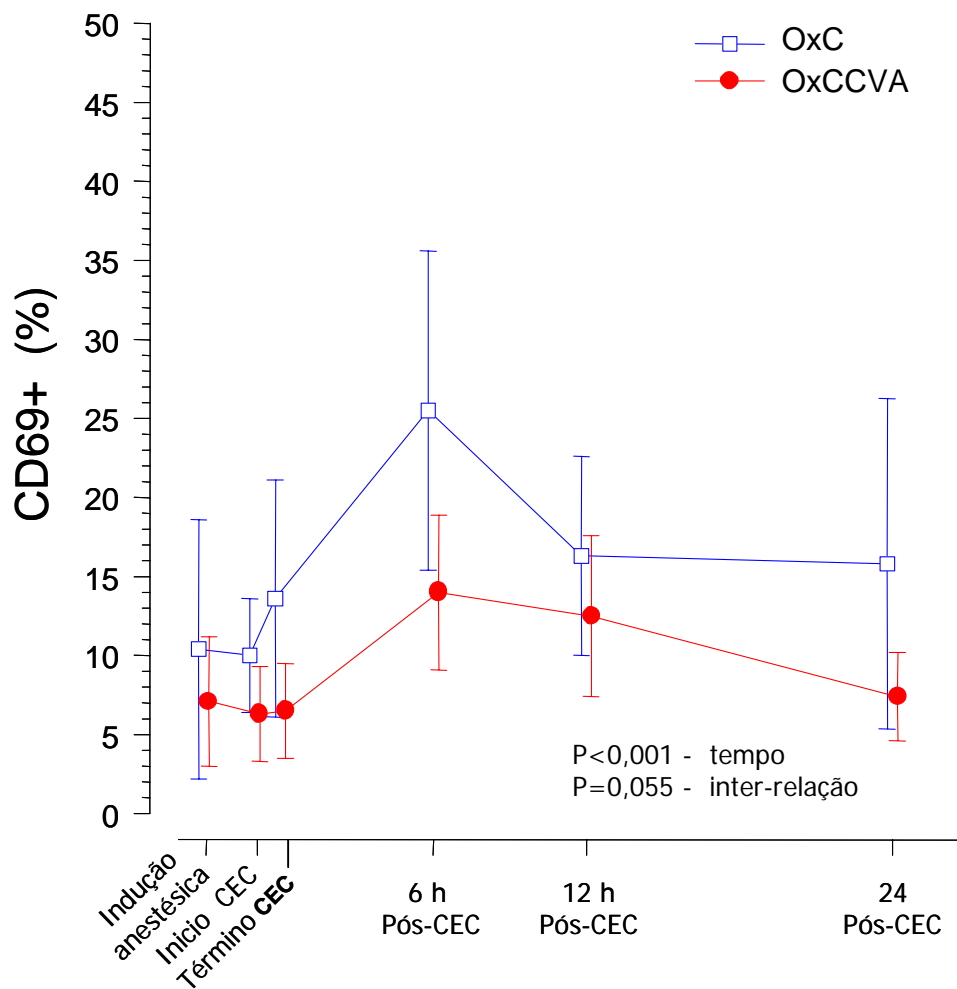


Figura 2. Perfil da variação da expressão do marcador de ativação linfocitária CD69+ ao longo do tempo ($P < 0,001$, ANOVA, tempo) e comparando-se os dois grupos de oxigenadores ($P = 0,055$, ANOVA Inter-relação).

Marcador de Apoptose

Expressão de Anexina V - Na comparação entre os dois grupos de oxigenadores, a expressão de anexina V foi semelhante ($P = 0,271$). No entanto, ao longo do tempo houve uma diminuição significativa da expressão deste marcador em ambos os grupos ($P < 0,001$). Houve uma variação significativa nas horas 6 12 e 24 após a CEC ($P = 0,002$) considerando a média dos valores do grupo de pacientes como um todo em relação aos níveis basais (Procedimento de contrastes ortogonais) (Figura 3).

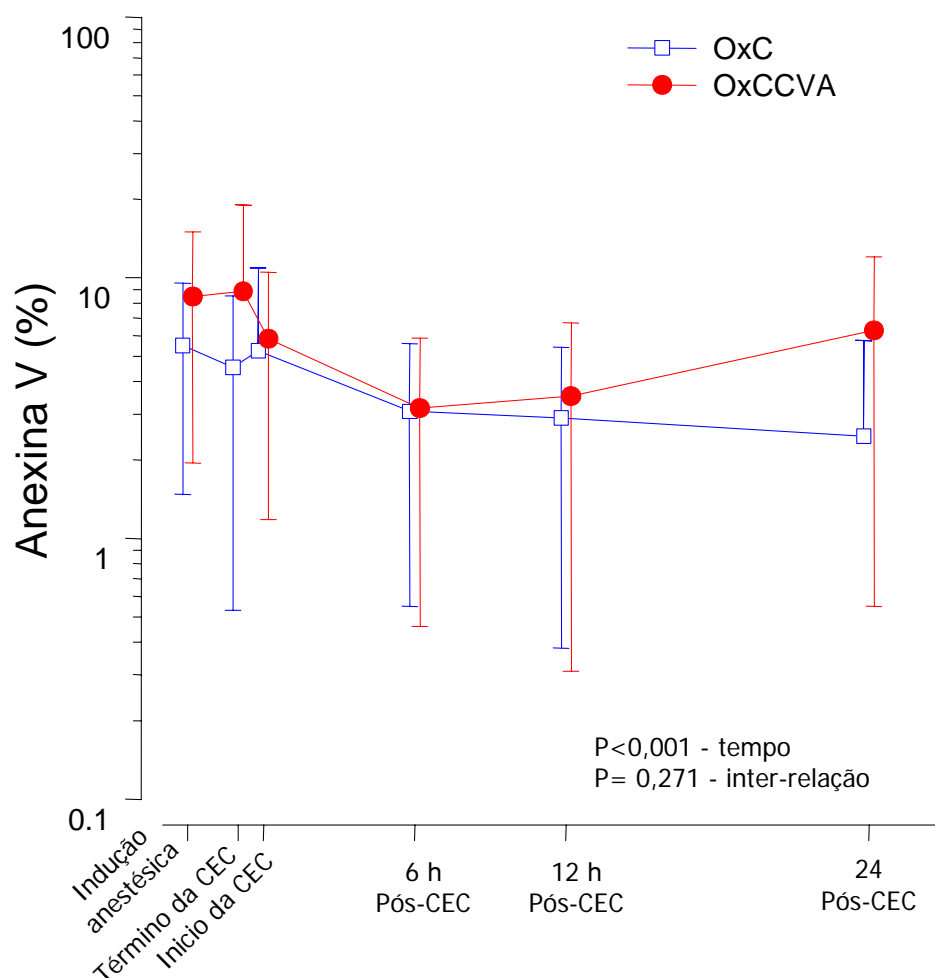


Figura 3. Perfil da variação da expressão da anexina V em linfócitos, comparando os dois grupos de oxigenadores ($P < 0,001$, ANOVA, tempo), e a sua variação entre os grupos ($P = 0,271$, ANOVA, inter-relação).

Leucócitos e linfócitos

Houve uma significativa elevação do número de leucócitos no tempo nos dois grupos de oxigenadores ($P < 0,001$), atingindo o pico na sexta hora pós-CEC nos dois grupos de oxigenadores OxC e OxCCVA, 16363 ± 5005 e 13857 ± 2954 leucócitos/ mm^3 , respectivamente, em relação ao basal 6948 ± 2248 e 6269 ± 2377 leucócitos/ mm^3 , respectivamente. Houve uma tendência à queda na vigésima quarta hora após a CEC, ainda

que sem diferença entre os grupos ($P=0,778$). Os linfócitos apresentaram redução progressiva e significativa do seu número absoluto através do tempo em ambos os grupos de oxigenadores, 2110 ± 611 (OxC) e 2010 ± 1118 (OxCCVA) leucócitos/ mm^3 , em relação aos valores basais. Esta redução ocorreu até a vigésima quarta hora após a CEC, 1132 ± 418 (OxC) e 1015 ± 446 (OxCCVA) linfócitos/ mm^3 , sem diferença estatística entre os grupos ($P=0,745$). A Figura 4 ilustra o perfil da variação dos linfócitos assim como a expressão de anexina V, no grupo de pacientes estudado como um todo, pois não houve diferença entre os dois tipos de oxigenadores.

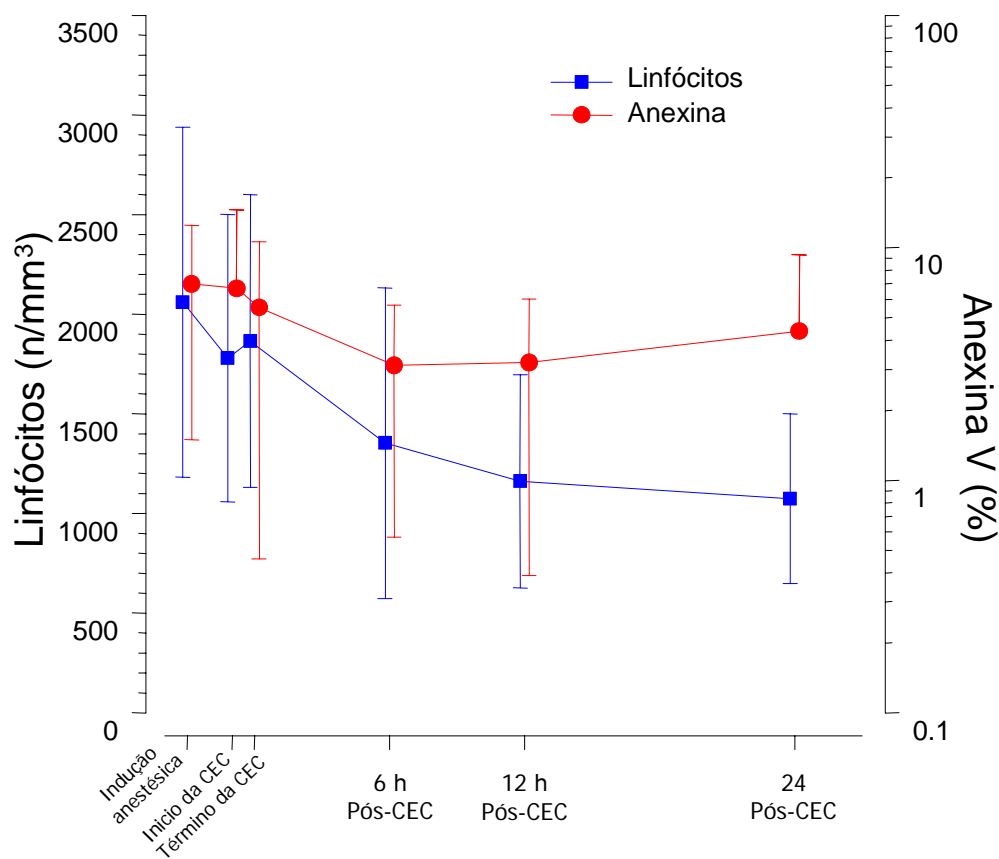


Figura 4 - Perfil da variação da média dos linfócitos e da expressão de anexina V em toda a amostra ($P < 0,001$, ANOVA, tempo).

DISCUSSÃO

Este ensaio clínico mostrou não haver diferença na ativação precoce do sistema imune adquirido e da apoptose dos linfócitos no pós-operatório de CRM com CEC na comparação entre os dois grupos estudados, um destes, utilizando oxigenador de membrana convencional e outro com curto circuito veno-arterial. A linfopenia que ocorreu no período pós-operatório não pareceu estar relacionada à apoptose.

Características clínicas dos pacientes

Os pacientes de ambos os grupos foram semelhantes em todas as variáveis estudadas como co-morbidades, disfunção sistólica ou injúria miocárdica, tempo de CEC e isquemia, duração da cirurgia, volume de sangramento e transfusão e tipo de anestesia. Não foram usados glicocorticóides, aprotinina ou outros fármacos que poderiam influenciar na ativação imunológica [31-33]. O grupo estudado apresentou características de baixo risco cirúrgico, o que, apesar de aumentar a validade interna, poderia atenuar a magnitude da resposta imune. Se pacientes mais grave fossem incluídos, poderia haver prejuízo na análise mais isenta de fatores potencialmente implicados neste processo fisiopatológico.

Parâmetros do transoperatório

Parâmetros, como o fluxo total e a saturação venosa e arterial de oxigênio, aferidos diretamente e pela gasometria arterial e o percentual de sangue desviado pelo curto circuito veno-arterial foram analisados, pois poderiam influenciar na resposta imune. Houve diferença significativa no volume de sangue desviado do oxigenador e na saturação arterial e venosa de oxigênio. O OxCCVA pode promover um desvio de até 50% do sangue venoso para o arterial, diminuindo o tempo total de exposição do sangue à superfície não-endotelial da CEC [34]. No nosso estudo, o percentual médio do fluxo desviado foi de 30,9%. No oxigenador convencional o fluxo total passa pelo oxigenador. Com o uso do curto-circuito veno-arterial, a saturação arterial de oxigênio e venosa foram significativamente menor do que a do convencional. Em dois estudos prévios, os percentuais de saturação arterial de oxigênio foram semelhantes àqueles observados no nosso estudo [34, 35]. O percentual de sangue desviado pelo curto-circuito nestes dois estudos prévios foi de 40 a 50%, sendo menor no atual estudo (30,9%), o que poderia ter influenciado nos resultados de maneira diferente. Esses dois estudos observacionais, no entanto, estudaram somente as modificações fisiológicas e os desfechos clínicos [34, 35]. Até onde pesquisamos não encontramos estudos que relacionassem esta tecnologia de oxigenadores com a resposta imune.

Marcadores de identificação linfocitária

Para identificar as células da imunidade adquirida investigadas, foram analisados dois marcadores de superfície: CD45 e CD3. O CD45 é um marcador de superfície pan-leucocitário. Neste estudo, o CD45 corresponde à população total de linfócitos. O CD3+ identifica os linfócitos T. A análise por citometria de fluxo demonstra que 85% da amostra total de linfócitos marcados pelo CD45+ são de fato linfócitos T (70%), destes 51% são linfócitos Th e 19% linfócitos Tc [21]. Estes dados são importantes, pois a análise do marcador de ativação CD69+ e de apoptose anexina V foi realizada com o CD45+, portanto predominantemente estudando linfócitos T.

Marcadores de ativação

Expressão de CD 69

Demonstrou-se uma ativação precoce dos linfócitos, predominantemente linfócitos T, a julgar pela expressão aumentada do CD69+ que atingiu o pico na sexta hora após a CEC, normalizando-se na vigésima quarta hora após a CEC, sendo significativa a elevação nas horas 6 e 12. Sugere-se que essa ativação precoce do CD69+ permite avaliar eventos precoces da ativação dos linfócitos, pois é o primeiro marcador de superfície a expressar-se no processo de ativação das células T e é detectável dentro de uma hora da ligação do receptor do linfócito T e o complexo CD3+. Após a sua expressão, o CD69 age como uma molécula co-estimuladora para a ativação e proliferação dos linfócitos T [36]. Sugeriu-se

que esta ativação precoce pelo CD69 seria precursora de um processo sequencial imunoinflamatório, que finalizaria na apoptose dos linfócitos e a conseqüente linfopenia pós-operatória [28]. No estudo de Shimaoka et al. analisando uma população de pacientes com neoplasia de esôfago e cirurgia cardíaca com acompanhamento até o sétimo dia de pós-operatório, houve um aumento da expressão do CD69+ até o segundo dia, que se estabilizou até o quinto dia e iniciou a queda de sua expressão no sétimo dia. Esse foi o primeiro estudo que, utilizando o CD69, demonstra uma ativação precoce dos linfócitos T, imediatamente após a CEC. O motivo da discrepância destes dados, com um estudo anterior, que mostrou uma diminuição da ativação dos linfócitos após a cirurgia [37] pode ser atribuído ao método e ao marcador estudado. A possibilidade de uma análise precoce do marcador CD69, proporcionada pela citometria de fluxo, reflete, com maior exatidão a situação clínica real. Utiliza sangue total e permite uma análise concomitante à presença de citocinas pró-inflamatórias, que mantém a ativação, justificando esta diferença. Nossos resultados, com os mesmos métodos, se sobrepõem aos de Shimaoka e colaboradores pois demonstramos uma ativação inicial até 12 horas pós-CEC. Após este ponto, observamos uma redução na expressão do CD69. Em relação aos valores basais, houve um aumento da expressão do CD69+ nas horas 6 e 12 após a CEC, com pico na hora 6. No estudo observacional de Shimaoka e colaboradores, a expressão do CD69 é crescente até o quinto dia de pós-operatório em relação ao basal. Acreditamos que esta diferença tenha ocorrido pelo perfil da amostra desse estudo que incluiu pacientes com cirurgia por câncer de esôfago e cirurgia valvular. Em estudo randomizado com os mesmos critérios de seleção de pacientes, com perfil de baixo risco cirúrgico e mesmo tipo de cirurgia (CRM) a expressão do CD69 foi semelhante[29].

Embora não houvesse significância estatística na comparação entre os dois tipos de oxigenadores, constatou-se uma menor ativação do CD69 no grupo que utilizou o OxCCVA, que foi constante desde o valor basal até a hora 24 pós-CEC, porém sem significância estatística, sugerindo um erro tipo II.

Expressão de CD26

No nosso estudo ocorreu uma diminuição da expressão deste marcador que é uma exopeptidase presente na membrana de células T e B ativadas. Este dado demonstra uma célula não ativada, ao contrário do observado no perfil do CD69+. Estes resultados estariam relacionados com o conceito de resposta pró e anti-inflamatória em um determinado contexto [38], onde uma resposta pró-inflamatória seria contrabalançada por respostas compensatórias anti-inflamatórias, algumas já identificadas como as citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL8 e TNF- α e IL-1 β e anti-inflamatórias IL-10, IL-4 e IL-5 [39]. No contexto dos marcadores de superfície o comportamento deste marcador seria anti-inflamatório.

Expressão de CD25

Neste estudo o CD25, um receptor da IL-2, encontrado em células T ativadas, apresentou uma diminuição de sua expressão no tempo, demonstrando uma ausência de ativação linfocitária. A ativação precoce dos linfócitos pode ser desencadeada pela IL-2,

interferon γ e fator de estimulação dos macrófagos A produção de IL-2 está marcadamente diminuída no pós-operatório, pois tem a função de promover a proliferação dos linfócitos T e aumentar a produção de imunoglobulinas pelos linfócitos B [40]. Sua depressão aumentaria o risco de infecção oportunista. Neste estudo não medimos a produção de IL-2, mas sim seu receptor nas células T. No ambiente imunoinflamatório a expressão do receptor pressupõe a existência da molécula efetora, permitindo inferir que no contexto do nosso estudo haveria uma diminuição da produção de IL-2 e uma não ativação do sistema imune adquirido.

Marcador de apoptose

Os resultados deste estudo mostraram não haver diferença na expressão da anexina V nos dois grupos de oxigenadores estudados, demonstrando que a inibição da apoptose dos linfócitos não é influenciada pelos oxigenadores testados. A apoptose na imunidade inata é um processo conhecido na cirurgia cardíaca com CEC; a imunidade adquirida, entretanto somente recentemente vem sendo estudada [22, 28].

A ativação precoce dos linfócitos T, utilizando a técnica de citometria de fluxo, pela expressão do CD69, parece estabelecida no contexto de CEC [28, 29, 41], e alguns autores sugerem que tal achado esteja associado ao processo de apoptose de linfócitos na CC com CEC [22, 28]. No entanto, não há dados objetivos que suportem tal conceito, uma vez que estudos com expressão de anexina V (marcador sensível de apoptose) ainda não foram

descritos na literatura para análise dos mecanismos implicados na linfopenia pós-operatória da CEC. Finalmente, no presente estudo não foi evidenciado, até 24 horas após a CEC, que a ativação do CD69+ preceda o processo de apoptose dos linfócitos conforme tem sido especulado.

Linfopenia e apoptose

Este estudo não sugere que a linfopenia pós-operatória ocorra por apoptose como se especula na literatura [22, 28]. A linfopenia ocorreu desde o início da CEC e permaneceu até a vigésima quarta hora, último momento de nossa observação. A expressão da anexina V apresentou uma queda de 50% em relação ao valor basal a partir do término da CEC até a vigésima quarta hora. Portanto, neste estudo, demonstramos uma queda da expressão da anexina V semelhante à queda dos linfócitos, sugerindo que esta linfopenia observada possa ser devida a outros mecanismos que não apoptose, pois se assim fosse esperar-se-ia um aumento da expressão de anexina V nos linfócitos em processo de apoptose.

Limitações do Estudo

Estas observações foram realizadas somente até 24 horas do período pós-CEC e em pacientes sem complicações no pós-operatório em uma população de baixo risco e com boa capacidade funcional (Classes I e II da New York Heart Association) no pré-operatório.

Poderia-se admitir que um aumento do tempo de observação, incluindo pacientes com maior risco pré-operatório e sem excluir aqueles com complicações pós-operatórias, as respostas de ativação e apoptose poderiam ser mais evidentes ou diferentes. Além disto, o curto tempo de observação pode ter excluído fenômenos que ocorreriam mais tardiamente, pois estudos analisando a resposta imune adquirida no período tardio, utilizando um modelo com coração artificial demonstraram uma progressiva alteração da imunidade celular com a ativação dos linfócitos T, induzindo a apoptose, avaliada pela expressão da anexina V e do CD95+, isto associado a um maior número de infecções sistêmicas oportunistas [42, 43]. Finalmente, este estudo não permite o estabelecimento de relações causa-efeito entre os fenômenos estudados, mas sugere associações que podem ser testadas em estudos mecanísticos.

CONCLUSÕES

As observações deste estudo demonstraram que a utilização de um oxigenador de membrana com curto circuito veno-arterial, com um desvio de até 30% do sangue venoso e uso de oxigênio puro, se associou a uma ativação precoce e uma inibição da apoptose dos linfócitos semelhantes ao de um oxigenador convencional.

Além disto, nossos dados, ao não demonstrarem evidências de apoptose em linfócitos, sugerem que outros mecanismos estejam implicados na linfopenia pós-operatória observada nos dois grupos de oxigenadores.

REFERÊNCIAS

1. Butler J, Rucker GM, Westaby S. Inflammatory response to cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1993;55:552-9.
2. Herskowitz A, Mangano DT. Inflammatory cascade: a final common pathway for perioperative pathway. *Anesthesiol* 1996;85:957-60.
3. Cremer J, Martin M, Redi H, et al. Systemic inflammatory response: syndrome after cardiac operations. *Ann Thorac Surg* 1996;61:1714-20.
4. Galley HF, Webster NR. The immuno-inflammatory cascade. *Brit J Anaesth* 1996;77:11-6.
5. Taylor KM. SIRS -The Systemic Inflammatory Response Syndrome after cardiac operations. *Ann Thorac Surg* 1996;61:1607-8.
6. Hall RI, Smith MS, Rucker G. The systemic inflammatory response to cardiopulmonary bypass: pathophysiological, therapeutic, and pharmacological considerations. *Anesth Analg* 1997;85:766-82.
7. Gomes WJ, Silas MG, Lopes MG, et al. Síndrome vasoplégica: nova forma de síndrome pós perfusão. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 1996;1:39-43.

8. Brasil LA, Gomes WJ, Salomão R, Buffolo E. Inflammatory response after myocardial revascularization with or without cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1998;66:56-9.
9. Savaris N, Polanczyk C, Clausell N. Cytokines and troponin-I in cardiac dysfunction after coronary artery grafting with cardiopulmonary bypass. *Arq. Bras Cardiol* 2001; 77:114-9.
10. Edmunds LH Jr . Inflammatory response to cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1998;66:12-6.
11. Moura HV, Pomerantzeff PMA, Gomes W J. Síndrome da resposta inflamatória sistêmica na circulação extracorpórea: papel das interleucinas. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 2001;16:376-87.
12. Fransen E, Maessen J, Dentener M, Senden N, Geskes G, Buurman W. Systemic inflammation present in patients undergoing CABG without extracorporeal circulation. *Chest* 1998;113:1290-5.
13. Matata BM, Sosnowski AW, Galiñanes M. Off-pump bypass graft operation significantly reduces oxidative stress and inflammation. *Ann Thorac Surg* 2000;69:785-91.

14. Ascione R, Lloyd CT, Underwood, MJ, Lotto AA, Pitsis AA, Angelini GD. Inflammatory response after coronary revascularization with or without cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 2000;69:1198-1204.
15. Czerny M, Baumer H, Kilo J, et al. Inflammatory response and myocardial injury following coronary artery bypass grafting with or without cardiopulmonary bypass. *Eur J Cardio-thorac Surg* 2000;17:737-42.
16. Buffolo E, Andrade JCS, Branco JNR, Teles CA, Aguiar LF, Gomes, WJ. Coronary artery bypass grafting without cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1996;61:63-6.
17. Kirklin JK, Westaby S, Blakstone EH, et al. Complement and the damaging effect of cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1983;86:845-57.
18. Kirklin J. Prospects for understanding and eliminating the deleterious effects of cardiopulmonary bypass [editorial comment]. *Ann Thorac Surg* 1991;51:529-31.
19. Chenoweth DE, Cooper SW, Hugli TE, Stewart RW, Blackstone EH, Kirklin JW. Complement activation during cardiopulmonary bypass: evidence for generation of C3a and C5a anaphylatoxins. *N Engl J Med* 1981;304:497-503.

20. De Angeli S, Paccagnella A, Mordacchini M, et al. The effects of prolonged cardiopulmonary bypass on cell-mediated immunity. *Thorac Cardiovasc Surgeon* 1994;42:14-20.
21. Misoph M, Babin-Ebell J, Schwender W, Grossmann R, Keller F, Elert O. Response of the cellular immune system to cardiopulmonary bypass in vivo. *Thorac Cardiovasc Surgeon* 1997;47:217-23.
22. Markewitz, A, Lante W, Franke A, Marchi K, Kuhlmann WD, Weinhold C. Alterations of cell-mediated immunity following cardiac operations: clinical implications and open questions. *Shock* 2001;16:(Suppl.1)10-5.
23. Ulicny KS, Hiratzka LF. The risk factors of median sternotomy infection: a current review. *J Card Surg* 1991;6:338-51.
24. Gu YJ, Oeveren W, Akkerman C, Boonstra PW, Huyzen RJ, Wildevuur CRH. Heparin-coated circuits reduce the inflammatory response to cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1993;55:917-22.
25. Wendel HP, Ziemer G. Coating-techniques to improve the hemocompatibility of artificial devices used for extracorporeal circulation. *Eur J Cardio-thorac Surg* 1999; 16:342-50.

26. Richter JA, Meisner H, Tassani P, Barankay A, Dietrich W, Braun SL. Drew-Anderson technique attenuates systemic inflammatory response syndrome and improves respiratory function after coronary artery bypass grafting. *Ann Thorac Surg* 1999;69:77-83.
27. DeVroege R, Rutten PM, Kalkman C, et al. Comparação de três oxigenadores de membranas (hollow fiber) disponíveis comercialmente: performance da transferência de gás e biocompatibilidade. *Asaio*, 2001;47:34-44.
28. Shimaoka M, Hosotsubo K, Sugimoto M, Sakaue G, Taenaka N, Yoshia I. The influence of surgical stress on T cells: enhancement of early phase lymphocyte activation. *Anesth Anal* 1998;87:1431-5.
29. Blacher C, Neumann J, Marques ME et al. Cirurgia de revascularização miocárdica sem circulação extracorpórea não reduz a ativação linfocitária. In Congresso da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul, 13., 2002, Gramado. Programa final. Porto Alegre: SCRGs, 2002:34.
30. Antmann EM. Medical management of the patient undergoing cardiac surgery. In Braunwald E. *Heart disease*. 5.ed. Philadelphia:W.B.Saunders, 1997:646-53.

31. Menasché P. The systemic factor: the comparative roles of cardiopulmonary bypass and off-pump surgery in the genesis of patient injury during and following cardiac surgery. *Ann Thorac Surg* 2001;72:S2260-6.
32. Pearl JM, Nelson DP, Schwartz SM, et al. Glucocorticoids reduce ischemia-reperfusion-induced myocardial apoptosis in immature hearts. *Ann Thorac Surg* 2002;74:830-7.
33. Defraigne JO, Pincemail J, Larbuisson R, Blaffart F, Limet R. Cytokine release and neutrophil activation are not prevented by heparin-coated circuits and aprotinin administration. *Ann Thorac Surg* 2000;69:1084-91.
34. Moraes D.J, Moraes MCJ, Dias JRJ, et al. Uso de oxigênio puro e shunt veno-arterial nos oxigenadores de membrana. *R Bras Cir Cardiovasc* 1997;12:77-82.
35. Moraes M, Dias J, Moraes Z, Novaes M, Holanda N, Junqueira D. Perfusion for cardiac surgery using venous arterial shunt and pure oxygen in membrane oxygenators: forty to fifty per cent of the venous blood recirculate and don't pass through the oxygenator. In *World Congress of Cardiology*, 12., Rio de Janeiro, 1998:113-8.
36. Ziegler SF, Ramsdell F, Alderson MR. The activation antigen CD69. *Stem Cell* 1994;12:456-65.

37. Ryhaenem P, Huttunem K, Llonem J. Natural killer cell activity after open heart surgery. *Acta Anaesth Scand* 1984;28:490-2.
38. Bone, RC. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Crit Care Med* 1996;24:1125-8.
39. Franke A, Lante W, Fackeldey V, et al. Proinflammatory and antiinflammatory cytokines after cardiac operation: different cellular sources at different times. *Ann Thorac Surg* 2002;74:363-71.
40. Hisatomi K, Isomura T, Kawara T, et al. Changes in lymphocyte subsets, mitogen responsiveness, and interleukin-2 production after cardiac operations. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1989;98:580-91.
41. Bertho AL, Santiago MA, Coutinho SG. Flow cytometry in the study of cell death. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000;95:429-33.
42. Ankersmit HJ, Tugulea S, Spanier T, et al. Activation-induced T-cell death and immune dysfunction after implantation of left-ventricular assist device. *Lancet* 1999; 354:550-5.
43. Ankersmit HJ, Wieselthaler G, Moser B, Gerlitz S, Roth G, Boltz-Nitulescu G, Wolner E. Transitory immunologic response after implantation of the DeBakey VAD continuous-axial-flow pump. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002;123:557-61.

44. Brasil LA, Gomes WJ, Salomão R, Buffolo E. Ativação de citocina (fator de necrose tumoral α) e resposta clínica induzida pela circulação extracorpórea. Rev Bras Cir Cardiovasc 1996;11:188-200.
45. Brasil LA, Gomes WJ, Salomão R, Fonseca JHP, Branco JNR, Buffolo E. Uso de corticóide como inibidor da resposta inflamatória sistêmica induzida pela circulação extracorpórea. R Bras Cir Cardiovasc 1999;14:254-68.
46. O'Connor GT, Plume SK, Olmstead EM, et al. A regional prospective study of in-hospital mortality associated with coronary artery bypass grafting: the Northern New England Cardiovascular Disease Study Group. JAMA 1991;266:803-9.

ARTIGO EM INGLÊS

**Lymphocyte's Activation and Apoptosis:
Comparative Analysis Between Two Oxygenator's Types (Conventional
and With a Venous-Arterial Shunt) in Coronary Artery Bypass Graft With
Cardiopulmonary Bypass**

Paulo Ernesto Leães and Nadine Clausell

**Hospital São Francisco and
Federal University of Rio Grande do Sul,
Porto Alegre, Brazil**

2003

ABSTRACT

Background. Cardiac surgery (CS) with cardiopulmonary bypass (CPB) prompts an immune response. Newer oxygenators with latest technologies are designed to attenuate such immune reaction. On the other hand, several studies speculate that the post-CPB lymphopenia could be due to apoptosis. The present work evaluated the effect of CPB over the acquired immune response, comparing an oxygenator with a veno-arterial shunt and a conventional oxygenator regarding lymphocyte's early activation and apoptosis induction and its implications in the post-CPB lymphopenia.

Methods. Patients undergoing coronary artery bypass graft surgery (CABG) with CPB using either method of oxygenation (conventional or with a veno-arterial shunt) had blood samples drawn at anesthetic induction, beginning and end of the CPB, at six, 12 and 24 hours after surgery. Analysis by flow-cytometry was undertaken in order to assess the expression of lymphocytes surface markers (CD3, CD25, CD26, CD69) and apoptosis (annexin V).

Results. Twenty patients were studied. Ten patients used with conventional oxygenator and ten used an oxygenator with veno-arterial shunt. Lymphocytes' increased expression of CD69⁺ and the decrease in expression of annexin V were similar in both groups (P=0.055 and P=0.271 respectively). The post-operative lymphopenia (P<0.001), the decrease in CD3⁺ expression (P<0.001) and annexin V (P<0.004) and the increased expression of CD69 (P<0.001) were significant over time, similarly in both groups.

Conclusions. The acquired immune response, characterized by early activation (expression of CD69+) and by apoptosis (expression of annexin V) of lymphocytes, seems not to be influenced by the kinds of oxygenators used in this study. The observed lymphopenia post-CPB does not seem to be secondary to apoptosis.

Key-Words: Apoptosis, lymphocytes, oxygenators, cardiopulmonary bypass.

INTRODUCTION

The cardiac surgery (CS) with cardiopulmonary bypass (CPB) prompts an inflammatory response. This is probably due to the blood contact with non-endothelial surfaces or, to ischemia/reperfusion lesions and endotoxins, or due to the surgical trauma and is known as the Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) which is responsible for post-operative complications [1-11]. Since the beginning of CS, CPB has been considered the main contributing factor in this process. Recent studies, however, have shown that the immunoinflammatory response occurs also in CS without CPB, although less intense. [12-15]. The inflammatory response may be absent in cardiac surgery without CPB as the production of some specific interleukins such as the tumor necrosis factor (TNF)- α are abolished in this setting, or even well controlled in the surgery with CPB with the help of drugs [8,14], diminishing the post-operative complications. Nevertheless, it is thought that the surgical stress also contributes significantly in this process. The early inflammatory response is characterized by the activation of various biochemical cascades such as the coagulation, kallikrein, fibrinolysis and complement pathways [17-19], following an innate immune response triggered by granulocytes and an acquired response triggered through lymphocyte activation. [20-22]. This activation is considered to be one of the major causes of morbidity and mortality in the post-operative period of CABG, particularly in regards to risk of infection [23]. The still incomplete understanding of the SIRS' physiopathologic process makes the development of adequate therapy for this condition difficult.

New technologies has arisen with the objective of minimize the resulting complications from the CPB [24-26]. A membrane-oxygenator with lesser blood-contacting surface, limited initial volume and with a veno-arterial shunt (OxVAS) would provide a shorter exposition time of the blood with the blood-contacting, non-endothelial surface, but studies with these oxygenators, as far as we know, have not evaluated their profile regarding the immune response associated with CBP. [27].

Another hypothesis suggests that the lymphocyte activation by the surgical stress seems to provoke the post-operative lymphopenia [21, 22]. Lymphopenia could be a protective response from the immune system in order to avoid an unnecessary exacerbation of the early temporary inflammatory response, however its actual mechanism has not been elucidated yet. Apoptosis or necrosis are suggested hypotheses, although yet not tested, to explain this phenomenon [28; 29].

The aim of this study was to analyze the immune response in the first 24h post-CPB looking at activation and development of lymphocyte apoptosis in patients submitted to CABG with CPB comparing a conventional oxygenator with one using a veno-arterial shunt. Implication of apoptosis in the post-operative lymphopenia was also assessed.

PATIENTS AND METHODS

Study population

Patients referred to CABG surgery at the Hospital São Francisco de Cardiologia, from March 2002 to October 2002, were considered to participate in this randomized clinical trial comparing two types of oxygenators – conventional and with a veno-arterial shunt. All patients who were referred undergo CABG with CPB were consecutively included in the study. Patients were excluded from the study if they: were older than 70, had prior surgery with CPB, had history of myocardial infarction less than 2 months prior to this study, other concomitant cardiac procedure (change of valve, correction of congenital defects, etc.). Were also not included patients with: renal insufficiency with creatinine level greater than 2mg/dl, Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS), chronic or peri-operative use of corticosteroids, left ventricular ejection fraction less than 40%, active infection, unstable angina, heart failure NYHA class III or IV. In the post-operative period, were excluded patients with: reoperation during the period of the study (first 24 hours), myocardial infarction, signs of low cardiac output with oligoanuria and life-threatening arrhythmias (that needed electric cardioversion in the first post-operative day). The study protocol has been approved by the Research Ethics Committee of the institution and the patients have signed an informed consent before their inclusion in the study protocol.

Study logistic and outcomes

Ten minutes after anesthetic induction, the first blood sample was drawn for later measurement of markers of interest (sample zero). Subsequent samples were drawn in the following moments: 10 minutes after starting CPB, in the end of the CPB, six, 12 and 24 hours after the end of the CPB. Main outcomes of this study were activation and apoptosis of lymphocytes comparing both types of oxygenators.

Anesthesia technique and post-operative care

All patients received lorazepam PO 0.02-0.04 mg/kg in the night before the procedure and 90 minutes before the anesthetic induction. Previously to this, a peripheral vein (Insyte 16) and artery (Insyte 18) were punctured under local anesthesia with lidocaine 1%. The trans-operative monitorization was comprised of: 1) continuous and invasive measurement of intra-arterial pressures; 2) electrocardiogram in the leads DII and V5 with continuous analysis of ST segment in 7 leads; 3) arterial blood pressure, pulmonary capillary wedge pressure and central venous pressure with a Swan Ganz catheter positioned through the right internal jugular vein after anesthetic induction); 4) exhaled fraction of CO₂; 5) inspired fraction of O₂; 6) oxymetry; 7) analysis of inspired and expired gases; 8) nasal and thumb temperature; (these parameters were measured by the Multiparametric Monitorization System Marquette Solar Model 8000) 9) hourly diuresis; 10) periodic analysis of blood gas, electrolytes, hematocrit, hemoglobin and glycemia.

Anesthetic induction was performed with midazolam (50-100 µg/kg) and propofol 1-2 mg/kg and muscle relaxation was achieved with pancuronium bromide (0.008mg/kg). Mechanical ventilation was performed with a tidal volume of 10 – 12 ml/kg, respiratory rate of 11-12 mpm and oxygen inspiratory fraction (FiO₂) of 30%; further adjustments were performed based on blood gases analyses. Anesthesia maintenance was performed with continuous infusion of midazolam (0.5 – 2 µg/kg/min) e phentanyl (0.04 – 0.16 µg/kg/min). Additional doses of midazolam (1-3 mg) and/or phentanyl (50 – 200 µg) were administered when the skin was incised, during the sternotomy, when the aorta was being manipulated or whenever a tapering of the anesthetics level was suspected. After the end of CPB, the lowest infusion possible of both anesthetics was utilized. No patient in the study received any drug with known effect on inflammatory response such as aprotinin, tranexamic acid, aminocaproic acid, non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) or any corticosteroid.

Anticoagulation was performed with bovine non-fractionated heparin (5mg/kg) and its neutralization performed with protamine sulphate in a 1mg/1mg fashion. The heparin effect as well as its neutralization with protamine was controlled by means of Activated Coagulation Time (ACT) with Hemochron Jr. System. The ACT level was kept above 480 seconds after the administration of heparin. During the periods pre and post-CPB, the systolic blood pressure was aimed to be kept as close as possible to 100 – 120 mmHg with the help of vasodilators (nitroglycerin and/or sodium nitroprusside) or vasopressors (norepinephrine) in continuous infusion. These measures were associated with the adjustments in the anesthetic levels as mentioned above. The heart rate was maintained between 60 and 80 bpm with beta-blocker (metoprolol) or pacemaker and, whenever

possible, with atrial stimulation. Myocardial ischemia, suspected through the continuous ST segment analysis, or by persistent arrhythmias associated with heart manipulation or regional contractility deficits, was treated by eliminating the etiologic factor involved (tachycardia, pre and afterload shifts) and nitroglycerin. The cardiac output changes were treated depending on its causes (preload, systemic or pulmonary vascular resistance, heart rate, rhythm and contractility). Dopamine (2-5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) was used if increased contractility was desired. Volume replenishment was achieved with saline solution 0.9%, in sufficient volume to achieve a 7 ml/kg/h reposition after all CPB content have been returned to the patient. The replacement of the blood losses was carried out with packed red blood cells, whenever the hematocrit went lower than 25%, or hemoglobin lower than 8 mg/dl, or if patients had clinical or hemodynamic evidences of significant hypovolemia.

Cardiopulmonary bypass

The following devices were utilized to achieve a total cardiopulmonary bypass: conventional membrane oxygenator for adults without veno-arterial shunt and another one with veno-arterial shunt (DMG - Equipamentos Medicos Ltda), both with polypropylene membrane and CPB machine Sarns 8000™ with roller-pump and gas mixer Sechrist™. The arterial segment of CPB circuit were built with 3/8 PVC tubes with approximately 1.5m in length. A 40 micra filter was positioned within the system to stop occasional air bubbles. The venous segment of the CPB was built with ½ inch PVC tubes of 1.5m in length. Three

field aspirators were used which were built with $\frac{1}{4}$ inch PVC tubes with 2 m in length, arterial roller of $\frac{1}{2}$ inch and venous reservoir up to 4 L. The cardioplegy system was composed of a 1000 ml rigid reservoir with $\frac{1}{4}$ inch PVC tubes. In order to monitor body temperature shifts, a circulating-water thermo-exchanger device which was inserted into the oxygenator body was used. On top of the usual monitoring procedures used in any CPB (mean arterial pressure, initial volume, nasal and peripheral temperature, venous oxygen saturation (SvO_2), diuresis, etc) venous and arterial oxygen saturation of hemoglobin as well as the hemoglobin concentration, continuously, were also monitored with the aid of sensors positioned in the venous and arterial ends of the CPB circuit. In the oxygenator with veno-arterial shunt (OxVAS) group, a probe to measure blood flow was placed in the system. Ringer lactate solution (1750 ml) was used to fill the extracorporeal system. The addition of packed red blood cells to complete the volume of the system during the CPB, was carried out based on the need of maintenance of hematocrit not lower than 25% or hemoglobin above 8 g/dl. The CPB perfusion was carried out with arterial flow of 2,4 l/min/m² for nasal temperatures over 32° C and 2,0 l/min/m² for temperatures between 32 and 28° C. In the OxVAS group patients, a regulator clamp was opened to allow that a portion of the venous return from the patient could bypass directly to the patient's arterial line, bypassing the CPB machine. The blood flow measured through the regulator clamp in the VAS group was regulated in a way to keep patient's SaO_2 above 90%.

Surgical technique

All patients underwent median sternotomy. After dissection of the left internal mammary artery and saphenous magna vein of best quality, aortic cannulation was performed and a double-stage cannula was introduced into the right atrium. After CPB was established, aortic clamping was performed and cardioplegic solution was administered (Braile Biomédica System with an induction and maintenance doses every ten minutes). Distal coronary anastomosis were performed first with prolene 7-0 (continuous stitches) and proximal anastomosis were performed afterwards with prolene 6-0. Patients were transferred to the Intensive Care Unit with mean arterial pressure between 60 and 70 mmHg, receiving volume infusion and vasoactive drugs as clinically indicated based on frequent hemodynamic and biochemical assessments (every 10 min.).

Collection and storage of blood samples

Blood samples were collected in Vacutainer tubes (Becton Dickinson UK Ltd, Plymouth, England) without anticoagulant, were immediately centrifuged and the serum was stored at -20°C for further biochemical analysis of CKmb mass and troponin I. troponin analysis was performed by chemo-luminescence in equipment Immulite (DPC – Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, USA). The CKmb mass analysis was performed by automated kinetic method, in equipment Integra 700 (Roche Diagnostic Systems, Basel, Switzerland).

The blood samples for lymphocyte evaluation were collected and stored in Vacutainer tubes containing K₃EDTA (tripotassic ethylene diamino tetra-acetic acid) at room temperature until it was processed in a period of less than 24h. Direct immunofluorescent technique was undertaken, using FITC, PE and PErCP with fluorochromes in panel with the following surface markers: CD3, CD25, CD45, CD26, CD69. The samples were incubated with fluorescent monoclonal antibodies, lysed (FACS Lysing Solution), washed and resuspended in para-formaldehyde 0.1% for further analysis in flow cytometry (BD FACS Calibur, San Jose, USA) and data was analyzed in the Cell Quest software.

For the analysis of the expression of annexin V, a kit for apoptosis detection through FITC (fluorescein isothiocyanate) was utilized, containing the following components: annexin V-FITC, a coloring solution of propidium iodide (PI) and a buffer to bind to annexin V, concentrated 10 times. The process of coloring had the following approach: cells were washed twice with PBS (phosphate buffered saline) chilled and then resuspended once in a fixation buffer in the concentration of 1×10^2 cells/ml, then 100 μ L from the solution (1×10^5 cells) were transferred for a 5 ml culture tube. Into that tube, 5 μ L of of annexin V-FITC and 5 μ L of PI were added. The cells were smoothly agitated and were incubated for 15 minutes in refrigerated tube at 25° C in the dark and 400 μ L of buffer were added, diluted one time for each tube. Flow cytometry analyses were performed within an hour.

Statistical analysis

Continuous variables were described by mean \pm standard deviation or median (interquartile amplitude: P25-P75). The categorical variables were described by frequencies and percentages. The comparison between the groups CO and OxVAS in the baseline was performed using chi-square test for categorical variables and Student *t* test for continuous variables. In order to analyze the continuous variables over time and to compare the groups CO and OxVAS, the analysis of variance (ANOVA) for repeated measures with double classification factor (between subjects factor) was utilized. Variables with asymmetrical distribution received logarithmic transformation before ANOVA was performed. The location of statistically significant differences was carried out by test of multiple comparisons based in orthogonal contrasts procedure. A significance level of $\alpha=0.05$ was adopted. The data were analyzed with the aid of the SPSS Software (Statistical Package for the Social Sciences) version 11.0 and Sigma Plot v2.0.

RESULTS

Clinical and surgical characteristics

Twenty individuals, 10 utilizing CO and 10 utilizing OxVAS, participated in the study. Patients' mean age was $58 \pm 8,8$ years, 15 were men (75%) and 19 were white (95%) with body mass index of (BMI) of $27,3 \pm 2,8$. All patients were considered with low surgical risk [46]. Both groups were similar regarding clinical and surgical variables in the study period, as seen in Table 1.

Table 1. Demographic characteristics and pre, trans and post-operative variables.

Variable	CPB with CO (n=10)	CPB with OxVAS (n=10)	P
Age (mean \pm SD)	59.8 \pm 9.1	56.1 \pm 8.4	0.359
Males (%)	8 (80%)	7 (70%)	0.605
Caucasians n (%)	10 (100%)	9 (90%)	0.340
Previous Myocardial Infarction n (%)	6 (54.5)	4 (40)	0.653
Congestive Heart Failure I-II n (%)	0 (0)	2 (20)	0.470
Hypertension n (%)	5 (50)	6 (60)	0.653
COPD ^a n (%)	1 (10)	2 (20)	0.531
Diabetes Mellitus n (%)	4 (40)	6 (60)	0.371
Peptic Disease n (%)	3(30)	2 (20)	0.605
Peripheral Vascular Disease n (%)	2 (20)	2 (20)	1.000
Other co-morbidities (%)	6 (60)	4 (40)	0.470
Body Mass Index (mean \pm SD)	27.8 \pm 3.0	26.9 \pm 2.64	0.475
Mortality Risk (%)	0.8 \pm 0.44	0.9 \pm 0.4	0.601
Trans-operative variables			
Surgery duration (mean \pm SD) (min)	309.5 \pm 44	289.5 \pm 38	0.290
CPB duration ^b (mean \pm SD) (min)	72.1 \pm 24.3	64.7 \pm 11.8	0.398
Aortic clamping duration (média \pm DP) (min)	55.7 \pm 23.6	45.6 \pm 10.5	0.232
Bleeding (mean \pm SD) (ml)	665 \pm 436	656 \pm 290	0.957
Transfusion (mean \pm SD) (ml)	184 \pm 320	280 \pm 299	0.498
Post-operative variables			
ICU admission duration ^c (mean \pm SD)	60.5 \pm 38.1	50.3 \pm 8.2	0.420
Number of grafts (mean \pm SD) (n)	3.4 \pm 0.8	3.3 \pm 0.7	0.354
Bleeding (mean \pm SD) (ml)	626 \pm 389	820 \pm 478	0.333
Transfusion (mean \pm SD) (ml)	182 \pm 246.5	167.9 \pm 284	0.905
Peak CK-MB Mass (median \pm II ^d) (ng/ml)	12.5 (8.9-33.3)	14.5 (8.8-26.4)	0.815
Peak Troponina I (median \pm II ^d) (ng/ml)	1.3 (0.88-9.75)	1.9 (0.98-6.85)	0.820

^aCOPD – chronic obstructive pulmonary disease; ^bCPB – cardiopulmonary bypass; ^cICU - intensive care unit;

^dII – Interquartile interval 25 - 75%);

Parameters analyzed from both oxygenators in the trans-operative period

Arterial blood gases, glycemic control and serum potassium were not different between the two groups. The CPB total blood flow in both groups were identical despite the blood flow through the veno-arterial shunt was of $30.9 \pm 8.5\%$. The venous O₂ saturation was lower in the CPB with OxVAS although not statistically significant, while the arterial O₂ saturation was significantly lower in the OxVAS group ($P < 0.001$) (Table 2).

Table 2. Comparison between both types of oxygenators in regards to cardiopulmonary bypass variables.

Variables	CO ^a	VASC ^b	P
CPB total blood flow (l)	4266±376	4363±277	0.52
Short circuit total blood flow (l)	0	1346±269	-
Short circuit flow (%)	0	30.9±6.0	-
O ₂ venous saturation ^c (%)	75.23±2.87	67.25±2.1	0.001
O ₂ arterial saturation (%)	99±0.6	95.5±1.5	<0.001

^a Conventional oxygenator; ^b Oxygenator with veno-arterial short circuit; ^c Oxygen

Myocardial Injury Markers

CK MB Mass and Troponin I – The baseline concentrations were within the normal limits. Twenty-four hours after CPB, CK MB mass and troponin I were not significantly different between the groups ($P=0.909$). The peak values of both injury markers CKmb and troponin I ruled out the diagnosis of trans-operative myocardial infarction in the first twenty-four hours post-CPB [30] Table 1.

Markers of Identification, Activation and Apoptosis of T Lymphocytes

Profile of T lymphocyte markers of identification, activation and apoptosis is described in Table 3.

Table 3. Follow up data from lymphocyte T markers of identification, activation and apoptosis distributed by type of oxygenator.

Markers (%)	Study Group	Anesthetic Induction	Start of CPB	End of CPB	6 h Post-CPB	12 h Post-CPB	24 h Post CPB	P Time	P Ox
mean ± SD									
CD3	CO	77.2±6.1	76.1±7.1	73.2±9.2	55.1±13.6	55.5±12.3	62.53±13.2	<0.001	0.589
	VASC	73.7±6.4	79.3±5.3	73.8±9.3	54.0±11.4	53.1±13.5	64.1±10.8		
CD26	CO	35.2±7.2	32.9±6.4	27.5±8.0	21±10.7	20.0±9.3	26.6±11.7	<0.001	0.925
	VASC	36.0±8.8	35.7±13.6	30.8±14.5	23.9±7.3	22.2±6.6	28.5±7.9		
CD69	CO	10.4±8.18	10.0±3.58	13.6±7.5	25.5±10.1	16.32±6.3	15.8±10.41	<0.001	0.055
	VASC	7.1±4.1	6.3±3.0	6.5±3.1	14.0±4.9	12.5±5.1	7.4±2.8		
Median (I.I.)*									
CD25	CO	7.2 (4.2-10.3)	6.6 (5.4-8.6)	6.3 (4.3-7.6)	5.2 (2.8-10.0)	7.6 (3.6-11.6)	10.7 (4.7-13.3)	0.027	0.763
	VASC	14.7 (7.2-18.6)	8.7 (3.7-13.6)	7.9 (3.2-11.3)	6.5 (4.0-10.0)	8.3 (5.4-10.1)	10.75 (5.9-16.5)		
ANNEXIN V	CO	3.7 (2.7-10.2)	3.3 (1.7-6.5)	4.4 (1.0-6.9)	2.8 (0.7-5.0)	2.8 (0.8-3.5)	1.2 (0.8-2.7)	<0.001	0.271
	VASC	6.9 (3.7-13.5)	3.7 (1.2-15.3)	6.2 (1.8-8.4)	2.3 (0.8-6.4)	2.6 (0.4-6.1)	4.8 (1.6-9.1)		

Normally distributed data are expressed as mean ± SD and non-parametric data as median *(Inter-quartile Interval 25-75%). The markers' units are expressed as percentage (%).

Markers of Identification

Expression of CD3+ - There was a significant decrease in the percentage of the surface marker CD3 expression over time, (P<0.001), but without significant difference between the groups with CO or OxVAS (P=0.589). Compared with baseline values (at the time of anesthetic induction), there was a decrease in the expression of this marker up to 12 hours post CPB in both groups. There was a significant decrease in the expression of CD3 at six, 12 and 24 post CPB, considering mean values from the group of patients as a whole, when compared with baseline values (P<0.001) (Multiple comparisons test based on orthogonal contrasts procedure). (Figure 1).

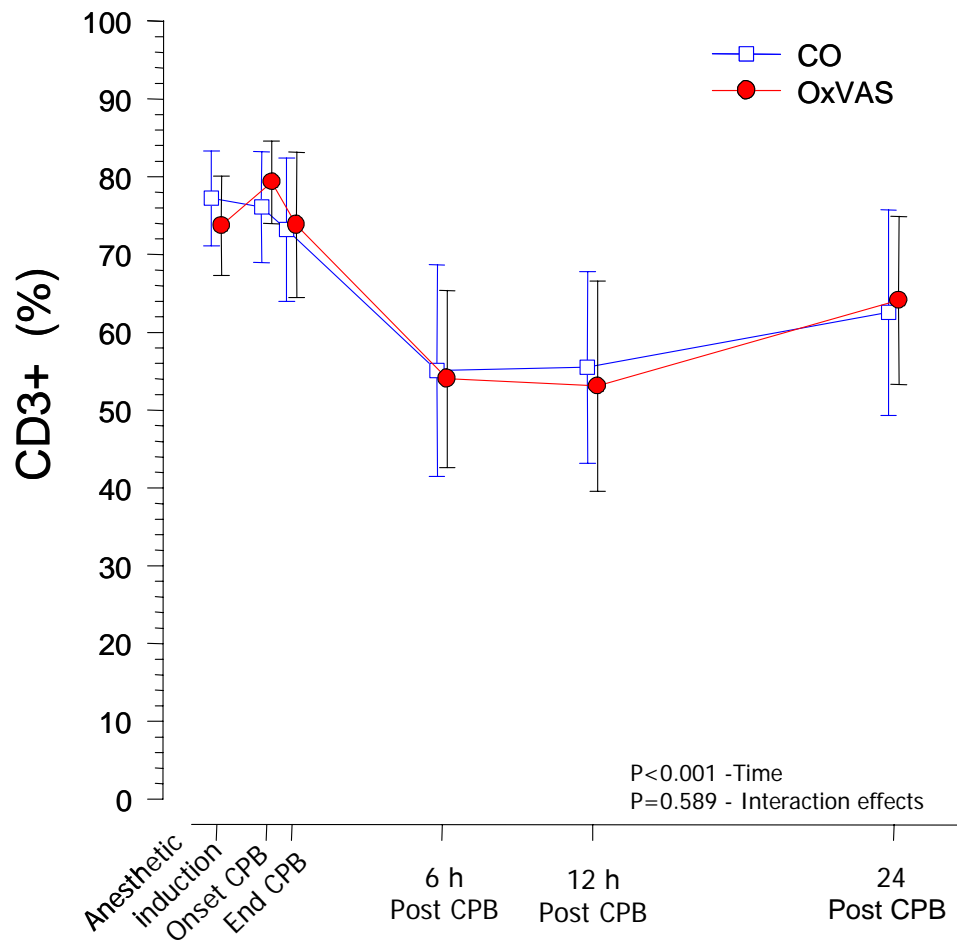


Figure 1. Variation of Lymphocyte T CD3 expression profile in both groups, over time (P, 0.001, ANOVA, time) and between groups (P-0.589 ANOVA, interaction).

Expression of CD45+ - The analysis of this pan-leukocitary marker, showed that nearly 100% of the sample was constituted of lymphocytes (data not shown). On the temporal evolution there was a decrease of this marker expression after the initiation of CPB and a slight increase at the twelfth hour, with both groups presenting similar behavior. (P=0.522).

Activation Markers

Expression of CD25+ - There was a non-significant decrease in the percentage of expression of this marker in the sixth hour post-CPB. There was no difference between the groups over time as well (P=0.763).

Expression of CD26+ - There was a fall in the initial expression of this marker until the twelfth hour post-CPB, returning to baseline value at 24h post-CPB. Similar profile was observed throughout the study in both groups. (P=0.925).

Expression of CD69 + - There was a significant change in the expression of this marker over time in both groups of the study, occurring an increase in the percentage of activated lymphocytes up to twelfth hour post-CPB. When compared to baseline values at 6th (P <0.001) and at 24th (P=0.03) there is a significant decrease in mean values from the group of patients as a whole according to multiple comparisons test based on orthogonal contrasts procedure, and a decrease at the 24th hour. There was a trend towards a greater inhibition of the lymphocyte activation in the group with OxVAS (P=0.055) (Figure 2).

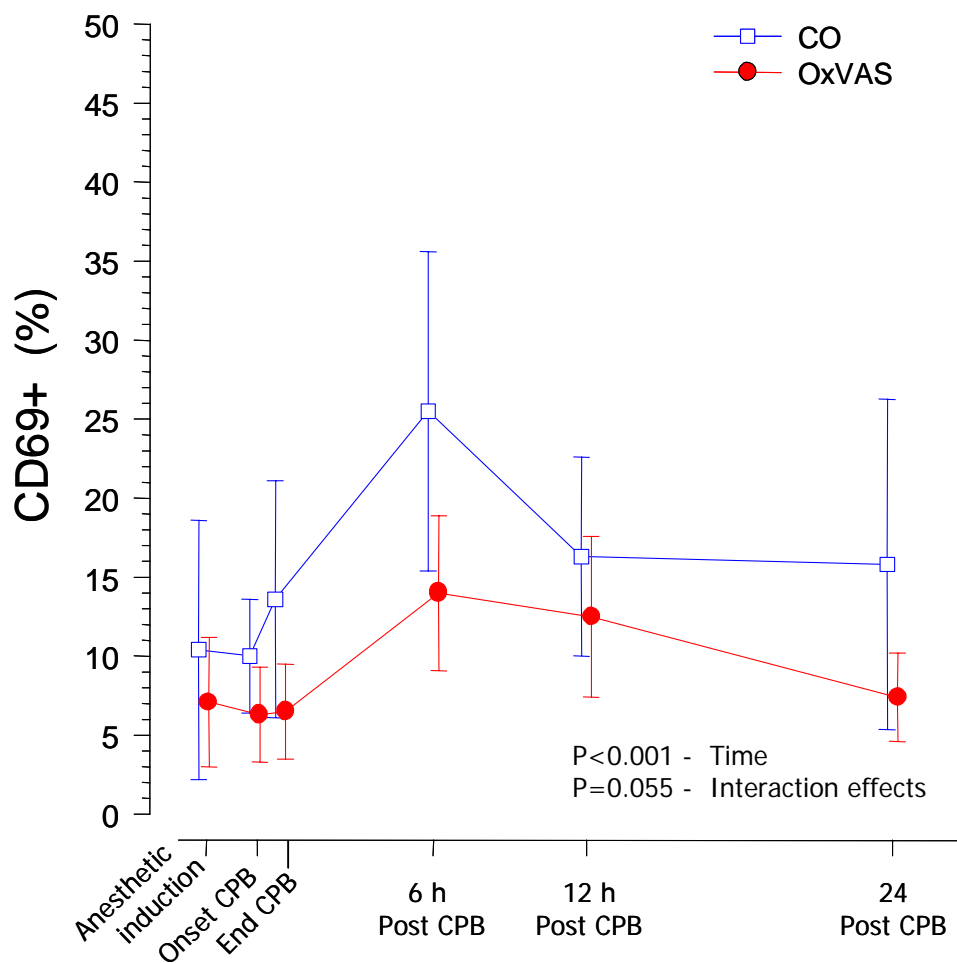


Figure 2. Variation of expression of the lymphocyte activation values of CD69 + over time ($P < 0.001$, ANOVA, time) and comparing the two groups of oxygenators ($P = 0.055$, ANOVA, interaction).

Marker of apoptosis

Expression of Annexin V – Annexin V expression was similar in both groups ($P = 0.271$). There was a significant fall in the expression of this marker over time in both groups ($P < 0.001$). When compared to baseline values there is a significant decrease at 6th, 12th and 24th hour ($P < 0.001$) and at 24th ($P = 0.03$) considering mean values of the group of

patients as a whole according to the multiple comparisons test based on orthogonal contrasts procedure (Figure 3).

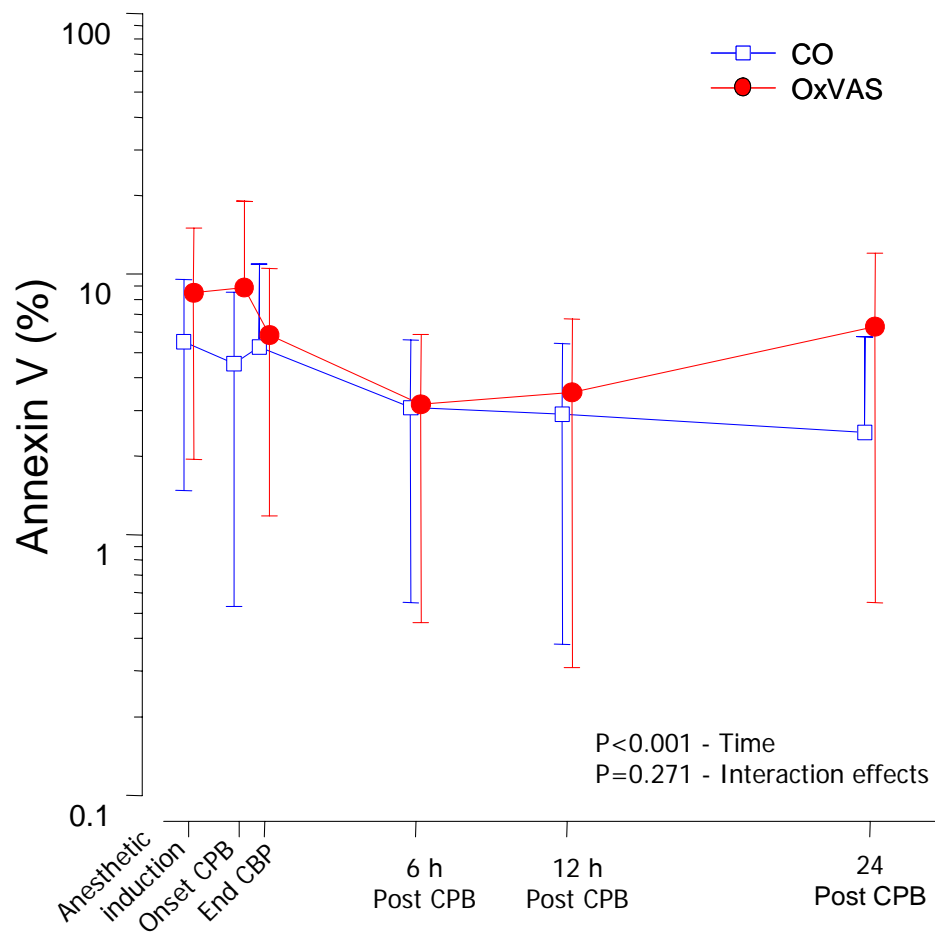


Figure 3. Variation of the expression of annexin V comparing two groups of oxygenators ($P<0.001$, ANOVA, time), and over time ($P=0.271$), ANOVA, interaction).

Leukocytes and lymphocytes

There was a significant elevation in the number of leukocytes over time in both groups ($P < 0.001$), reaching peak values in the sixth hour post-CPB with either type of oxygenator CO and OxVAS, 16363 ± 5005 leukocytes/mm³ and 13857 ± 2954 leukocytes/mm³, respectively, compared to baseline 6948 ± 2248 and 6269 ± 2377 leukocytes /mm³, respectively. There was a trend to a lower level in the 24th hour post-CPB, with no statistically significant difference between the groups. ($P = 0.778$). The lymphocytes showed progressive decrease in absolute number throughout the study in both oxygenator groups when compared to baseline values, 2110 ± 611 and 2010 ± 1118 lymphocytes/mm³ at baseline and 1132 ± 418 and 1015 ± 446 lymphocytes /mm³ at the 24th hour post CPB, with no statistically significant difference between the groups ($P = 0.745$). Figure 4 illustrates the profile of lymphocytes variation as well as the expression of annexin V, showing a significant reduction over time in all patients as a whole, since there was no difference between the two groups of oxygenators.

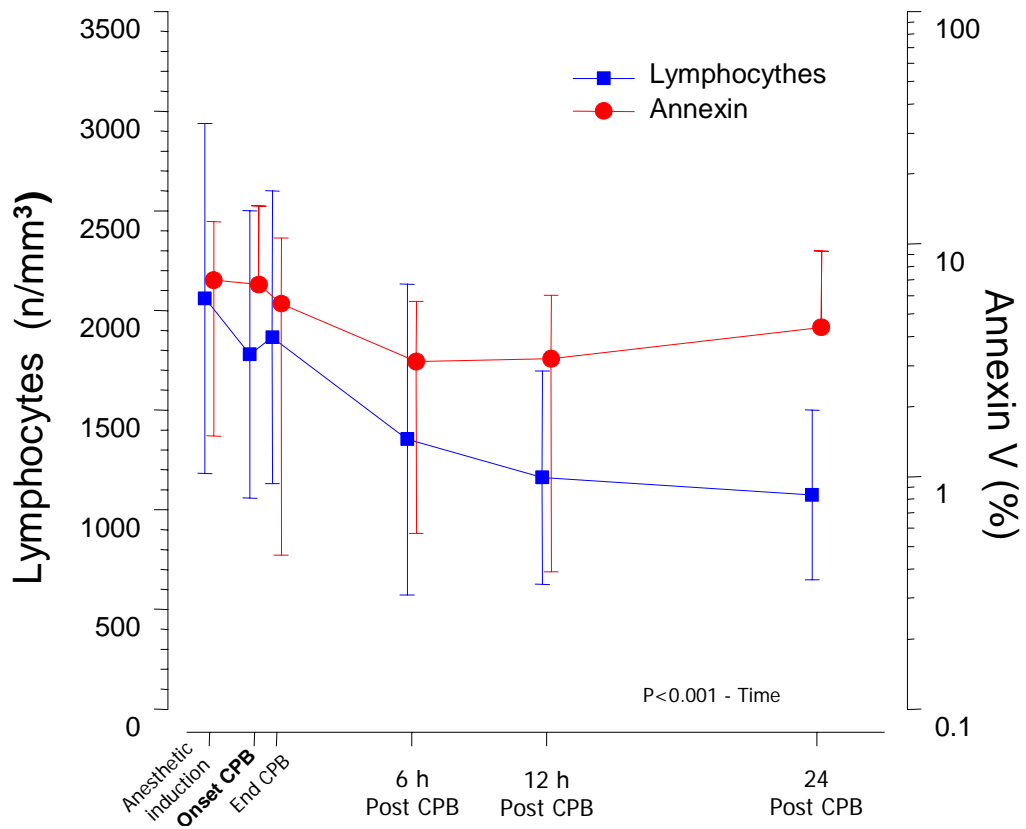


Figure 4. Variation of lymphocytes profile and annexin V expression ($P < 0.001$, ANOVA, time) in the two groups of oxygenators.

DISCUSSION

This clinical trial has shown no difference in the early activation of acquired immune system and of lymphocyte apoptosis in patients submitted to CABG surgery with CPB when comparing a CPB machine with conventional membrane-oxygenator and one with a veno-arterial shunt. The lymphopenia observed in the post-operative period seemed not to be related to apoptosis.

Clinical characteristics of the patients

Patients from both groups were similar in all variables of the study such as comorbidities, systolic function or myocardial injury, CPB duration, ischemic time and duration of surgery, amount of bleeding and transfusion and anesthesia technique. Steroids, aprotinin, or any other drug with potential influence on immune activation were used [31-33]. The study population comprised a group of low surgical risk, which could have attenuated the magnitude of the immune response. On the other hand, if higher risk patients were included, other confounders involved in the pathophysiological process could jeopardize the study analysis.

Trans-operative parameters

Parameters such as total blood flow, venous and arterial oxygen saturation directly measured through blood gas analysis and oxymetry and the relative shunt through the veno-arterial shunt were analyzed, since they could potentially alter the immune response. As expected, there was a difference in the arterial oxygen saturation in the group of patients using a veno-arterial shunt (OxVAS). The OxVAS promotes a shunt of up to 50% of the venous blood into the arterial bed, decreasing the blood exposition time to the CPB non-endothelial surfaces [34]. In our study, the mean percentage of blood shunt was 30.9%. In the conventional oxygenator, the total blood flow passes through the oxygenator. Therefore, when using the veno-arterial shunt, the arterial oxygen saturation, was significantly lower than using the conventional one. In two prior studies, the percentages of arterial oxygen saturation were similar to those observed in our study [34, 35]. The percentage of blood diverted through the shunt in these two prior studies were 40 to 50%, which is higher than in the present study (30.9%). These two observational studies however, studied exclusively the physiological changes and clinical outcomes [34, 35]. As far as we know, we could not find any study comparing this particular oxygenator technology with the conventional one in regards to the immune response.

Identification markers of lymphocytes

In order to identify the acquired immune response in the investigated cells, two surface markers were analyzed: CD45+ and CD3+. The CD45+ is a pan-leukocytary surface marker. In this study, the CD45+ corresponds to the total lymphocyte population. The CD3+ identifies T lymphocytes. Analysis by flow cytometry shows that 85% of the total sample of CD45+ labeled lymphocytes are actually T lymphocytes (70%), of these 51% are lymphocytes Th and 19% lymphocytes Tc [21]. These data are important since the analysis of the activation marker, CD69+, and of apoptosis, annexin V, was carried out with CD45+ cells, therefore predominantly studying T lymphocytes.

Activation markers

Expression of CD69+ - We demonstrated an early lymphocyte activation, predominantly of T lymphocytes, judging by the increased expression of CD69+, that reached its peak in the sixth hour after CPB, and normalizing in the 24th hour after CPB, being this elevation significant in the hours 6 and 12. We suggest that this early activation of CD69+ allows evaluation of early events in the lymphocyte activation, since it is the first surface marker to be expressed in the T cells activation process and is detectable within an hour after the T lymphocyte receptor binds to CD3+ complex. As soon as it is expressed, the CD69+ acts as a co-stimulatory molecule in the activation and proliferation of T lymphocytes [36]. It is suggested that this early activation of CD69+ would be a precursor

of a sequential immunoinflammatory process, which would end up in lymphocyte apoptosis and consequently in post-operative lymphopenia [28]. Shimaoka et al. analyzing a patient population with esophagus neoplasia and cardiac surgery within seven day post-op follow-up, reported an increase in the expression of CD69+ in the second day, that stabilized at the fifth day and started to decrease in the seventh day. This was the first study that, utilizing CD69, showed an early activation of T lymphocytes immediately after CPB. The reason for the discrepancy between these data and the previous study that showed a diminution in the lymphocytes activation after surgery [37] may be attributed to the approach and to the marker utilized. The precocity of analysis by flow cytometry with the surface marker CD69+, which reflects with greater accuracy the real clinical situation and uses whole blood, allowing the analysis in the presence of other inflammatory cytokines that sustain the activation, would have accounted for this difference. Our results, using the same approach as Shimaoka and collaborators overlap their results, demonstrating an early activation up to 12 hours post CPB. After this point, we observe a decrease in the expression of the CD69+. In comparison to baseline, there was an increase in the expression of the CD69+ in the hours 6 and 12 after CPB, with a peak at the sixth hour. In the study of Shimaoka and collaborators, the expression of the CD69 increased up to the fifth day post-operative in comparison to baseline. We believe that this difference occurred due to the sample profile (patients with esophageal surgery and valvular surgery). In a study with the same selection criteria, with low-risk profile and same kind of surgery (CABG) the expression of CD69+ was similar [29].

Although we could not find statistical significance in the comparison between the two groups of oxygenators, we found a trend towards minor activation of CD69+ in the

group that used OxVAS, which was constant from baseline up to the 24th hour post-CPB, suggesting perhaps a type II error.

Expression of CD26+ - In our study there was a reduction of the expression of this marker which is an exopeptidase found on the membrane of activated T and B cells. This data demonstrate a non-activated cell, in contrast to what was observed in the CD69+'s profile. These results could be related to the concept of pro and anti-inflammatory response in a given scenario, where a pro-inflammatory response would be counterbalanced by an anti-inflammatory compensatory response [38]. As part of this process, there are pro-inflammatory cytokines such as IL-6, IL8 and TNF- α and IL-1 β and anti-inflammatory cytokines such as IL-10, IL-4 and 39 IL-5 [39]. In the context of surface markers, the behavior of this marker would be anti-inflammatory.

Expression of CD25+ - In this study the expression of CD25+ presented a reduction over time, characterizing a no lymphocyte activation, since this is a IL-2 receptor that is found in activated T cells. An early lymphocyte activation would be triggered by IL-2, interferon- γ , and macrophages stimulation factor. It is known that synthesis of IL-2 is markedly diminished in the post-operative phase, since it has the function to promote the proliferation of T lymphocytes and to increase the production of immunoglobulins by the B lymphocytes [40]. Its depression would increase the risk of opportunist infection. In this study we did not measure the production of IL-2, but its receptor in the T cells. In the immunoinflammatory environment, the expression of the receptor leads one to estimate the

existence of the agonist molecule, allowing to infer that in the context of our study there would have been a reduction of the production of IL-2 acting as down regulation mechanism of activation of the acquired immune system.

Marker of apoptosis

The results of this study have shown no difference in the expression of annexin V between the two groups of oxygenators, demonstrating that the inhibition of lymphocyte apoptosis was not influenced by either type of oxygenators evaluated. Apoptosis of the innate immunity is a process well known in the cardiac surgery with CPB; while apoptosis involving the acquired immunity, has been only recently investigated [22, 28]. Early activation of T lymphocytes characterized by the expression of CD69, seems to be well established in the CPB context [28, 29, 41], and some authors suggest that such a finding is associated with the lymphocyte apoptosis process in the cardiac surgery with CPB [22, 28]. However, there is no objective data to support such concept, since some studies with annexin V expression (a sensitive marker of apoptosis) have not been described yet in the literature to allow for speculation over the mechanisms implied in the postoperative lymphopenia. Finally, in the present study there was no evidence, up to 24 hours after the CPB, that the activation of the CD69+ precedes the process of lymphocyte apoptosis as it has been speculated.

Lymphopenia and apoptosis

This study does not suggest that the postoperative lymphopenia occurs due to apoptosis, as it is speculated in the literature [22,28]. Lymphopenia occurred since the

beginning of the CPB and remained steady until the twentieth fourth hour, last moment of our assessment. The expression of annexin V showed a reduction of 50% in relation to the baseline value (at the end of CPB) until the twentieth fourth hour. Therefore, in this study, we demonstrated a reduction of the expression of annexin V as well as a fall in the number of lymphocytes, suggesting that the observed lymphopenia could be due to a mechanism other than apoptosis. Otherwise, we would expect an increase in the annexin V expression in the lymphocyte population undergoing apoptosis.

Study Limitations

Our study has evaluated only the first 24 hours after CPB and included only low risk patients, without postoperative complications and with good preoperative functional capacity (NYHA classes I –II). An increase in the observation time, including higher risk patients and those with postoperative complications, would increase the chance of detecting a more prominent activation of apoptosis or the results could be different. Moreover, the short time of the study could have excluded phenomena that would occur later on. Other studies analyzing the acquired immune response in the long term, in an artificial heart model for instance, demonstrated a gradual change in the cellular immunity by T lymphocyte activation, inducing apoptosis, as expressed by annexin V and CD95+, which was associated with an increased number of opportunist systemic infections [42, 43]. Finally, the present study does not allow us to establish a cause-effect relationship between the studied phenomena, but it does suggest associations that can be tested in further mechanistic studies.

CONCLUSIONS

This study has demonstrated that the use of a membrane oxygenator with a veno-arterial shunt, with a shunting flow of up to 30% of the venous blood and use of pure oxygen, is associated with early activation and an inhibition of lymphocyte apoptosis identical to what was found with a conventional oxygenator. Moreover, our data suggest that mechanisms other than apoptosis might be involved in the observed postoperative lymphopenia in either group of oxygenators, since we could not demonstrate lymphocyte apoptosis in our subjects.

REFERENCES

1. Butler J, Rucker GM, Westaby S. Inflammatory response to cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1993;55:552-9.
2. Herskowitz A, Mangano DT. Inflammatory cascade: a final common pathway for perioperative pathway. *Anesthesiol* 1996;85:957-60.
3. Cremer J, Martin M, Redi H, et al. Systemic inflammatory response: syndrome after cardiac operations. *Ann Thorac Surg* 1996;61:1714-20.
4. Galley HF, Webster NR. The immuno-inflammatory cascade. *Brit J Anaesth* 1996;77:11-6.
5. Taylor KM. SIRS -The Systemic Inflammatory Response Syndrome after cardiac operations. *Ann Thorac Surg* 1996;61:1607-8.
6. Hall RI, Smith MS, Rucker G. The systemic inflammatory response to cardiopulmonary bypass: pathophysiological, therapeutic, and pharmacological considerations. *Anesth Analg* 1997;85:766-82.
7. Gomes WJ, Silas MG, Lopes MG, et al. Síndrome vasoplégica: nova forma de síndrome pós perfusão. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 1996;1:39-43.

8. Brasil LA, Gomes WJ, Salomão R, Buffolo E. Inflammatory response after myocardial revascularization with or without cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1998;66:56-9.
9. Savaris N, Polanczyk C, Clausell N. Cytokines and troponin-I in cardiac dysfunction after coronary artery grafting with cardiopulmonary bypass. *Arq. Bras Cardiol* 2001; 77:114-9.
10. Edmunds LH Jr . Inflammatory response to cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1998;66:12-6.
11. Moura HV, Pomerantzeff PMA, Gomes W J. Síndrome da resposta inflamatória sistêmica na circulação extracorpórea: papel das interleucinas. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 2001;16:376-87.
12. Fransen E, Maessen J, Dentener M, Senden N, Geskes G, Buurman W. Systemic inflammation present in patients undergoing CABG without extracorporeal circulation. *Chest* 1998;113:1290-5.
13. Matata BM, Sosnowski AW, Galiñanes M. Off-pump bypass graft operation significantly reduces oxidative stress and inflammation. *Ann Thorac Surg* 2000;69:785-91.

14. Ascione R, Lloyd CT, Underwood, MJ, Lotto AA, Pitsis AA, Angelini GD. Inflammatory response after coronary revascularization with or without cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 2000;69:1198-1204.
15. Czerny M, Baumer H, Kilo J, et al. Inflammatory response and myocardial injury following coronary artery bypass grafting with or without cardiopulmonary bypass. *Eur J Cardio-thorac Surg* 2000;17:737-42.
16. Buffolo E, Andrade JCS, Branco JNR, Teles CA, Aguiar LF, Gomes, WJ. Coronary artery bypass grafting without cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1996;61:63-6.
17. Kirklin JK, Westaby S, Blakstone EH, et al. Complement and the damaging effect of cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1983;86:845-57.
18. Kirklin J. Prospects for understanding and eliminating the deleterious effects of cardiopulmonary bypass [editorial comment]. *Ann Thorac Surg* 1991;51:529-31.
19. Chenoweth DE, Cooper SW, Hugli TE, Stewart RW, Blackstone EH, Kirklin JW. Complement activation during cardiopulmonary bypass: evidence for generation of C3a and C5a anaphylatoxins. *N Engl J Med* 1981;304:497-503.

20. De Angeli S, Paccagnella A, Mordacchini M, et al. The effects of prolonged cardiopulmonary bypass on cell-mediated immunity. *Thorac Cardiovasc Surgeon* 1994;42:14-20.
21. Misoph M, Babin-Ebell J, Schwender W, Grossmann R, Keller F, Elert O. Response of the cellular immune system to cardiopulmonary bypass in vivo. *Thorac Cardiovasc Surgeon* 1997;47:217-23.
22. Markewitz, A, Lante W, Franke A, Marchi K, Kuhlmann WD, Weinhold C. Alterations of cell-mediated immunity following cardiac operations: clinical implications and open questions. *Shock* 2001;16:(Suppl.1)10-5.
23. Ulicny KS, Hiratzka LF. The risk factors of median sternotomy infection: a current review. *J Card Surg* 1991;6:338-51.
24. Gu YJ, Oeveren W, Akkerman C, Boonstra PW, Huyzen RJ, Wildevuur CRH. Heparin-coated circuits reduce the inflammatory response to cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1993;55:917-22.
25. Wendel HP, Ziemer G. Coating-techniques to improve the hemocompatibility of artificial devices used for extracorporeal circulation. *Eur J Cardio-thorac Surg* 1999; 16:342-50.

26. Richter JA, Meisner H, Tassani P, Barankay A, Dietrich W, Braun SL. Drew-Anderson technique attenuates systemic inflammatory response syndrome and improves respiratory function after coronary artery bypass grafting. *Ann Thorac Surg* 1999;69:77-83.
27. DeVroege R, Rutten PM, Kalkman C, et al. Comparação de três oxigenadores de membranas (hollow fiber) disponíveis comercialmente: performance da transferência de gás e biocompatibilidade. *Asaio*, 2001;47:34-44.
28. Shimaoka M, Hosotsubo K, Sugimoto M, Sakaue G, Taenaka N, Yoshia I. The influence of surgical stress on T cells: enhancement of early phase lymphocyte activation. *Anesth Anal* 1998;87:1431-5.
29. Blacher C, Neumann J, Marques ME et al. Cirurgia de revascularização miocárdica sem circulação extracorpórea não reduz a ativação linfocitária. In Congresso da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul, 13., 2002, Gramado. Programa final. Porto Alegre: SCRGs, 2002:34.
30. Antmann EM. Medical management of the patient undergoing cardiac surgery. In Braunwald E. *Heart disease*. 5.ed. Philadelphia:W.B.Saunders, 1997:646-53.

31. Menasché P. The systemic factor: the comparative roles of cardiopulmonary bypass and off-pump surgery in the genesis of patient injury during and following cardiac surgery. *Ann Thorac Surg* 2001;72:S2260-6.
32. Pearl JM, Nelson DP, Schwartz SM, et al. Glucocorticoids reduce ischemia-reperfusion-induced myocardial apoptosis in immature hearts. *Ann Thorac Surg* 2002;74:830-7.
33. Defraigne JO, Pincemail J, Larbuisson R, Blaffart F, Limet R. Cytokine release and neutrophil activation are not prevented by heparin-coated circuits and aprotinin administration. *Ann Thorac Surg* 2000;69:1084-91.
34. Moraes D.J, Moraes MCJ, Dias JRJ, et al. Uso de oxigênio puro e shunt veno-arterial nos oxigenadores de membrana. *R Bras Cir Cardiovasc* 1997;12:77-82.
35. Moraes M, Dias J, Moraes Z, Novaes M, Holanda N, Junqueira D. Perfusion for cardiac surgery using venous arterial shunt and pure oxygen in membrane oxygenators: forty to fifty per cent of the venous blood recirculate and don't pass through the oxygenator. In *World Congress of Cardiology*, 12., Rio de Janeiro, 1998:113-8.
36. Ziegler SF, Ramsdell F, Alderson MR. The activation antigen CD69. *Stem Cell* 1994;12:456-65.

37. Ryhaenem P, Huttunem K, Llonem J. Natural killer cell activity after open heart surgery. *Acta Anaesth Scand* 1984;28:490-2.
38. Bone, RC. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Crit Care Med* 1996;24:1125-8.
39. Franke A, Lante W, Fackeldey V, et al. Proinflammatory and antiinflammatory cytokines after cardiac operation: different cellular sources at different times. *Ann Thorac Surg* 2002;74:363-71.
40. Hisatomi K, Isomura T, Kawara T, et al. Changes in lymphocyte subsets, mitogen responsiveness, and interleukin-2 production after cardiac operations. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1989;98:580-91.
41. Bertho AL, Santiago MA, Coutinho SG. Flow cytometry in the study of cell death. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000;95:429-33.
42. Ankersmit HJ, Tugulea S, Spanier T, et al. Activation-induced T-cell death and immune dysfunction after implantation of left-ventricular assist device. *Lancet* 1999; 354:550-5.
43. Ankersmit HJ, Wieselthaler G, Moser B, Gerlitz S, Roth G, Boltz-Nitulescu G, Wolner E. Transitory immunologic response after implantation of the DeBakey VAD continuous-axial-flow pump. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002;123:557-61.

44. Brasil LA, Gomes WJ, Salomão R, Buffolo E. Ativação de citocina (fator de necrose tumoral α) e resposta clínica induzida pela circulação extracorpórea. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 1996;11:188-200.
45. Brasil LA, Gomes WJ, Salomão R, Fonseca JHP, Branco JNR, Buffolo E. Uso de corticóide como inibidor da resposta inflamatória sistêmica induzida pela circulação extracorpórea. *R Bras Cir Cardiovasc* 1999;14:254-68.
46. O'Connor GT, Plume SK, Olmstead EM, et al. A regional prospective study of in-hospital mortality associated with coronary artery bypass grafting: the Northern New England Cardiovascular Disease Study Group. *JAMA* 1991;266:803-9.

ANEXOS

ANEXO I - FICHA DE RANDOMIZAÇÃO E AVALIAÇÃO PRÉ – OPERATÓRIA

Nome:

Registro:

Sexo:

Idade:

Pcte Nº:

Grupo

Com CEC convencional ()

Com CEC + Shunt ()

FE % pelo Cateterismo:

IAM Prévio: () Sim () Não

Risco Cirúrgico:

Peso:

Altura:

Patologia associadas:

DBPOC ()Outros () Quais:DM ()Doença Péptica ()HAS ()Doença Vascular periférica ()**Critérios de Exclusão****Sim****Não**

- | | | |
|---|-----|-----|
| 1. Cirurgia previa com CEC | () | () |
| 2. História de IAM há menos de 3 meses | () | () |
| 3. Procedimento cardíaco concomitante (troca de válvula, correção de defeitos congênitos, etc.) | () | () |
| 4. Portadores de insuficiência renal (creatinina > 2 mg%) | () | () |
| 5. Portadores de síndrome de imunodeficiência | () | () |
| 6. Corticoterapia crônica ou perioperatória | () | () |
| 7. Fração de ejeção menor que 40% (cineangiocoronariografia) | () | () |
| 8. Infecção ativa | () | () |
| 9. Angina Instável | () | () |
| 10. Insuficiência cardíaca classe III e IV da NYHA | () | () |

Drogas pré – op.*: AAS () Betabloqueador () Antagonista Ca ()
(Sim – S / Não – N / Parou - P)

*Instruções: Suspender AAS 7 dias antes da cirurgia
manter betabloqueador

ANEXO II A- FICHA DE CONTROLE TRANSOPERATÓRIO

*** ATENÇÃO – SE POSSÍVEL NÃO USAR
CORTICÓIDE OU APROTININA OU INDUTORES
DE ATIVIDADE INFLAMATÓRIA***

Nome:

Registro:

Sexo:

Idade:

Pcte N°

Tempos (ficha do anestesista):

Início Cirurgia*	Final cirurgia**	Duração
T. CEC	T. Isquemia	

* na indução anestésica

** fim da sutura da pele

Vasos Revascularizados	Mâmária (M) / Safena (S)
1	
2	
3	
4	
Total	

Intercorrências Transoperatórias:

Coletas de Sangue:

Colheita	Tempo	Horário
A	na indução anestésica	
B	junto com P1 – 10´de perfusão	
C	junto com P2 – 5´após término da perfusão	
D	6 horas após término da perfusão	
E	12 horas após término da perfusão	
F	24 horas após término da perfusão	

**Responsável pelo proces-
samento do sangue:**

Data: Horário:

Nome:

Telefone:

ANEXO II B - FICHA DE CONTROLE TRAN-SOPERATÓRIO

CONTROLE DE PERFUSÃO

Pcte N°:

HORA	FC	PAM	FIO2	FLUXO 1	FLUXO 2	SVO2	SaO2
				Junto P1	Junto P2		

GASOMETRIAS

					Perfusão	Clampeamento	PCR
PH					Entrada: Saída:	Início: Final:	Início:
PCO3							Final:
HCO3					Total:	Total:	Total:
CO2T					Cálculo do % do fluxo Shunt		
BE					Fluxo Shunt = $\frac{\text{Fluxo Shunt Medido}}{\text{Fluxo Total}} \times 100$		
PaO2							
Sat.							
Ht							
Hb							
Na							
K							
G							

Pcte Nº:**ANEXO III - FICHA DE CONTROLE PÓS – OPERATÓRIO UTI**

Nome:

Registro:

Sexo:

Idade:

<i>Chegada na UTI</i> Dia e hora.	<i>Alta da UTI</i> Dia e hora:	<i>Tempo de UTI</i> Dia e hora*:
---	--	--

* Registrar horário da prescrição da alta.

Complicações na UTI:

1) IAM

 sim não

CPK-MB: Troponina I 12 hrs P.O:	Hora e data: Hora e data:
Novas Ondas Q: ECG / data:	Localização ANT () INF () LAT ()
Zonas acinéticas: ECO / data:	Localização ANT () INF () LAT ()

2) Choque (Pressão Sistólica < 80 mmHg; oligo-anúria; má perfusão periférica)

 sim não

└─┬─> Data / Hora:

3) Arritmias com cardioversão elétrica

 sim não

└─┬─> Tipo, data e hora:

4) Reoperação nas primeiras 24 hs do pós-operatório:

 sim não

└─┬─> Motivo e hora:

ANEXO IV - FICHA DE RESULTADOS DOS EXAMES**Pcte N°:**

Nome:

Grupo:

Com CEC convencional () Com CEC + Shunt ()

CD3

medida	data/hora de coleta	valor
TA		
TB		
TC		

medida	data/hora de coleta	valor
TD		
TE		
TF		

CD69

medida	data/hora de coleta	valor
TA		
TB		
TC		

medida	data/hora de coleta	valor
TD		
TE		
TF		

CD25

medida	data/hora de coleta	valor
TA		
TB		
TC		

medida	data/hora de coleta	valor
TD		
TE		
TF		

CD26

medida	data/hora de coleta	valor
TA		
TB		
TC		

medida	data/hora de coleta	valor
TD		
TE		
TF		

CD45

medida	data/hora de coleta	valor
TA		
TB		
TC		

medida	data/hora de coleta	valor
TD		
TE		
TF		

ANEXINA V

medida	data/hora de coleta	valor
TA		
TB		
TC		

medida	data/hora de coleta	valor
TD		
TE		
TF		

CK - Massa

medida	data/hora de coleta	valor
TA		

medida	data/hora de coleta	valor
TF		

Troponina I

medida	data/hora de coleta	valor
TA		

medida	data/hora de coleta	valor
TF		

ANEXO V - CONSENTIMENTO INFORMADO

AUTORIZAÇÃO PARA PARTICIPAR DE UM PROJETO DE PESQUISA

Nome do Estudo: **Papel de Diferentes Oxigenadores na Cirurgia de Revascularização Miocárdica com Circulação Extracorpórea na Ativação e Apoptose Linfocitária**

Responsáveis pelo projeto: Dr Paulo Leães e Dra. Nadine Clausell

1. Objetivos do estudo

A finalidade deste estudo é entender melhor o efeito da circulação extracorpórea (uma máquina usada para manter a circulação do sangue durante a cirurgia) sobre o coração e o resto do organismo nas cirurgias de revascularização miocárdica (pontes de safena e implante de artéria mamária). Para tanto serão coletadas amostras de sangue durante e após a cirurgia para dosar substâncias liberadas durante a mesma e que possam estar relacionadas ao uso de circulação extracorpórea.

2. Explicação dos procedimentos

A cirurgia de revascularização miocárdica pode ser realizada com a utilização de circulação extracorpórea (sistema que substitui o coração e pulmões durante a cirurgia) com oxigenador usual ou modificado com um curto-circuito que desvia o sangue venoso para este não passar pelo oxigenador e possivelmente diminuir a reação inflamatória que a circulação extracorpórea provoca: A escolha do tipo de cirurgia a ser realizado depende de critérios técnicos e da aceitação do paciente.

A sua cirurgia obedecerá todas as rotinas de qualquer cirurgia de revascularização realizada neste hospital. Como parte desta rotina, para acompanhamento da sua pressão arterial, será colocado um cateter na artéria do seu pulso (radial). Este cateter serve também para coletar exames e, através dele serão coletadas 6 amostras de 5 ml de sangue, durante e até 24 horas após a cirurgia.

A sua participação é voluntária e as amostras apenas serão colhidas com o seu consentimento.

3. Possíveis riscos e desconfortos

A presente pesquisa prevê apenas coleta de amostras sangue através do cateter intraarterial, que faz parte da rotina para este tipo de cirurgia, não trazendo qualquer desconforto ou risco acima do habitual.

4. Possíveis benefícios do estudo

A sua participação neste estudo não lhe trará qualquer benefício pessoal mas possibilitará um melhor conhecimento sobre os efeitos da circulação extracorpórea, podendo melhorar as condições dos pacientes operados no futuro.

5. Exclusão do estudo

O investigador responsável poderá excluí-lo do estudo, sem o seu consentimento, quando julgar necessário.

6. Direito de desistência

O senhor pode desistir de participar do estudo em qualquer momento. Sua decisão de não participar, ou de abandonar o estudo depois de iniciado, não afetará de nenhum modo o seu atendimento posterior pela equipe médica.

7. Sigilo

Todas as informações obtidas neste estudo, bem como as constantes do prontuário hospitalar do paciente poderão ser publicados apenas com finalidade científica, mantendo-se o anonimato.

8. Indenizações e ressarcimentos

Não estão previstos ressarcimento para cobrir despesas inerentes ao estudos por não haver programação deste tipo de despesa ou indenizações por eventuais danos decorrentes à pesquisa por serem os procedimentos da mesma isentos de risco acima do habitual para cirurgias de revascularização miocárdica.

9. Consentimento

Declaro ter lido, ou que me foram lidas, as informações acima antes de assinar este formulário. Foi-me dada ampla oportunidade de fazer perguntas, esclarecendo plenamente minhas dúvidas. Estou ciente que, se persistirem quaisquer dúvidas, poderei contatar os médicos responsáveis pelo presente projeto, pessoalmente no Centro Médico do Hospital São Francisco/ Santa Casa de Porto Alegre ou através do telefone 3225-3019.

Por este instrumento, concordo voluntariamente em participar do presente estudo.

Porto Alegre, de de 2002.

.....
Assinatura do paciente

.....
Assinatura do pesquisador responsável

