

**mUniversidade Federal do Rio Grande do Sul**  
**Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cardiologia**

**Ativação Linfocitária Durante a**  
**Cirurgia de Revascularização Miocárdica:**  
**Papel da Circulação Extracorpórea**

**Celso Blacher**

**Orientador: Prof. Dr. Jorge Pinto Ribeiro**

*Tese de Doutorado apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Medicina: Cardiologia  
para obtenção do título de Doutor em Cardiologia*

**Porto Alegre**  
**2002**

“Unidade não significa uniformidade, e identidade é compatível com mudança”

Jacques Barzum

Da Alvorada à Decadência, 2002

## AGRADECIMENTOS

O cuidado dos pacientes submetidos à cirurgia cardíaca, tarefa a que tenho me dedicado nos últimos anos, tem sido para mim extremamente estimulante. Ele agrega muito dos mais recentes avanços da medicina atual e exige a atuação de múltiplos profissionais médicos e de áreas afins de forma coordenada e com afinidade de propósitos. A especialização e a capacidade de trabalhar em equipe são as características diferenciais da Medicina das últimas décadas, que permitiram que fossem agregados à rotina de atendimento assistencial, procedimentos como a própria cirurgia cardíaca, os transplantes de órgãos, a terapia intensiva e tantos outros processos diagnósticos ou assistenciais, inimagináveis há bem pouco tempo atrás.

Uma tese de doutorado, realizada dentro da atividade diária de um serviço de cirurgia cardíaca, representa um estágio elevado de amadurecimento da sua estrutura, e mostra sua capacitação para, além de prestar assistência eficiente aos pacientes que dele se servem, gerar conhecimentos que possam beneficiar a comunidade. Não poderia, dentro deste contexto, um trabalho científico como o que agora se conclui, ser gerado apenas pelo esforço individual de uma pessoa. Ele é fruto da comunhão de esforços de vários profissionais. Coube-me a satisfação de poder coordenar este trabalho e ver que novamente chegamos com sucesso à nossa meta.

Acompanharam-me nesta trajetória, pessoas com quem trabalho diariamente há muitos anos, nos quais criamos vínculos pessoais e profissionais extremamente fortes. Também participaram profissionais com quem tive oportunidade de estreitar o relacionamento somente a partir desta nova proposta. Estes, não só me enriqueceram com seu

conhecimento e seu apoio, como proporcionaram a satisfação de um contato pessoal amistoso e solícito, que levo como uma das minhas mais valiosas conquistas.

Entre as muitas pessoas e entidades que me auxiliaram, gostaria de agradecer especialmente:

Ao Dr. Jorge Pinto Ribeiro, meu orientador, pelas opiniões sempre muito importantes, pela segurança que me transmitiu e, muito especialmente pelo seu entusiasmo, que me contagiou.

Ao Dr. Jorge Neumann cujo conhecimento da área da Imunologia é reconhecido internacionalmente. Sua competência me foi colocada à disposição de forma que transcende ao interesse profissional ou científico e foi imprescindível para que eu pudesse fundamentar meu trabalho em uma área do conhecimento médico, complexa e dinâmica, na qual eu não tinha familiaridade.

Ao Dr. Fernando Lucchese, Chefe do Serviço de Cardiologia do Hospital São Francisco, que, com sua característica marcadamente inovadora, implantou a cirurgia de revascularização miocárdica sem circulação extracorpórea como procedimento de rotina e preferencial em nosso serviço. Dentro de suas atribuições, ele facilitou de todas as maneiras a realização do meu projeto.

Ao Dr. Luiz Alfredo Jung, Chefe do nosso Serviço de Anestesia, que novamente veio me auxiliar quando dele necessitei. O Dr. Jung foi quem me assessorou nos assuntos da minha tese relacionados ao procedimento anestésico. A sua reconhecida competência, o seu envolvimento no controle dos pacientes e na própria realização do trabalho valorizam os resultados obtidos.

Ao Dr. Wagner M. Pereira que emprestou sua experiência no que se refere aos detalhes da técnica cirúrgica da revascularização miocárdica, procedimento que é a base da minha proposta de trabalho.

Aos cirurgiões do Serviço de Cirurgia do Hospital São Francisco, Dr. José Dario Frota Filho e Dra. Marcela Sales que aceitaram incluir na sua elaborada rotina cirúrgica, as exigências sempre impertinentes de um protocolo de pesquisa. O Dr. Dario e a Dra. Marcela incorporaram o trabalho proposto como sendo também deles, como tudo que fazemos juntos, o que para mim espelha a elevada condição profissional que atingiram e a amizade que nos une.

Aos anestesistas, Drs. Daniela F. Jung, Maria Eugênia Marques, Nilton R. Delatorre e Luis Antônio V. Flores, pessoas imprescindíveis na coleta dos dados transoperatórios e que realizaram esta tarefa de forma perfeita, como é o padrão profissional a que estão habituados.

Aos ecocardiografistas Drs. Fábio Canellas, Márcia Puchalski e Neyla Kreling responsáveis pelas medidas ecocardiográficas que, pelas recomendações do protocolo, exigiam técnicas bastante mais trabalhosas e demoradas do que as realizadas na sua rotina.

À acadêmica Brisa Fernandes que me auxiliou na coleta e na tabulação dos dados. Sua dedicação ao projeto me deu a segurança necessária da confiabilidade dos dados. A responsabilidade demonstrada reflete um caráter forte e faz antever uma profissional de futuro muito promissor. Aos acadêmicos Pablo Lorenzoni e Cristiane Egewarth, que participaram da coleta de dados, encontrando espaços entre suas atividades na faculdade ou furtando de seu período de lazer e repouso, muitas vezes na madrugada, para cumprir, sem nenhuma falha, as tarefas a eles determinadas.

Ao Dr. Paulo Leães, meu parceiro em toda a vida profissional, e meus colegas clínicos do Serviço de Cardiologia do Hospital São Francisco, Dr. Eraldo Lúcio, Dr. Carlos Ferreira, Dra. Ângela Bueno, Dra. Ana Paula Magalhães e Dr. Luis Beck da Silva, que me auxiliaram, me estimularam e suportaram a sobrecarga de responsabilidades nos momentos em que necessitei me afastar de minhas tarefas em virtude da tese.

À secretária e acadêmica Fernanda G. Azevedo, que participou da coleta de dados, com dedicação não usual, freqüentemente fora de seu horário habitual, sempre visando colaborar com o encaminhamento do trabalho.

À secretária Luciana M. Rodrigues uma auxiliar extremamente importante na digitação, preparo de todo material impresso e das apresentações.

Às bioquímicas do laboratório de Imunologia da Santa Casa, Dras Raquel Lisiane Canabarro e Eloísa Vieira Sporledere, responsáveis pela parte fundamental do meu estudo, a execução das medidas dos marcadores de ativação linfocitária.

Ao Dr. Carlos Franco Voegeli, Chefe do Laboratório Central da Santa Casa, às bioquímicas Vera Anta Fé e Marisa Kaiser e todos os funcionários de Laboratório, pelo auxílio, presteza e pela gentileza com que fui recebido em todos os muitos contatos que tivemos nestes anos, independente da magnitude da minha necessidade.

À Dra. Lúcia Pellanda, pelo auxílio imprescindível nos cálculos estatísticos e por ter me permitido procurá-la muitas vezes em horários inconvenientes, interrompendo seu trabalho e seu lazer, sem nunca ter modificado a forma extremamente gentil que caracteriza seu comportamento.

À Coordenadora do Programa de Pós Graduação em Cardiologia da FAMED-UFRGS, Dra. Nadine Claussel, pelo apoio que recebi como aluno do Curso. Foi esta uma das muitas

oportunidades em que o Serviço de Cardiologia do Hospital São Francisco e o Serviço de Cardiologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre têm trabalhado juntos nos últimos anos. Uma conjunção de esforços extremamente fértil, não freqüentes em duas Instituições deste porte, que demonstra um elevado estágio profissional e espírito comunitário das pessoas envolvidas.

À Direção da Santa Casa de Porto Alegre, Dr. Olímpio Dalmagro e Dr. Jaques Bacaltchuk, onde tenho encontrado as condições técnicas, o apoio e amizade que me permitiram desenvolver grande parte das tarefas que maior realização profissional me trouxeram, inclusive esta que se encerra.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), pelo apoio financeiro recebido.

Finalmente a palavra de agradecimento à Beth, minha mulher, e às minhas filhas Mariana, Laura e Alice, que formam o núcleo central da minha estrutura pessoal e afetiva, de onde emana a força que me direciona em todas minhas atividades. Novamente, me apoiaram, me incentivaram, abdicaram muitas vezes de momentos mais agradáveis de lazer, e vibraram com o resultado obtido.

## SUMÁRIO

Resumo.....	10
Abstract.....	13
Cirurgia de revascularização miocárdica sem circulação extracorpórea: uma técnica em busca de evidências.....	16
Introdução.....	16
Estudos clínicos.....	17
Resposta inflamatória sistêmica.....	22
Ativação de linfócitos.....	28
Conclusões.....	32
Referências.....	33
Cirurgia de revascularização miocárdica sem circulação extracorpórea não reduz ativação linfocitária: resultados de um ensaio clínico randomizado.....	40
Introdução .....	40
Objetivos .....	45
Pacientes e Métodos .....	46
Resultados .....	54
Discussão .....	64



Conclusões .....	74
Referências .....	75
Anexo 1: Artigo original em inglês .....	84
Anexo 2: Termo de consentimento .....	130

## RESUMO

### **Ativação linfocitária durante a cirurgia de revascularização miocárdica: Papel da Circulação Extracorpórea**

Candidato: Celso Blacher

Orientador: Jorge Pinto Ribeiro

**Introdução:** Sabe-se que a cirurgia de revascularização miocárdica está associada com alteração dos mediadores inflamatórios e da função imunitária, com ativação precoce dos linfócitos que poderia ser responsável pela linfopenia e diminuição da atividade dos linfócitos no pós-operatório. A elevação enzimática está diminuída na cirurgia sem circulação extracorpórea mas este achado não está associado a melhor evolução clínica. Nesta tese, testamos a hipótese de que a cirurgia de revascularização miocárdica realizada sem circulação extracorpórea pode levar a uma ativação linfocitária de menor intensidade do que a cirurgia com circulação extracorpórea.

**Métodos:** A resposta da ativação linfocitária foi estudada durante o período trans e pós-operatório em 28 pacientes randomizados para cirurgia de coronária sem circulação extracorpórea (n=13) ou cirurgia convencional com circulação extracorpórea (n=15), utilizando citometria de fluxo para determinar a expressão de CD25, CD26, CD69 e DR em linfócitos T (CD3+) e B (CD19+), em sangue periférico. No mesmo período foram

realizadas dosagens de troponina I por quimioluminescência e realizado ecocardiograma uni-bidimensional antes e após a cirurgia.

**Resultados:** Não houve diferença estatisticamente significativa para nenhum dos marcadores de ativação linfocitária quando comparados os grupos operados sem ou com circulação extracorpórea (ANOVA bicaudal para medidas repetidas,  $p > 0,05$ ). Considerando todos os pacientes estudados, houve uma elevação da expressão proporcional de CD25 e CD69 em linfócitos T (CD3+) e B (CD19+). Nos linfócitos T, o valor proporcional médio mais elevado ( $\pm$  EP) de CD69 foi observado 6 horas após terem sido completadas as anastomoses ( $+75 \pm 476\%$ ) e CD25 teve uma elevação mais gradual, com o pico de seu valor médio ( $+48 \pm 24\%$ ) ocorrendo 24 horas após a revascularização. Em linfócitos B, o pico do valor médio de CD69 ( $+104 \pm 269\%$ ) ocorreu também após o fim das anastomoses. CD25 teve seu pico de valor médio ( $+150 \pm 773\%$ ) 112 horas após a revascularização e seu último valor medido ainda estava elevado. A expressão de CD26 em linfócitos T teve um aparente declínio nos seus valores proporcionais médios ( $-42 \pm 32\%$ ) 12 horas após o fim das anastomoses. Não houve diferença significativa na elevação enzimática entre os dois grupos (teste estatístico  $> 0,05$ ). No ecocardiograma, o grupo operado sem circulação extracorpórea apresentou diminuição do volume diastólico ( $p=0,001$ ) e da fração de ejeção ( $P=0,012$ ), enquanto no grupo com circulação extracorpórea, diminuíram os volumes diastólico ( $p=0,006$ ) e sistólico ( $p=0,01$ ).

**Conclusões:** 1) Comparando a cirurgia de revascularização miocárdica com circulação extracorpórea, a cirurgia sem circulação extracorpórea não reduz a ativação dos linfócitos. 2) A cirurgia de revascularização miocárdica produz uma ativação precoce dos linfócitos, com aumento da expressão de CD69 e CD25 em linfócitos T (CD3+) e B (CD19+), em

sangue periférico. A elevação precoce de CD69, e elevação mais tardia de CD25, pode indicar duas partes de uma seqüência de ativação linfocitária. 3) O comportamento das enzimas cardíacas e dos achados ecocardiográficos não sugere benefício da cirurgia sem circulação extracorpórea sobre o dano miocárdio.

## ABSTRACT

### **Lymphocyte activation during coronary artery bypass: the role of extra corporeal circulation**

**Doctoral Candidate:** Celso Blacher

**Advisor:** Jorge Pinto Ribeiro

**Background:** Coronary artery bypass surgery is known to be associated with alteration of inflammatory mediators and immune function, with early phase lymphocyte activation, that could be responsible for postoperative lymphopenia and lymphocyte unresponsiveness. There is lower enzymatic elevation in off-pump surgery but it is not associated with better clinical outcome. In this thesis, we test the hypothesis that off-pump coronary bypass surgery might result in less lymphocyte activation than on-pump coronary surgery. The influence of extra corporeal circulation on myocardium is evaluated by the evolution of cardiac enzymes (troponin I) and echocardiographic findings. We also study lymphocyte activation markers behavior during trans and post-operative period.

**Methods:** We studied lymphocyte activation response during the operative and post-operative period in 28 patients randomized to off-pump coronary surgery (n = 13) or conventional on-pump coronary surgery (n = 15) using flow cytometry to determine expression of CD23, CD25, CD26, CD69 and DR on T (CD3+) and B (CD19+) lymphocytes in the peripheral blood. At the same period, blood samples were tested for

troponin I by chemo luminescent method. Uni-bidimensional echocardiograms were done previously and after surgery.

**Results:** There were no significant differences in any of the lymphocyte activation markers off-pump compared to on-pump coronary surgery (2 way ANOVA for repeated measures,  $P > 0.05$ ). Considering all patients studied, there was an elevation of the proportional expression of CD69 and CD25 in T (CD3+) and B (CD19+) lymphocytes. In T lymphocytes, the higher proportional median value ( $\pm$  SE) of CD69 was observed 6 hours after completion of anastomosis ( $+75 \pm 476$  %), and CD25 had a more gradual elevation, with its peak median value ( $+48 \pm 24$  %) occurring 24 hours after revascularization. In B-lymphocytes, CD69 peak median value ( $+104 \pm 269$  %) occurred also 6 hours after the end of anastomosis. CD25 had its peak median value ( $+150 \pm 773$  %) 12 hours after revascularization and its last measured value was elevated. The expression of CD 26 in T lymphocytes had an apparent decrease in proportional median values ( $-42 \pm 32$  %) 12 hours after end of anastomosis. There were no significant differences in enzymatic elevation between groups. By echocardiography, off-pump patients presented reduction of diastolic volume ( $p=0,001$ ) and ejection fraction ( $p=0,012$ ), and on-pump presented reduction of diastolic ( $p=0,006$ ) and systolic ( $p=0,01$ ) volumes).

**Conclusions:** 1) Compared to on-pump cardiopulmonary bypass, off-pump surgery does not reduce lymphocyte activation. 2) Coronary bypass surgery results in early activation of lymphocytes, with increased expression of CD69 and CD25 on T (CD3+) and B (CD19+) peripheral blood cells. The early elevation of CD69, and late elevation of CD25, may indicate two parts of a sequence of lymphocyte activation. 3) Cardiac enzymes and

echocardiographic measurements behavior do not suggest better results on myocardial damage with off-pump surgery.

# **Cirurgia de Revascularização Miocárdica Sem Circulação Extracorpórea: uma técnica em busca de evidências**

## **Introdução**

O grande impulso da cirurgia de revascularização miocárdica se deu a partir da publicação da experiência de Favaloro <sup>1</sup> com o uso de pontes de safena, em 1968, tendo, a partir de então, se tornado rapidamente uma das cirurgias mais realizadas em todo o mundo. A morbidade e mortalidade desta cirurgia são, em grande parte, atribuídas ao uso da circulação extracorpórea (CEC), à parada cardíaca total e à hipotermia. Existe preocupação com a liberação de microêmbolos, com a resposta inflamatória sistêmica, a hemodiluição, a heparinização, a depressão miocárdica pós-reperusão e problemas cicatriciais motivados pela hipotermia <sup>2</sup>. Já no início da década de 70, alguns autores apresentavam sua experiência com a técnica da cirurgia de revascularização miocárdica (CRM) sem a utilização da CEC, tentando evitar os problemas a ela relacionados, principalmente para revascularização da artéria descendente anterior e da coronária direita <sup>3,4</sup>. Em 1984, Akins et al <sup>5</sup> apresentaram um trabalho onde avaliaram a movimentação do septo ventricular pós-CRM com e sem CEC. Todos os 11 pacientes operados com CEC apresentavam alteração da mobilidade do septo, enquanto no grupo operado sem CEC, apenas 1 de 11 pacientes teve o mesmo comportamento. Apesar do otimismo destes pioneiros quanto ao futuro da CRM sem CEC, havia já a preocupação com a necessidade de obtenção de dados sobre resultados, especialmente em longo prazo, que comprovassem ser esta técnica comparável à



cirurgia realizada sob CEC <sup>4</sup>.

Com o aprimoramento e melhor domínio da CEC e preservação miocárdica, a cirurgia sem CEC ficou praticamente abandonada, tendo a quase totalidade dos cirurgiões optado pela cirurgia convencional, que proporciona condições técnicas muito mais favoráveis e cujos resultados estão completamente estabelecidos <sup>2</sup>. A CRM sem CEC é realizada sem parada cardíaca, o que cria duas dificuldades para o cirurgião: o movimento constante da coronária dificulta as anastomoses e, nas intervenções sobre a parede posterior do coração, há necessidade de deslocá-lo, o que provoca queda importante da pressão arterial <sup>2</sup>.

No início da década de 90, dentro de um amplo movimento ocorrido na cirurgia cardíaca, direcionado a simplificar os procedimentos, tornando-os mais efetivos e, ao mesmo tempo, diminuindo custos, retornou o interesse para a realização de cirurgias sem CEC. Para isto favoreceram o surgimento de novas drogas, de dispositivos que auxiliam a resolver os problemas da técnica cirúrgica e a motivação da experiência de mais de uma década apresentada por dois serviços da América Latina, abrangendo mais de 1000 pacientes selecionados em cada uma das instituições <sup>6-8</sup>. Neste artigo, revisamos as evidências atualmente disponíveis de estudos clínicos e mecanísticos que avaliaram o desempenho da cirurgia de revascularização miocárdica sem CEC.

## **Estudos Clínicos**

Na experiência de inicial de Benetti et al <sup>6</sup>, em Buenos Aires, 700 pacientes foram operados sem CEC entre 1978 e 1990, com mortalidade operatória de 1% e sobrevivência em 7 anos de 90%. Houve menor uso de sangue e menor custo do que nas cirurgias usuais.

A cirurgia foi então proposta principalmente para pacientes de alto risco, acima de 70 anos, com doenças associadas, ou com infarto agudo do miocárdio prévio. No Brasil, Bufollo et al<sup>8</sup> relataram 1274 pacientes submetidos a CRM sem CEC no período de 1981 a 1994, com mortalidade de 2,5%. Um subgrupo de 378 pacientes foi comparado com 689 pacientes operados com CEC e houve menor incidência de arritmias, complicações pulmonares e neurológicas no grupo operado sem CEC. Os autores consideraram a CRM sem CEC justificada, segura e, principalmente, economicamente vantajosa. Sugeriram que esta técnica favorecia principalmente pacientes com risco elevado, déficit de função renal, problemas respiratórios, idade avançada, acidentes cérebro-vasculares e outras doenças sistêmicas. O mesmo grupo ainda publicou sua experiência com a cirurgia sem CEC no subgrupo etário acima de 70 anos<sup>9</sup> e voltou sua atenção especificamente para as complicações neurológicas da cirurgia de revascularização miocárdica, sempre demonstrando uma convicção muito grande nos resultados favoráveis da cirurgia sem CEC<sup>10,11</sup>.

Vários outros serviços relataram experiência com a cirurgia sem CEC, reafirmando os resultados favoráveis em relação a complicações respiratórias, hematológicas, neurológicas e renais<sup>12-15</sup>. Há relato de diminuição de fibrilação atrial, tempo de ventilação mecânica, reoperação por sangramento, infarto pré-operatório<sup>15</sup>, além de vantagens econômicas no período hospitalar<sup>14</sup>. Os pacientes de mais alto risco mostraram menor mortalidade<sup>15</sup>. Uma análise do banco de dados da Society of Thoracic Surgeons, que revisou 118.140 cirurgias de revascularização miocárdica, sendo 9,9 % das cirurgias realizadas sem CEC, é atualmente o maior estudo observacional já publicado<sup>16</sup>. Os autores relatam uma mortalidade de 2,9% com CEC e 2,3% sem CEC (razão de chances [RC] de 0,81, intervalo

de confiança de 95% [IC] 0,70-0,91;  $p < 0,001$ ). Além disso, pacientes operados sem CEC apresentaram 10,6 % de complicações maiores, enquanto aqueles operados com CEC tiveram complicações maiores em 14 % dos procedimentos (RC = 0,77, IC 95% = 0,72-0,82;  $p < 0,0001$ ). Os autores concluíram que a cirurgia sem CEC associou-se a uma redução do risco ajustado de mortalidade, de acidentes vasculares encefálicos, de insuficiência respiratória, reoperação por sangramento e insuficiência renal, além de associar-se com redução do tempo de permanência hospitalar pós-operatório <sup>16</sup>. Os resultados encontrados, apesar de estatisticamente significativos, devem ser melhor avaliados quando a sua validade clínica pois, eles determinam que necessitaríamos utilizar a técnica sem extracorpórea em 167 pacientes para evitarmos uma morte e em 28 pacientes para diminuirmos um evento considerado complicação maior. Esta publicação, mesmo sendo de extrema importância, ainda não tem respostas definitivas, principalmente por se tratar de um estudo retrospectivo observacional, com todas as limitações inerentes a esta metodologia, além de não poder responder às questões referentes ao risco de reoclusão tardia dos vasos e necessidade de reintervenção. Outra avaliação anterior, que utilizou um número menor de pacientes, com critérios semelhantes ao dos utilizados para a formação do banco de dados da Society of Thoracic Surgeons, também encontrou risco imediato menor nos pacientes operados sem CEC, principalmente para aqueles classificados como de risco mais elevado. O acompanhamento posterior, porém, registrou tendência de índices mais elevados de recorrência de angina e procedimentos de reintervenção <sup>15</sup>.

Gundry também reforça a necessidade de se obter resultados de acompanhamento em longo prazo, apoiados em experiência pessoal com 47 pacientes operados sem CEC e que, após um aparente bom resultado inicial, tiveram uma evolução posterior com número

elevado de óbitos e retornos precoces por angina <sup>17</sup>. Nos pacientes deste grupo, que foram estudados com cinecoronariografia, houve um número elevado de estenoses nos locais das anastomoses ou relacionadas aos procedimentos destinados à estabilização dos vasos durante a cirurgia <sup>17</sup>.

Cirurgiões brasileiros, além daqueles pioneiros anteriormente citados, também têm se dedicado à cirurgia de revascularização miocárdica sem CEC e relatado aspectos de sua experiência com a técnica <sup>18-21</sup>. Neste contexto, a cirurgia de revascularização miocárdica sem CEC se mostra cada vez mais um procedimento capaz de trazer muitos benefícios aos pacientes que necessitem do implante cirúrgico de enxertos coronarianos. Entretanto, o entendimento completo sobre a segurança e efetividade desta proposta ainda carecia de ensaios clínicos randomizados, de grande porte e com desfechos clínicos relevantes, como mortalidade e necessidade de reoperação, que abrangesse um longo período de acompanhamento pós-operatório.

Recentemente, foi publicada a análise combinada dos ensaios clínicos ingleses BHACAS 1 e 2 <sup>22</sup>, que randomizaram pacientes para cirurgia com e sem CEC. No BHACAS 1, foram excluídos pacientes com infarto do miocárdio no mês anterior e aqueles para os quais estava indicada revascularização do terço distal da artéria circunflexa, enquanto no BHACAS 2 estes pacientes foram incluídos. No primeiro ensaio, os critérios de entrada limitaram o recrutamento a 37 % dos pacientes triados, enquanto no segundo ensaio o recrutamento aumentou para 63 % dos pacientes triados. Na análise conjunta dos ensaios, que incluiu 401 pacientes, a revascularização sem CEC resultou em menor incidência de fibrilação atrial e de infecção torácica, redução do uso de inotrópicos e transfusão sanguínea e menor tempo de internação. Em um acompanhamento médio de 25

meses no primeiro ensaio e 14 meses no segundo ensaio, não houve diferença significativa no desfecho combinado de mortalidade ou novo evento cardíaco, porém as tendências favoreceram a cirurgia sem CEC. Os resultados combinados destes dois ensaios representam a informação científica de maior impacto clínico atualmente disponível na literatura, entretanto o tamanho da amostra total desta análise não tem poder estatístico definitivo para estabelecer superioridade ou mesmo não inferioridade entre as duas estratégias cirúrgicas.

Dados preliminares do ensaio clínico PRAGUE-4, (Widiminsky et al. Congresso da Sociedade Européia de Cardiologia. Berlin, 2002), que randomizou 400 pacientes consecutivos para cirurgia de revascularização com e sem CEC, apresentaram resultados semelhantes. Dos 208 pacientes randomizados para revascularização sem CEC, 84% foram submetidos ao procedimento, tendo os demais cruzado para cirurgia com CEC. A cirurgia sem CEC associou-se com menor perda sanguínea, menor tempo de intubação e de internação na unidade de terapia intensiva e menor custo. Além disso, houve tendência a menor incidência de eventos clínicos, porém sem significância estatística. Finalmente, dados preliminares de outro ensaio clínico inglês sugerem menor patência de enxertos em 3 meses nos pacientes operados sem CEC, quando comparados àqueles submetidos à cirurgia com CEC <sup>23</sup>. Portanto, até o momento a CRM sem CEC ainda não é uma proposta totalmente estabelecida e muitas questões continuam pendentes, tanto em relação a aspectos puramente técnicos quanto aos mecanismos fisiopatológicos envolvidos.

Uma das maiores preocupações relacionadas à CEC é o processo inflamatório por ela desencadeado. O trauma cirúrgico e a CEC ativam a resposta inflamatória sistêmica (RIS), caracterizada por alterações clínicas na função ventricular, pulmonar e renal, distúrbios da

coagulação, suscetibilidade a infecções, alteração da permeabilidade vascular e acúmulo de líquidos no interstício, leucocitose, vasoconstricção e hemólise<sup>24-30</sup>. Morbidade grave é rara nesta situação (1-2%), mas a maioria dos pacientes submetidos à CEC apresenta algum grau de disfunção<sup>24,31</sup>. Poderia se supor que a CRM realizada sem CEC evitaria todos estes transtornos fisiopatológicos.

### **Resposta Inflamatória Sistêmica**

A RIS, durante a cirurgia cardíaca, pode ser iniciada pelo contato do sangue com superfícies não endoteliais, por desenvolvimento de isquemia e lesão de reperfusão e pela presença de endotoxemia. Os três mecanismos estão presentes simultaneamente e contribuem para o desenvolvimento dos processos humorais e teciduais que levam à RIS<sup>24</sup>.

A inflamação é uma resposta protetora do organismo que normalmente se desenvolve após lesão tecidual, como mecanismo de defesa que visa destruir o agente agressor e o tecido lesado e pode, muitas vezes, desencadear respostas exageradas, com o recrutamento do sistema de ampliação humoral do sistema imune<sup>25,27,32</sup>. O sistema de ampliação humoral é composto por proteínas plasmáticas que respondem a estímulos inflamatórios com auto-perpetuação e amplificação das reações orgânicas e é constituído por quatro vias principais: a cascata da coagulação, a cascata fibrinolítica, o sistema caliceína e o sistema complemento<sup>25</sup>.

As cascatas da coagulação e fibrinolítica e o sistema da caliceína são ativados pelo contato do sangue com as superfícies não endoteliais da CEC e apresentam uma íntima relação entre as ativações dos seus sistemas<sup>25,26</sup>. O sistema complemento é ativado por

lesões traumáticas, infecções ou exposições a corpos estranhos <sup>25</sup>. Sua ativação ocorre em procedimentos com ou sem CEC, porém esta última está associada a uma elevação mais expressiva dos de alguns dos seus componentes <sup>23,26,27,30,33</sup>.

As citocinas são proteínas solúveis que cumprem um papel de estabelecer comunicação entre os vários elementos do processo inflamatório e são produzidas por linfócitos, monócitos, macrófagos, fibroblastos e outras células e, pelo seu papel de ligação, são conhecidas também como interleucinas (IL) <sup>25,28</sup>. A liberação de C5a pelo sistema complemento estimula a produção de citocinas e a ativação dos leucócitos <sup>26,27,32,33</sup>.

As principais citocinas envolvidas na resposta inflamatória pós-CEC são a IL-8, IL-6, IL-1 e IL-10 <sup>23,27,32-38</sup>. As alterações da concentração de fator de necrose tumoral (FNT) ainda são controversas <sup>25-27</sup>. A IL-1 e o FNT promovem importantes respostas biológicas às endotoxinas das bactérias gram-negativas <sup>26,27,32,34</sup>. Sua ação provoca febre, liberação de neuropeptídeos, ativação da célula endotelial, hipotensão, depressão miocárdica e estado catabólico, manifestações tipicamente associadas aos quadros de sepse <sup>25,26,39-41</sup>. A endotoxina tem sido identificada em pacientes submetidos à CEC <sup>39-41</sup> e acredita-se que sua presença esteja associada ao aumento da permeabilidade da barreira intestinal por hipoperfusão durante o procedimento, permitindo translocação bacteriana para a circulação porta, liberação de endotoxinas na circulação sistêmica e ativação das citocinas <sup>25-27,32,40-42</sup>.

A IL-6 é um mediador da reação inflamatória e sofre controle pela IL-1. Esta IL tem sido utilizada para avaliação quantitativa do processo inflamatório em pacientes submetidos à CEC por sua característica de se alterar agudamente em resposta aos estímulos <sup>25-27</sup>. Pela sua resposta aguda à lesão tecidual, a elevação sérica da IL-6 foi associada à morbimortalidade após trauma, queimaduras e cirurgias eletivas <sup>25</sup>. A IL-8 estimula a migração

transendotelial dos leucócitos e sua degranulação, podendo alterar a permeabilidade vascular pós-CEC <sup>25,27</sup>. Sua origem não está bem definida mas parece ser dos eritrócitos, importantes depósitos desta citocina <sup>27</sup>.



Tabela I: Citocinas em Cirurgia de Revascularização Miocárdica sem CEC

Autor	n	Delineamento	Marcadores	Resposta
			Estudados	Inflamatória
Fransen, 1988 (43)	16	não randomizado	IL-6	s/ diferença
Brasil, 1998 (45)	20	não randomizado	FNT	menor s/ CEC
Wan, 1999 (46)	44	não randomizado	IL-6, IL-8, FNT, complemento	menor s/ CEC
Strüber, 1999 (47)	24	não randomizado	IL-6, IL-8, FNT, complemento	menor s/ CEC
Matata, 2000 (48)	20	randomizado	IL-8, FNT, complemento	menor s/ CEC
Ascione, 2000 (49)	60	randomizado	IL-8, complemento	menor s/ CEC
Schulze, 2000 (51)	26	randomizado	IL-2, IL-6, FNT	menor s/ CEC
Czerny, 2000 (52)	30	randomizado	IL-6, IL-10, ICAM-1	s/ diferença

n: número de pacientes, IL: interleucina; FNT: fator de necrose tumoral; CEC: circulação extracorpórea

A dosagem de elementos relacionados à RIS pode nos dar informações sobre diferenças eventualmente existentes na atividade inflamatória de pacientes operados com ou sem a utilização de CEC. A Tabela I apresenta os resultados de diversos estudos que avaliaram a resposta de citocinas durante cirurgia de revascularização miocárdica. Fransen et al <sup>43</sup> estudaram 8 pacientes submetidos a CRM sem CEC e 8 pacientes operados com CEC. Foram medidos a proteína de permeabilidade bactericida, como indicador de ativação dos neutrófilos, a interleucina 6, como indicador de fase aguda de resposta inflamatória, a proteína de ligação de lipopolissacarídeos e proteína C reativa, como parâmetros de resposta inflamatória aguda. Os autores encontraram que a liberação de proteína de permeabilidade bactericida pelos grânulos leucocitários aumentou marcadamente nos pacientes que utilizaram CEC, mas não no grupo operado sem CEC. O aumento dos fatores de fase aguda foi semelhante em ambos os grupos. Os autores concluíram que a resposta inflamatória aguda é, em verdade, causada predominantemente pelo próprio procedimento cirúrgico, enquanto a ativação leucocitária só ocorre quando há utilização da CEC <sup>43</sup>. Em nosso meio, já houve a preocupação de estudar a relação entre os achados de ativação inflamatória avaliados pela liberação de fator de necrose tumoral alfa (FNT- $\gamma$ ) e as alterações da função ventricular na cirurgia de revascularização miocárdica com CEC. Savaris et al não demonstraram um papel importante da atividade inflamatória sobre as alterações funcionais do coração relacionadas à cirurgia <sup>44</sup>. Por outro lado, Brasil et al, encontraram menor elevação de FNT- $\gamma$  em pacientes submetidos à cirurgia sem CEC <sup>45</sup>.

Em outro estudo, um grupo de 44 pacientes submetidos à cirurgia com e sem CEC foi estudado com dosagem seriadas de níveis plasmáticos de fator de necrose tumoral, IL-6,

IL-8, IL-10, CK-MB e troponina I. Os níveis plasmáticos de IL-8 e IL-10 foram menores no grupo operado sem CEC, e os valores de troponina I se elevaram mais neste grupo, sugerindo que a cirurgia sem CEC está associada a uma menor resposta das citocinas e menor dano miocárdico do que a cirurgia convencional <sup>46</sup>. Resultados semelhantes foram relatados por Strüber et al, que estudaram em seus pacientes IL-6, IL-8, FNT- $\gamma$  e complemento sérico <sup>47</sup>. Também o estudo de Matata et al, utilizando complemento sérico C3a, IL-8, FNT- $\gamma$ , e sE-selectina, concluiu que a cirurgia sem CEC reduz o stress oxidativo e a reação inflamatória associada ao procedimento de circulação extracorpórea <sup>48</sup>. Ascione et al encontraram redução da atividade inflamatória avaliada por liberação de citocinas, complemento sérico e ativação dos neutrófilos <sup>49,50</sup> e do comprometimento miocárdico, avaliado pela liberação de troponina I, nos pacientes sem CEC comparados com pacientes operados com CEC. Schulze et al <sup>51</sup> avaliaram a resposta inflamatória em 26 pacientes através de TNF, IL-2 e IL-6 tendo como resultado uma ativação menor nos pacientes operados sem CEC. Outro estudo, que avaliou IL-6, IL-10, ICAM-1, P-selectina e as enzimas cardíacas mioglobina, CPK\_MB, e troponina I em um grupo de pacientes de baixo risco, não mostrou diferença entre os grupos em relação aos marcadores inflamatórios, mas foi registrada elevação enzimática mais acentuada no grupo que usou CEC. Os autores concluem que, em pacientes de baixo risco, o processo inflamatório não é diferente nos dois grupos e que o menor dano miocárdico registrado nas curvas enzimáticas seria decorrente das diferenças no processo de isquemia miocárdica durante o implante dos enxertos <sup>52</sup>.

Em resumo, não tem sido encontrada diferença de níveis de IL-6 nos trabalhos que comparam cirurgia sem CEC e com CEC <sup>52,53</sup>, o que se justifica por ser a IL-6 mais do que

um indutor, um marcador do dano tecidual. A liberação da IL-8 é menor na cirurgia sem CEC e se correlaciona com os níveis mais baixos de troponina no pós-operatório <sup>53</sup>. A cirurgia sem CEC também está associada à maior liberação de IL-10 <sup>52,53</sup>, que possui efeito antiinflamatório e ação protetora do miocárdio reperfundido <sup>54</sup>.

Embora existam evidências crescentes de que a cirurgia sem CEC esteja associada com níveis circulantes de mediadores inflamatórios inferiores ao da cirurgia com CEC, a falta de estudos randomizados criteriosamente controlados faz com que não se tenha ainda conclusões firmes em relação à extensão com que estas alterações se traduzem em vantagens clínicas significativas <sup>54</sup>. Alguns estudos não conseguiram confirmar estes dados e apresentam resultados conflitantes. Também os mecanismos fisiopatológicos envolvidos são complexos e não totalmente esclarecidos.

### **Ativação de Linfócitos**

Outra forma de avaliar o processo inflamatório é pelo estudo dos linfócitos. Estas células assumem um papel importante desde que se iniciam os mecanismos inflamatórios. Os linfócitos existem na corrente sangüínea e nos tecidos sob formas inativas e, quando em contato com substâncias estranhas, sofrem um processo de multiplicação e diferenciação que os transformam de células ativas, com capacidade de executarem funções específicas. Os linfócitos se dividem em células B, cuja função principal é a produção de imunoglobulinas (anticorpos) e linfócitos T, que, por sua vez, são de dois tipos. Os linfócitos T auxiliares, que atuam sobre outros tipos de células, promovem sua proliferação, maturação e outras funções imunológicas. Por exemplo, linfocinas específicas secretadas

por estas células são muito importantes para controlar a atividade das células B, macrófagos e linfócitos T citotóxicos. Os linfócitos T citotóxicos identificam e eliminam células que expressem moléculas estranhas em sua superfície. Os linfócitos dos vários tipos são muito semelhantes e de difícil diferenciação pelas técnicas histoquímicas usuais mas são facilmente individualizados por técnicas surgidas mais recentemente, que permitem a identificação das proteínas de sua superfície <sup>55</sup> .

As proteínas de superfície dos linfócitos determinam o tipo e função das células. Por exemplo, os linfócitos T caracteristicamente expressam o complexo protéico CD3, os linfócitos T auxiliares expressam a proteína CD4 e os linfócitos T citotóxicos expressam a proteína CD8. Algumas das proteínas de superfície são expressas apenas quando os linfócitos são ativados, não sendo possível a sua identificação em células que estão em estado de repouso, inativas. Esta propriedade nos assegura uma ferramenta capaz de avaliar o início da atividade imunoinflamatória pelo surgimento, na corrente sangüínea, de linfócitos que expressem as “proteínas de ativação” <sup>55</sup> .

A preocupação com a atividade imunológica na cirurgia cardíaca com e sem CEC vem de longa data. Já no início dos anos 80, Petri et al <sup>56</sup> avaliaram a atividade dos linfócitos em 8 pacientes submetidos à cirurgia cardíaca. Na época, era comum a cirurgia valvular fechada e alguns pacientes realizaram este tipo de procedimento, portanto sem a utilização de circulação extracorpórea. Dentro da metodologia então disponível, os autores relataram uma diminuição da atividade linfocitária, que era mais acentuada nos primeiros três dias após a cirurgia, retornando, após, a valores normais. O retorno à normalidade se processava de maneira mais lenta nos pacientes submetidos a procedimentos com coração aberto do

que nos submetidos à cirurgia com coração fechado, sugerindo que a circulação extracorpórea pudesse ser responsável por uma acentuação do fenômeno relatado <sup>56</sup>.

O estudo “in vitro” da atividade linfocitária pela resposta mitogênica, em 47 pacientes levados a cirurgia de revascularização miocárdica com CEC, também mostrou diminuição da atividade celular após a cirurgia. Os autores relataram que a atividade alterada dos linfócitos no seu estudo parecia estar relacionada à CEC e se acentuava nos pacientes que recebiam transfusões sanguíneas. Manifestaram ainda sua preocupação por ser a ativação dos linfócitos uma capacidade essencial no processo inflamatório e na defesa contra organismos estranhos. Apesar disto, não foi encontrada relação entre a diminuição da atividade linfocitária e achados clínicos indicativos de infecção <sup>57</sup>.

De Angeli et al também manifestaram sua preocupação com as alterações induzidas pela CEC sobre o sistema imune e o risco de infecção <sup>58</sup>. Estudaram os efeitos da cirurgia cardíaca sobre a imunidade mediada por células em dois grupos de pacientes, um grupo que foi submetido a CEC com duração de até 100 minutos e outro com CEC de duração maior que 100 minutos. Houve redução do número percentual de linfócitos que foi mais acentuada no primeiro dia após a cirurgia. Os linfócitos T diminuíram após o procedimento, normalizando até o sétimo dia pós-operatório. A diminuição se deu predominantemente às custas de linfócitos auxiliares. As alterações da atividade dos leucócitos se prolongaram por mais tempo no grupo de pacientes que tiveram tempo de CEC prolongado <sup>58</sup>.

Misoph et al estudaram a ativação dos leucócitos por citometria de fluxo em 27 pacientes submetidos à cirurgia de revascularização miocárdica sob CEC <sup>59</sup>. Houve um aumento dos leucócitos durante a CEC com marcada leucocitose no período pós-operatório. Os linfócitos se elevaram no início da CEC, a que se seguiu uma significativa queda,

predominantemente às custas de linfócitos B e linfócitos T citotóxicos. Em contraste, a linfopenia encontrada 8 horas após a inativação da heparina era predominantemente relacionada à diminuição dos linfócitos T auxiliares, sugerindo uma resposta imune especificamente relacionada a este tipo de célula. Como os linfócitos começam a cair apenas depois de iniciada a CEC, os autores consideraram que a destruição dos linfócitos pelo circuito do sistema seria uma das principais causas de linfopenia. Esta linfopenia, por ser transitória, provavelmente não traria necessariamente conseqüências negativas para o paciente e poderia, até mesmo, representar uma reação fisiológica apropriada <sup>59</sup>.

Uma publicação bem recente avaliou, por citometria de fluxo, a expressão de antígenos de ativação precoce em pacientes submetidos à cirurgia de revascularização miocárdica com CEC (6 pacientes) e pacientes submetidos à cirurgia de carcinoma de esôfago (8 pacientes). Houve aumento da ativação linfocitária no período pós-operatório, que foi mais evidente nos linfócitos T auxiliares do que nos linfócitos T citotóxicos. Os autores concluíram que a cirurgia de revascularização miocárdica aumenta a ativação dos linfócitos e propõem que a linfopenia encontrada após a cirurgia possa ser decorrente de apoptose desencadeada pela ativação celular <sup>60</sup>.

A ativação dos linfócitos está intimamente relacionada com a liberação das citocinas. A IL-1 beta, IL-6, IL-8 e FNT atuam no sistema imune inato, não específico. A IL-2 e IL-12, que são importantes para a ativação dos linfócitos T auxiliares do tipo 1, estão diminuídas após a cirurgia cardíaca. Em contraste, IL-10 e o fator de crescimento beta, essenciais para a resposta imune antiinflamatória ou humoral, mediada pelos linfócitos T auxiliares do tipo 2, estão aumentados <sup>61</sup>.

## **Conclusões**

Até o momento, a CRM sem CEC, apesar da racionalização teórica de provável grande benefício aos pacientes, não conseguiu evidências definitivas de vantagens sobre a cirurgia com CEC. Além disso, nos trabalhos clínicos realizados ainda são controversos os resultados nas primeiras tentativas de estudar a RIS. A cirurgia sem CEC passa por um momento de grande euforia, junto com outros procedimentos cirúrgicos ditos minimamente invasivos<sup>62</sup>. Há necessidade de que as conseqüências destas novas técnicas sejam testadas por ensaios clínicos randomizados, com poder estatístico para detectar diferenças em desfechos clinicamente relevantes, assim como obter informações mecanísticas definitivas. Baseado no pioneirismo de nosso país nesta área, fica o desafio para os cirurgiões cardiovasculares brasileiros e seus grupos fazerem mais esta contribuição fundamental.



## Referências

1. Favalaro RG. Saphenous vein autograph replacement of severe segmental coronary artery occlusion. *Ann Thorac Surg* 1968;33:5-11
2. Borst C Jansen EW, Gründeman PF. Less invasive coronary artery bypass grafting: without cardiopulmonary bypass and reduced surgical access. *Heart* 1997;77:302-3.
3. Trapp NS, Bisrya R. Placement of coronary artery bypass graft without pump oxygenator. *Ann Thorac Surg* 1975;19:1-5
4. Ankeney JL. To use or not to use the pump oxygenator in coronary bypass operations. *Ann Thorac Surg* 1975;19:108-9.
5. Akins CW, Boucher CA, Pohost GM. Preservation of interventricular septal function in patients having coronary artery bypass grafts without cardiopulmonary bypass. *Am Heart J* 1984;107:304-9.
6. Benetti FJ, Naselli G, Wood M, Geffner L. Direct myocardial revascularization without extra corporeal circulation. *Chest* 1991;100:312-15.
7. Benetti FJ, Mariani MA, Ballester C. Direct coronary surgery without cardiopulmonary bypass in acute myocardial infarction. *J Cardiovasc Surg* 1996;37:391-5.
8. Buffolo E, Andrade JCS, Branco JNR, Teles CA, Aguiar LF, Gomes WJ. Coronary artery bypass grafting without cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1966;61:63-6.

9. Buffolo E, Summo H, Aguiar LF, Teles CA, Branco JN. Myocardial revascularization in patients 70 years of age and older without the use of extracorporeal circulation. *Am J Geriatr Cardiol* 1997;61:7-15.
10. Malheiros SM, Brucki SM, Buffolo E, et al. Neurological outcome in coronary artery surgery with and without cardiopulmonary bypass. *Acta Neurol Scand* 1995;92:256-60.
11. Malheiros SM, Massaro AR, Buffolo E. Neurologic complications in coronary surgery without coronary bypass. *Ann Thorac Surg* 1999;68:1498-501.
12. Supramanian VA, McCabe JC, Geller CM. Minimally invasive direct coronary artery bypass grafting: two-year clinical experience. *Ann Thorac Surg* 1997;64:1648-55.
13. Spooner TH, Dyrud PE, Monson BK, Dixon GE, Robinson LD. Coronary artery bypass on the beating heart with the Octopus: a North American experience. *Ann Thorac Surg* 1998;66:1032-5.
14. Ascione R, Lloyd CT, Gomes WJ, Caputo M, Bryan AJ, Angelini GD. Beating versus arrested heart revascularization: evaluation of myocardial function in a prospective randomized study. *Eur J Cardiothorac Surg* 1999;15:685-90.
15. Arom KW, Flavin TF, Emery RW, Kshettry VR, Janey PA, Petersen RJ. Safety and efficacy of off-pump coronary artery bypass grafting. *Ann Thorac Surg* 2000;69:704-10.
16. Cleveland JC, Shroyer LW, Chen AY, Peterson E, Grover, FL. Off-pump coronary artery bypass grafting decreases risk-adjusted mortality and morbidity. *Ann Thorac Surg* 2001;72:1282-9.

17. Grundy SR. Discussion. *Ann Thorac Surg* 1992;54:1092.
18. Lobo Filho JG, Albuquerque JM, Gomes CB et al. Surgical revascularization of posterior coronary arteries without cardiopulmonary bypass. *Arq Bras Cardiol* 1999;72:593-600.
19. Lima RC, Escobar MAS, Salerno T et al. Avaliação hemodinâmica intra-operatória na cirurgia de revascularização miocárdica sem auxílio de circulação extracorpórea. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 2000; 15:201-11.
20. Brasil A, Mariano JB, Santos FM, et al. Revascularização do miocárdio sem circulação extracorpórea: experiência e resultados iniciais. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 2000;15:6-15.
21. Soltowski PR, D'Ancona G, Salerno TA, et al. Enzimas miocárdicas na cirurgia de revascularização sem circulação extracorpórea. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 2000;15:105-8.
22. Angelini GD, Taylor FC, Reeves BC, Ascione R. Early and midterm outcome after off-pump and on-pump surgery in Beating Heart Against Cardioplegic Arrest Studies (BHACAS 1 and 2): a pooled analysis of two randomized controlled trials. *Lancet* 2002;359:1194-9.
23. Khan NE, Mister R, Pepper JR, et al. Randomized trial of on-pump versus off-pump coronary artery surgery comparing clinical outcomes, graft patency and neuropsychological function. *Eur Heart J (resume)* 2002;23 (abstr suppl):248.
24. Hall RI, Smith MS, Rocker G. The systemic inflammatory response to cardiopulmonary bypass: pathophysiological, therapeutic, and pharmacological considerations. *Anesth Analg* 1997;85:766-82.

25. Savaris N. Resposta imunoinflamatória à circulação extracorpórea: estado atual. *Rev Bras Anesthesiol* 1998;48:126-36.
26. Butler J, Rocker GM, Westaby S. Inflammatory response to cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1993;55:552-9.
27. Menaché P. The inflammatory response to cardiopulmonary bypass and its impact postoperative myocardial function. *Curr Opinion Cardiol* 1995;10:597-604.
28. Elefteriades JA. Mini-CABG: A step forward or backward: The “Pro” point of view. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 1997;11:661-8.
29. Royston D. The inflammatory response and extracorporeal circulation. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 1997;11:341-54.
30. HSU LC. Biocompatibility in cardiopulmonary bypass. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 1997;11:376-82.
31. Newmann MF, Kirchner JL, Phillips-Bute, et al. Longitudinal assessment of neurocognitive function after coronary-artery bypass surgery. *N Engl J Med* 2001;344:395-402.
32. Miller BE, Levy JH. The inflammatory response to cardiopulmonary bypass. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 1997;11:355-66.
33. Steinberg JB, Kapelanski DP, Olson JD, Weiler JM. Cytokine and complement levels in patients undergoing cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993;106:10-15.
34. Hill GE Whitten CW. The role of the vascular endothelium in inflammatory syndromes, atherogenesis and propagation of disease. *J Cardiothorac Anesth* 1997;11:316-21.

35. 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 Anesth* 1993;40:1016-21.
36. Menaché P, Haydar S, Peynet J et al. A potential mechanism of vasodilatation after warm heart surgery. The temperature-dependent release of cytokines. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1994;107:293-9.
37. Haeffner-Cavaillon N, Rousselier N, Ponzio O, et al. Induction of interleukin-1 production in patients undergoing cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1989;98:100-6.
38. Frering B, Philip I, Dehoux M, Rodland C, Langlois JM, Desmonts JM. Circulating cytokines in patients undergoing normothermic cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1994;108:636-41.
39. Kharazami A, Andersen LW, Back L, Valerius NH, Laub M, Rasmussen JP. Endotoxemia and enhanced generation of oxygen radicals by neutrophils from patients undergoing cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1989;98:381-5.
40. Nilson L, Kulander L, Nystrom SO, Eriksson. Endotoxin in cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1990;770-80.
41. Roche DA, Gaffin SL, Wells MT, Koen Y, Brock-Utine JG. Endotoxemia associated with cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1987;93:832-7.
42. Ohri SK, Becket J, Brannan J, Keogh BE, Taylor KM. Effects of cardiopulmonary bypass on gut blood flow, oxygen utilization, and intramucosal pH. *Ann Thorac Surg* 1994;57:1193-9.

43. Fransen E, Maessen J, Dentemer M, Senden N, Gesken G, Buurman W. Systemic inflammation present in patients undergoing CABG without extracorporeal circulation. *Chest* 1998;113:1290-95.
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;77:107-19.
45. 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.
46. Wan S, Izzat B, 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.
47. Strüber M, Cremer JT, Gohrbandt B, et al. Human cytokine responses to coronary artery bypass grafting with and without cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1999;68:1330-5.
48. Matata BM, Sosnowski AW, Galiñanes M. Off-pump bypass graft operation significantly reduces oxidative stress and inflammation. *Ann Thorac Surg* 2000;69:785-91.
49. 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;69:1198-204.

50. Ascione R, Lloyd CT, Underwood MJ, Lotto AA, Pitsis AA, Angulini GD. Economic outcome of off-pump coronary artery bypass surgery: a prospective randomized study. *Ann Thorac Surg* 1999;68:2237-42.
51. Schulze C, Conrad N, Schutz A, et al. Reduced expression of systemic proinflammatory cytokines after off-pump versus conventional coronary artery bypass grafting. *Thorac Cardiovasc Surg* 2000;48:364-9.
52. 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 Cardiothorac Surg* 2000;17:737-42.
53. Wan S, Izzat B, Lee TW, Tang NLS, Yim APC. Avoiding cardiopulmonary bypass in multivessel CABG reduces cytokine response and myocardial injury. *Ann Thorac Surg* 1999;68:52-7.
54. Menasche 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:S2260-5.
55. Parslow TG. Lymphocytes and lymphoid tissues. In Parslow TG, Stites DP, Terr AI, Imboden JB. *Medical Immunology*. 10<sup>th</sup> ed New York, Lange Medical Books, McGraw- Hill 2001:40-60.
56. Petri I, Kaiser G, Gaál T, Kovács G, Petri G. Cellular immune functions after heart operations. *Acta Chirur Acad Sci Hung* 1981;22:29-36.
57. Velzen-Blad H, Dijkstra YJ, Heijnen CJ, Schurinck GA, Zegers BJM, Ballieux RE. Cardiopulmonary bypass and host defense functions in human beings: lymphocyte function. *Ann Thorac Surg* 1985;39:212-7.

58. 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.
59. Misoph M, Babin Ebell J, Schwender S, Grossmann R, Keller F, Elert O. Response of the cellular immune system to cardiopulmonary bypass in vivo. *Thorac Cardiovasc Surgeon* 1997;45:217-223.
60. Shimaoka M, Hosotsubo K, Sugimoto M et al. The influence of surgical stress on T cells: enhancement of early phase lymphocyte activation. *Anesth Analg* 1998,87:1431-5.
61. Markewitz A, Lante W, Franke A, Marohl 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.
62. Diegeler A, Thiele H, Falk V, et al. Comparison of stenting with minimally invasive bypass surgery for stenosis of the left anterior descending coronary artery. *N Engl J Med* 2002;347:561-6.



# **Cirurgia de Revascularização Miocárdica sem Circulação Extracorpórea Não Reduz Ativação Linfocitária: resultados de um ensaio clínico randomizado**

## **Introdução**

A cirurgia de revascularização miocárdica (CRM) teve grande impulso a partir da publicação da experiência do Dr. Favaloro com o uso de pontes de safena em 1968<sup>1</sup>. A morbidade e mortalidade ainda presentes nesta cirurgia, apesar dos muitos avanços ocorridos, são, em grande parte, atribuídas ao uso da circulação extracorpórea (CEC), à parada cardíaca total e à hipotermia. A CRM sem CEC tornou-se motivo de maior interesse a partir do início da década de 90, como uma das alternativas destinadas a melhorar a efetividade e diminuir os custos do procedimento.

Desde os trabalhos pioneiros desta nova fase<sup>2,3</sup>, já existem muitos outros mostrando melhor evolução clínica dos pacientes operados sem CEC do que os que utilizam a técnica tradicional, principalmente em grupos selecionados de pacientes de mais alto risco<sup>4,5,6,7,8,9,10</sup>. Persiste ainda a preocupação com os resultados em longo prazo pois os poucos trabalhos que avaliaram este período registraram a ocorrência de um número excessivo de procedimentos de revascularização tardios<sup>10,11</sup>. A recente publicação dos estudos randomizados BHACAS 1 e 2 mostrou diminuição da morbidade intra-hospitalar e

evolução semelhante nos primeiros 1-3 anos de pós-operatório, em pacientes operados com e sem CEC<sup>12</sup>.

Os mecanismos fisiopatológicos mais importantes relacionados à CEC, limitação do dano miocárdico isquêmico, a resposta inflamatória sistêmica e os efeitos sobre a imunidade celular, têm sido motivo de atenção dos pesquisadores dedicados a esta área, com diferentes graus de esclarecimento até o momento.

A lesão miocárdica, avaliada pela liberação de enzimas cardíacas, CK-MB e troponinas, pode estar diminuída na cirurgia sem CEC<sup>13,14</sup>. A diminuição do dano isquêmico da cirurgia sem CEC parece não ser de magnitude suficiente para ter repercussões clínicas, mas pode ser muito importante nos pacientes de mais alto risco, principalmente aqueles que já tem função miocárdica gravemente comprometida<sup>14,15</sup>.

Um dos principais efeitos da CEC é ativar a cascata do complemento, causando ativação dos neutrófilos e produção de citocinas. As citocinas reforçam a ativação dos neutrófilos, favorecendo sua adesão à parede dos vasos e a migração nos tecidos, tornando as células parenquimatosas, inclusive os miócitos, mais suscetíveis aos produtos derivados dos neutrófilos. A interleucina (IL)-8 tem papel importante no processo inflamatório, que é contraposto por efeitos antiinflamatórios nos quais tem grande importância a participação da IL-10<sup>15</sup>. A IL-6 é um dos reagentes de fase aguda liberado em resposta ao dano tecidual, que parece ser muito mais importante dos que as alterações relacionadas à CEC<sup>15</sup>.

Não tem sido encontrada diferença de níveis de IL-6 nos trabalhos que comparam cirurgia sem CEC e com CEC<sup>14,16</sup>, de acordo com o entendimento de que a IL-6 é, mais do que um indutor, um marcador de dano tecidual. A liberação da IL-8 está diminuída na cirurgia sem CEC e se correlaciona com os níveis mais baixos de troponina no pós-

operatório<sup>15</sup>. A cirurgia sem CEC também está associada à maior liberação de IL-10<sup>14,16</sup>, com efeito antiinflamatório e ação protetora sobre o miocárdio reperfundido<sup>15</sup>.

Os linfócitos se dividem conforme suas funções que são específicas. Os linfócitos B produzem imunoglobulinas (anticorpos), os linfócitos T auxiliares atuam sobre outras células, promovendo diversas funções imunológicas e os linfócitos T citotóxicos são capazes de eliminar células portadoras de proteínas estranhas em sua superfície. Os linfócitos circulam na corrente sanguínea sob forma inativa e, quando estimulados, passam à forma ativada, que lhes confere a capacidade de exercerem suas funções imunológicas<sup>17</sup>.

Já na década de 80, Petri et al avaliaram pacientes submetidos à cirurgia cardíaca e relataram linfopenia e diminuição da ativação linfocitária. Foram incluídos alguns pacientes submetidos à cirurgia valvar sem abertura do coração e os autores concluíram que a CEC pudesse ser responsável pela acentuação dos efeitos sobre os linfócitos<sup>18</sup>. Outros autores também se dedicaram ao assunto, com a preocupação principal de que a depressão da atividade e redução do número de linfócitos pudesse ser responsável por aumento do risco de infecção<sup>19,20</sup>.

Um estudo, já empregando as novas técnicas de citometria de fluxo, mostrou uma significativa queda dos linfócitos após o início da CEC, predominantemente às custas de linfócitos B e linfócitos T citotóxicos. Em contraste, a linfopenia encontrada 8 horas após a inativação da heparina foi predominantemente relacionada à diminuição de linfócitos T auxiliares. Os autores consideraram a destruição dos linfócitos pela interação com o sistema da CEC como sendo a principal causa dos fenômenos encontrados<sup>21</sup>.

Mais recentemente, um estudo que incluiu pacientes com cirurgia de carcinoma de esôfago e cirurgia cardíaca avaliou a expressão de CD69, um marcador de ativação

precoce<sup>22</sup>. A ativação dos linfócitos no trans e pós-operatório se deu em proporções significativamente maiores nos linfócitos T auxiliares do que nos linfócitos T citotóxicos e, não houve diferença entre os dois tipos de cirurgia. Os autores concluíram que a linfopenia presente após a cirurgia se deva a um processo relacionado à ativação dos linfócitos T auxiliares, possivelmente apoptose. Não existe, até o momento, relato de estudos randomizados que avaliem a ativação de linfócitos em pacientes submetidos à cirurgia de coronária com e sem CEC destinado a avaliar o papel da CEC na ativação linfocitária.

## Objetivos

**Objetivo Primário.** Testar a hipótese de que a CRM sem CEC desencadeia um processo inflamatório, avaliado pela ativação linfocitária, de menor intensidade do que a CRM com CEC.

**Objetivos Secundários:** Avaliar a influência da circulação extracorpórea sobre o dano miocárdico através do estudo do comportamento de enzimas cardíacas (troponina I) e dos achados ecocardiográficos.

Estudar o comportamento dos marcadores de ativação dos linfócitos ao longo do período trans e pós-operatório.

## **Pacientes e Métodos**

### **Pacientes**

Vinte e oito pacientes consecutivos, candidatos à cirurgia de revascularização miocárdica, com características clínicas e anatômicas que permitissem a realização do procedimento sem a utilização de circulação extracorpórea (CEC), foram randomizados para dois grupos: cirurgia com CEC e cirurgia sem CEC. Todos os pacientes foram avaliados quanto à ativação linfocitária, curva de liberação de troponina I e medidas ecocardiográficas e foram manejados segundo as técnicas usuais do serviço para os procedimentos efetuados. O projeto do estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da Instituição e os pacientes assinavam um consentimento informado previamente à randomização.

Não foram incluídos no estudo pacientes que as seguintes características: história de cirurgia cardíaca prévia; infarto agudo do miocárdio há menos de 3 meses; pacientes que necessitassem procedimento cardíaco concomitante (troca valvar, correção de defeitos congênitos ou outros procedimentos cirúrgicos); pacientes portadores de insuficiência renal, definida como creatinina sérica maior que 2 mg%; os portadores de síndrome de

imunodeficiência; corticoterapia crônica ou perioperatória; fração de ejeção menor que 40% no estudo angiográfico de ventrículo esquerdo; infecção ativa; angina instável necessitando cuidados em unidade de terapia intensiva; e insuficiência cardíaca classe III ou IV da NYHA.

Foram excluídos os pacientes inicialmente randomizados e submetidos à cirurgia, que apresentassem intercorrências no período trans- ou pós-operatório que pudessem interferir nos parâmetros que foram motivo do estudo: infarto agudo do miocárdio caracterizado pelo aparecimento de novas ondas Q, perda de mais de 25% da amplitude de ondas R em duas ou mais derivações contíguas e alteração da isoenzima MB da creatinofosfoquinase (CPK-MB)  $\geq 5\%$  do valor da creatinofosfoquinase (CPK), por período acima de 18 horas; choque, caracterizado por pressão sistólica  $< 80$  mmHg, oligúria e sinais de hipoperfusão tecidual, não responsivos a reposição de volume; e arritmias cardíacas que exigissem tratamento por cardioversão/desfibrilação elétrica.

### **Técnica anestésica**

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. A indução anestésica foi realizada com midazolam (50-100  $\mu\text{g/kg}$ ) e propofol 1 a 2 mg/kg e o relaxamento muscular produzido com pancurônio (0,008 mg/kg). A ventilação mecânica foi realizada com volume corrente de 10 a 12 ml/kg, frequência respiratória 10-12 mpm, posteriormente alterada segundo resultados de amostras de gases arteriais, e fração inspiratória de oxigênio ( $\text{FiO}_2$ ) de 30%.

Nos pacientes operados com CEC, 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. Depois de terminada a CEC, eram usadas as menores doses de infusão de ambas as drogas.

No grupo operado sem CEC, previamente à indução, foi realizada a administração subaracnóidea de fentanil (100 µg) e morfina (0,5 mg), ambas as medicações sem conservantes. A manutenção da anestesia foi realizada com isoflurano (concentração expirada 0,5 a 1,5 vol%). Midazolam e fentanil foram administrados, nas mesmas doses, e, nos mesmos momentos já citados para o grupo operado com CEC.

Durante a cirurgia, a pressão arterial sistólica foi mantida em valores os mais próximos possíveis de 100 a 120 mmHg com a ajuda de medicações vasodilatadoras (nitroglicerina e/ou nitroprussiato de sódio) ou vasopressoras (noradrenalina) em infusões contínuas, associadas a ajustes no plano anestésico, conforme citado acima. A frequência cardíaca foi mantida entre 60 e 80 bpm com betabloqueador (metoprolol) ou marca-passo, sempre que possível, com estimulação atrial.

A isquemia miocárdica, analisada pelo comportamento do segmento ST, pelo surgimento de arritmias associadas ao clampeamento de coronárias ou pela alteração da motilidade regional, foi tratada pela eliminação dos fatores etiológicos envolvidos (taquicardia, modificações da pressão arterial, ou manifestação pró-coagulante em pacientes com angina instável pré-operatória) e pela administração de 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 contínua de dopamina (2 a 5 µg/kg . min). No grupo de pacientes operados sem CEC, a determinação destas alterações do débito cardíaco foi feita freqüentemente, a cada modificação da posição do coração para a exposição da coronária a ser revascularizada.

A anticoagulação foi feita, no grupo operado com CEC, com heparina na dose de 5 mg/kg, repetida a cada hora (1 mg/kg). O controle da ação da heparina foi realizado pelo Tempo de Coagulação Ativado (TCA), mantido acima de 480 segundos. No grupo operado sem CEC, foi utilizada dose de ataque de 1,5 mg/kg e mantida infusão contínua de heparina de 1000 U/h. A reversão da ação da heparina foi obtida com a utilização de protamina numa relação mg/mg de ambas as drogas.

A reposição hídrica foi realizada com solução fisiológica a 0,9% para repor as seguintes perdas: jejum (1 ml/kg/h de jejum pré-operatório), perdas insensíveis (2 ml/kg/h de cirurgia), translocação (2 a 4 ml/kg/h), diurese (volume a volume), e perda sanguínea (volume a volume). A perda sangüínea que determinasse a instabilidade hemodinâmica, acompanhada de valores de hemoglobina circulante inferior a 9 mg% ou hematócrito inferior a 28%, foi reposta com concentrado de hemácias. A glicemia foi mantida entre 100 e 200 mg/% pela administração de glicose a 5% e, nos diabéticos, pela infusão IV de insulina simples (5 a 10 UI). Em ambos os grupos, após a cirurgia, os pacientes foram transferidos para a Unidade de Cuidados Intensivos e mantidos em ventilação mecânica artificial, até atingir critérios para desmame da ventilação e extubação.

## **Técnica cirúrgica**

**Cirurgia com Circulação Extra-Corpórea (CEC).** Todos os pacientes foram submetidos a 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. Foi utilizada a técnica de CEC com hipotermia leve (32°C) com oxigenador de membrana adulto MRX cq14 3000ml (Braile Biomédica) e máquina de CEC Sarns™8000 com 5 roletes, Safety monitor 3M, arterial monitor 3M, cardioplegia monitor 3M, Sarns™ Occluder com misturador Sechrist®. O controle da temperatura foi realizado com termômetro nasofaríngeo e o volume de enchimento da máquina num total de 1.750 ml com Ringer Lactato adicionando-se concentrado de hemácias conforme o hematócrito do paciente até chegarmos a um hematócrito final de 30%. O fluxo arterial foi mantido em 2,5 l/m<sup>2</sup> e, na cardioplegia, foi utilizado o sistema Braile Biomédica com uma indução e doses de manutenção a cada 10 minutos. Realizadas inicialmente as anastomoses distais com prolene 7-0 (sutura contínua) e, posteriormente, as anastomoses proximais com prolene 6-0. Administraram-se cristalóides no volume de 7ml/kg . hora. A anticoagulação foi revertida, após a saída de CEC e retirada das cânulas, com Sulfato de Protamina na dose 1:1 para cada mg de heparina. O uso de sangue foi regulado por dados hemodinâmicos e por medidas de hematócrito e hemoglobina. Os pacientes foram transferidos para a unidade de tratamento intensivo com pressão arterial média entre 60-70mmHg, recebendo volume ou drogas vasoativas, conforme a necessidade.

**Cirurgia sem Circulação Extra-Corpórea.** Após a abertura do esterno e dissecções da artéria torácica interna esquerda e veia safena magna de melhor qualidade, foi utilizado o afastador/estabilizador da CTS OPCAB™ Access Systems. Heparinizado o paciente, foi passado um ponto no pericárdio posterior, ponto de Lima, suturada uma fita de 2 cm de largura neste ponto de forma a construir um tripé onde o coração pode ser rotado. Fios de marca-passo foram implantados no ventrículo direito. Realizada, primeiramente, a anastomose da artéria torácica interna esquerda na artéria descendente anterior. Escolhido o sítio do implante, um fio de prolene 4-0 com feltro passado por torniquete que circunda a artéria num ponto proximal. O estabilizador foi colocado, a artéria incisada e o shunt CTS®, com diâmetro adequado à artéria, foi introduzido na luz do vaso. O ponto proximal foi solto, retornando o fluxo de sangue intraluminal e iniciou-se a anastomose com prolene 7-0 em sutura contínua. Antes do último ponto, o shunt interno foi retirado, saindo todo o ar, e a sutura finda. Posteriormente, implantada a veia safena na aorta ou na artéria torácica interna e realizadas as outras anastomoses, conforme descrito anteriormente. Para a obtenção de um campo exangue, foi empregado um soprador com CO<sub>2</sub>. Todas as pontes foram testadas com fluxômetro Doppler e, no caso do fluxo ser insatisfatório, a anastomose foi refeita. O sangue aspirado do campo foi estocado em coletor Transfusam® e reinfundido no paciente.

### **Dosagens Sangüíneas**

As amostras de sangue para dosagem os exames do estudo foram colhidas da cânula arterial nos seguintes tempos: Grupo com CEC: T1: logo após a indução anestésica; T2: no

desclameamento aórtico; T3: 6 horas após desclameamento; T4: 24 horas após desclameamento. Grupo sem CEC: T1: logo após a indução anestésica; T2: ao término das anastomoses dos enxertos coronarianos; T3: 6 horas após término das anastomoses; T4: 24 horas após término das anastomoses.

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  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior análise bioquímica de Troponina I. A amostra destinada à avaliação dos linfócitos foi colhida e mantida em tubos Vacutainer contendo  $\text{K}_3\text{EDTA}$  (ácido etileno diamino tetra-acético tripotássico), à temperatura ambiente, até o processamento realizado em período inferior a 24 horas. As dosagens das Troponinas foram realizadas por quimioluminescência, em equipamentos Immulite (DPC - Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, USA)<sup>23,24</sup>. As dosagens de CK e CK-MB foram realizadas por método cinético automatizado, em equipamento Integra 700 (Roche Diagnostic Systems, Besel, Switzerland)<sup>25</sup>. Amostras de sangue arterial periférico total, foram testadas com anticorpos monoclonais. Foi empregada a técnica de imunofluorescência direta, utilizando FITC, PE e PErCP com fluorocromos, em um painel com os seguintes marcadores de superfície: CD3, CD19, CD25, CD26, CD69 e HLADR. As amostras foram incubadas com anticorpo fluorescente, lisadas (FACS Lysing Solution), lavadas e ressuspendidas em paraformaldeído 0,1% para posterior análise no Citômetro de Fluxo (BD FACSCalibur, San Jose , Estados Unidos da América) e estudo dos dados através do software Cell Quest.

## **Ecocardiograma**

Foi realizado ecocardiograma uni-bidimensional com doppler colorido num período de duas semanas antes da cirurgia e repetido no pós-operatório, antes da alta hospitalar. Foi utilizado aparelho Hewlett Packard modelo Sonus 5500 e realizado o exame pelas técnicas usuais. As medidas das dimensões cardíacas e cálculos de índices de desempenho ventricular esquerdo foram realizados de acordo com as recomendações da American Society of Echocardiography.<sup>26,27</sup>

## **Análise estatística**

As variáveis contínuas com distribuição normal são apresentadas como médias  $\pm$  desvio padrão e os dados com distribuição não-paramétrica como medianas  $\pm$  erro padrão. A análise das variáveis categóricas foi realizada pelo teste do qui-quadrado ou pelo teste exato de Fisher, conforme apropriado. Para as variáveis contínuas foram utilizados o teste t, a análise de variância de dupla entrada para dados repetidos, e teste de Friedman e a análise de variância para dados repetidos. Considerado como significativos valores de  $p < 0,05$ . Foi utilizado o programa estatístico Statistical Package for Social Sciences (SPSS) Versão 8.0, SPSS INC.

## **Resultados**

**Características dos Grupos e Variáveis Cirúrgicas.** A Tabela 1 apresenta as **características dos dois grupos, após a randomização.** Os dois grupos de pacientes não apresentavam diferença em relação à idade, sexo e cor, doenças prévias e co-morbidades. O tempo médio de duração das cirurgias foi menor nos procedimentos com CEC do que nas cirurgias realizadas sem CEC, mas não houve diferença entre os dois grupos quanto ao número de enxertos vasculares implantados.

**Tabela 1: Características clínicas e dados da cirurgia após randomização**

Variável	com CEC	sem CEC	p
n	15	13	28
Idade (média $\pm$ DP)	61 $\pm$ 10,2	63 $\pm$ 7,3	0,61
Sexo masculino n (%)	8 (53,3)	10 (76,9)	0,37
Cor branca n (%)	14 (93,3)	12 (92,3)	1,00
Infarto prévio n (%)	7 (46,7)	8 (61,5)	0,68
Insuficiência Cardíaca Classe I-II n (%)	0 (0,0)	2 (15,4)	0,21
Hipertensão n (%)	10 (66,7)	10 (76,9)	0,86
DBPOC n (%)	2 (13,3)	3 (23,1)	0,86
Diabete melito n (%)	2 (13,3)	1 (7,7)	1,00
Doença Péptica n (%)	1 (6,7)	2 (15,4)	0,9
Doença Arterial Periférica n (%)	2 (13,3)	2 (15,4)	1,00
Tempo de cirurgia (média $\pm$ DP) (min)	268 $\pm$ 46	312 $\pm$ 43	0,02
Pico CPK (média $\pm$ DP) (U/l)	302 $\pm$ 174	390 $\pm$ 300	0,34
Pico CPK-MB (média $\pm$ DP) (U/l)	15 $\pm$ 6	18 $\pm$ 10	0,53
Vasos Revascularizados (média $\pm$ DP)	2,7 $\pm$ 1,0	2,6 $\pm$ 0,5	0,78

**Enzimas Cardíacas e Troponinas.** A concentração máxima de CPK e CPK-MB no período pós-operatório imediato não foi diferente entre os grupos operados com e sem CEC (Tabela 1). As troponinas não apresentaram elevação detectável nas colheitas de sangue realizadas durante o procedimento cirúrgico em ambos os grupos (Tabela 2). Nas medidas realizadas após a cirurgia, houve elevação das troponinas, que foi maior no grupo operado com CEC de que no grupo operado sem CEC, mas sem atingir significância estatística.

**Tabela 2: Variação das troponinas durante e após a cirurgia (ng/ml)**

Amostras	com CEC		sem CEC		p
	Mediana	EP	Mediana	EP	
Indução Anestésica	0,00	0,05	0,00	0,00	0,35
Fim Anastomoses	0,00	0,1	0,00	0,07	0,44
6 Horas Pós-Anastomoses	2,20	1,26	0,87	0,53	0,08
24 Horas Pós-Anastomoses	1,10	3,12	1,00	1,29	0,73
p	<0,001		<0,001		

**Achados Ecocardiográficos.** As medidas ecocardiográficas antes e após a cirurgia são apresentadas na Tabela 3. No grupo operado com CEC, houve diminuição dos volumes registrados após a cirurgia. As outras medidas não mostraram diferença significativa entre os valores encontrados antes e após a cirurgia: O grupo submetido à cirurgia sem CEC apresentou diminuição do volume diastólico e da fração de ejeção após a cirurgia. O volume sistólico apresentou pequeno aumento, sem significância estatística, e os diâmetros não registraram diferença entre valores encontrados antes e após o procedimento.

**Tabela 3: Medidas ecocardiográficas antes e após a cirurgia.**

medidas pré -op	com CEC		p	sem CEC		p
	pré-op (média ± DP)	pós-op (média ± DP)		pré-op (média ± DP)	pós-op (média ± DP)	
Diâmetro Diastólico (mm)	49 ± 5	49 ± 6	0,11	51 ± 5	49 ± 7	0,18
Diâmetro Sistólico (mm)	31 ± 6	32 ± 7	0,15	31 ± 4	34 ± 6	0,09
Volume Diastólico Final (ml )	87± 30	79 ± 36	0,01	112 ± 33	96 ± 36	0,01
Volume Sistólico Final (ml)	33 ± 17	32 ± 18	0,01	44 ± 27	56 ± 36	0,27
Fração de Ejeção (%)	64±9	65 ± 9	0,77	63 ± 12	56 ± 11	0,01



**Efeito da Circulação Extracorpórea na Ativação Linfocitária.** A avaliação do comportamento do percentual dos linfócitos T (CD3+), durante o período de tempo do estudo, não teve diferença entre os grupos operados com e sem CEC. Da mesma forma, não houve diferença entre os dois grupos quanto ao percentual de expressão em linfócito T (CD3+) dos marcadores de ativação linfocitária CD25 (p=0,41), CD26 (p=0,50), CD69 (p=0,312), DR (p=0,56) (Tabela 4)

**Tabela 4: Dados evolutivos dos marcadores de ativação em linfócitos T por tipo de cirurgia (%)**

Marcadores (média±DP)	Tipo de Cirurgia	Indução Anestésica	Fim Anastomoses	6h Pós Fim Anastomoses	24h Pós Fim Anastomoses	p
<b>CD3</b>	c/sec	70,4±7,2	64,9±7,9	50,6±11,8	61,37±9,1	0,65
	s/cec	72,2±8,1	69,7±9,4	51,2±10,8	62,7±8,3	
<b>CD25</b>	c/sec	5,8±3,5	4,9±2,8	6,1±3,7	8,9±5,1	0,31
	s/cec	7,9±6,4	7,6±4,9	6,4±3,3	8,4±5,0	
<b>CD26</b>	c/sec	30,7±10,9	26,6±11,9	18,4±8,6	26,9±9,3	0,96
	s/cec	28,6±14,1	25,4±10,3	17,5±8,0	24,2±10,7	
<b>CD69</b>	c/sec	7,6±5,6	13,2±11,0	10,7±5,9	6,6±3,0	0,79
	s/cec	4,6±4,0	10,2±8,3	9,8±4,5	5,2±2,2	
<b>DR</b>	c/sec	4,9±2,2	4,9±2,3	5,8±4,1	4,4±1,9	0,14
	s/cec	7,0±5,43	5,9±3,6	5,5±4,3	6,3±4,4	

**Tabela 5: Dados evolutivos dos marcadores de ativação em linfócitos B por tipo de cirurgia (%)**

Marcadores (média±DP)	Tipo de Cirurgia	Indução	Fim	6h Pós	24h Pós	p
		Anestésica	Anastomoses	Fim Anastomoses	Fim Anastomoses	
<b>CD19</b>	c/sec	12,0±5,0	8,7±4,5	12,7±4,7	19,3±7,2	0,19
	s/cec	10,5±2,7	9,1±3,8	14,5±10,6	16,3±8,7	
<b>CD25</b>	c/sec	0,5±0,7	0,6±0,9	1,0±0,8	0,9±0,9	0,96
	s/cec	0,5±0,6	0,4±0,3	1,1±0,9	1,0±1,3	
<b>CD26</b>	c/sec	1,9±1,2	2,1±1,5	1,8±1,2	2,4±1,3	0,25
	s/cec	4,3±6,0	2,3±2,4	2,7±2,6	2,4±2,2	
<b>CD69</b>	c/sec	4,6±3,8	4,5±3,4	7,0±3,9	4,1±1,8	0,92
	s/cec	2,7±3,0	3,6±2,3	5,7±4,7	2,6±2,5	
<b>DR</b>	c/sec	12,3±4,9	9,2±4,7	13,7±5,2	20,2±8,6	0,32
	s/cec	10,7±2,6	8,9±3,2	14,1±9,4	16,2±7,4	

O percentual de linfócitos B (CD19+) também não apresentou comportamento diferente nos dois grupos durante o tempo de avaliação, assim como o percentual de expressão em linfócitos B (CD19+), dos marcadores de ativação linfocitária CD25, CD26, CD69 e DR (Tabela 5).

**Ativação Linfocitária em Resposta ao Trauma Cirúrgico.** Como não houve diferença na ativação linfocitária entre a cirurgia com e sem CEC, analisamos a resposta dos marcadores ao trauma cirúrgico reunindo os resultados dos dois grupos. O percentual de apresentação dos diferentes marcadores de ativação linfocitária em linfócitos T (CD3+) e linfócitos B (CD19+), nas diversas medidas efetuadas durante o estudo, teve comportamentos distintos. Em linfócitos T (CD3+), há evidência de ativação precoce,

demonstrada pela elevação do percentual de ativação de CD 69 que se inicia logo após a indução anestésica, persiste em ascensão até o final das anastomoses (hora 3) dos enxertos coronarianos, a partir daí tende a se estabilizar e atinge valores semelhantes ao do início da cirurgia na última medida (hora 27) ( $p < 0,001$ ). O marcador CD25 apresenta uma curva semelhante ao CD69 porém mais tardia, inicia uma elevação a partir da hora 9 (6 horas após o término das anastomoses coronarianas), sendo a última medida efetuada a de valor mais alto ( $p = 0,027$ ). O marcador de ativação CD26 diminui seus valores percentuais de apresentação no início do procedimento, sendo seus valores menores, cerca de 20% inferiores aos valores iniciais, encontrados 6 horas após o término das anastomoses coronarianas (hora 9) . A partir deste momento a expressão de CD26 tende a retornar aos valores prévios e são muito próximos aos do início da cirurgia na última medida (hora 27) ( $p < 0,001$ ). O comportamento dos valores percentuais de apresentação do marcador DR é de uma pequena queda, mais acentuada 6 horas após o término das anastomoses (hora 9), retornando a valores iniciais ( $p = 0,91$ ) (tabela 4 e figura 1)

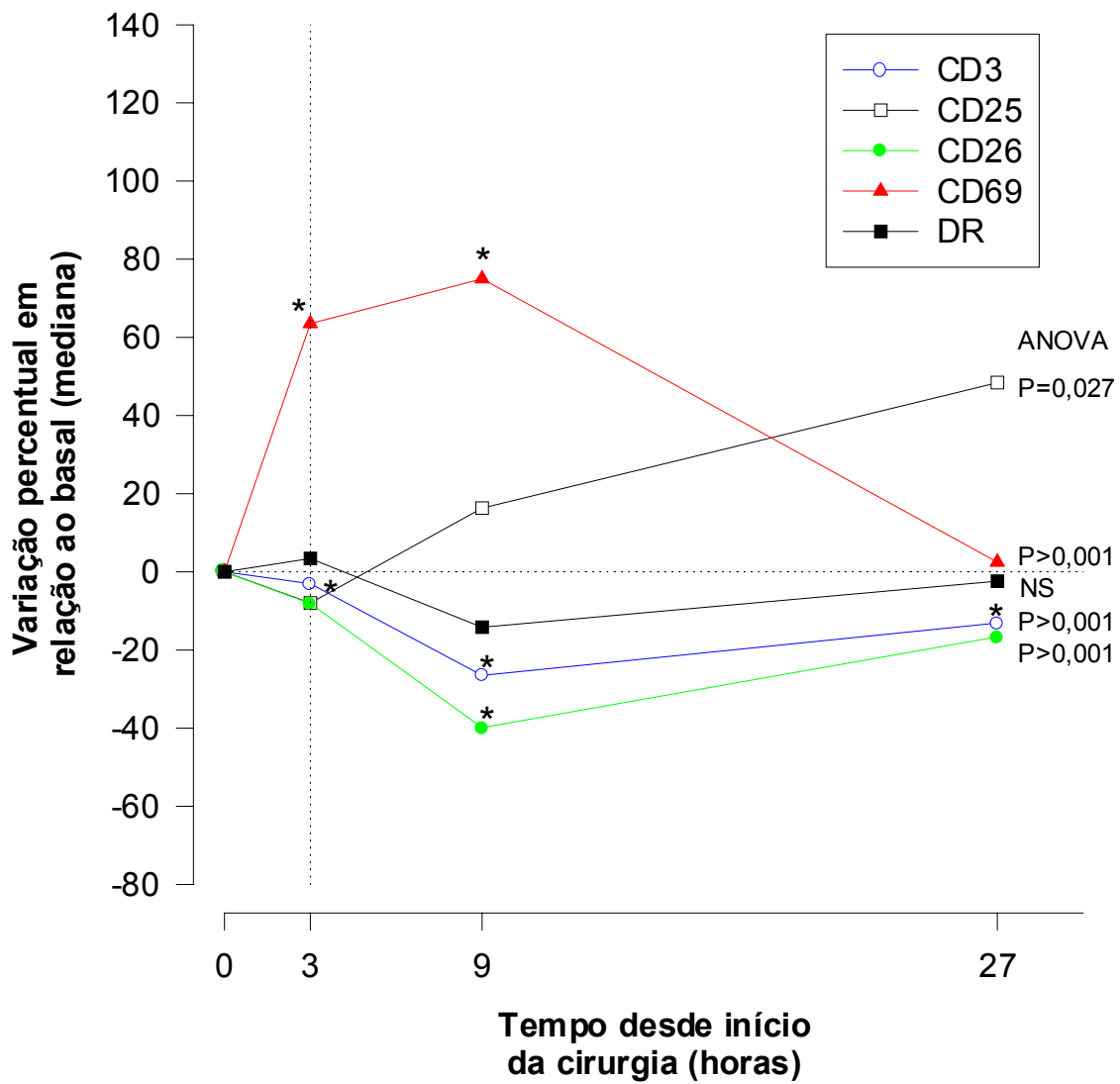


Figura 1: Variação temporal dos marcadores de ativação em linfócitos T  
 \*  $p < 0,0166$ , comparado ao ponto inicial da curva

Nos linfócitos B (CD19+), o percentual de expressão de CD 69 eleva-se já a partir do final das anastomoses coronarianas (hora 3), tem seu pico 6 horas após (hora 9), voltando a valores próximos aos obtidos na indução anestésica na última medida (hora 27) ( $p < 0,001$ ). O marcador CD25, após queda ao final das anastomoses coronarianas (hora 3), tem expressão muito aumentada 6 horas após (horas 9), com queda ao final das medidas (hora 27), mas ainda longe dos valores iniciais ( $p = 0,003$ ). O marcador CD26 não acompanha a linfocitose relativa dos linfócitos B, e sofre um declínio gradual, pouco expressivo, que começa a se manifestar 6 horas após o término das anastomoses (hora 9) e ainda apresenta uma tendência ao declínio na medida final (hora 27) ( $p = 0,94$ ). O marcador DR apresenta curva de expressão que acompanha muito próximo a evolução de CD19 mostrando que não tem sua expressão alterada em linfócitos B ao longo do tempo do estudo ( $p < 0,001$ ) (tabela 5 e figura 2).

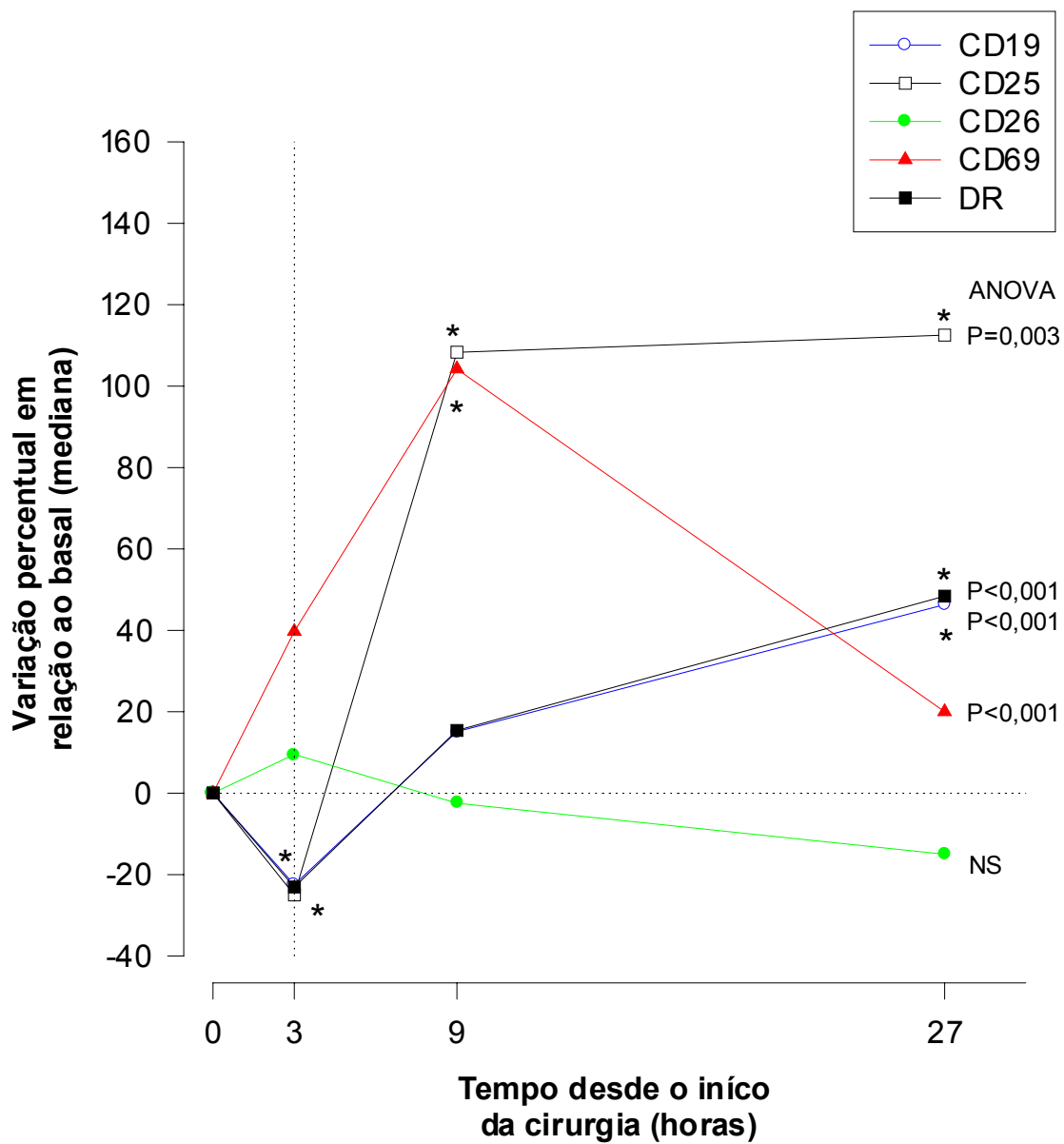


Figura 2: Variação temporal dos marcadores de ativação em linfócitos B  
 \* p<0,0166, comparado ao ponto inicial da curva

**Tabela 6: Dados evolutivos de marcadores de ativação dos linfócitos T em todos os pacientes (%)**

Marcadores (média±DP)	Indução	Fim	6h Pós	24h Pós	p
	Anestésica	Anastomoses	Fim Anastomoses	Fim Anastomoses	
<b>CD3</b>	71,2±7,6	67,2±8,8	50,9±11,1	62,0±8,6	< 0,001
<b>CD25</b>	6,9±5,2	6,3±4,2	6,3±3,4	8,6±4,9	= 0,027
<b>CD26</b>	29,7±12,3	26,0±11,0	18,0±8,2	25,7±9,9	< 0,001
<b>CD69</b>	6,3±5,1	11,9±9,8	10,3±5,2	6,0±2,7	< 0,001
<b>DR</b>	5,9±4,2	5,4±3,0	5,7±4,1	5,3±3,4	= 0,912

**Tabela 7: Dados evolutivos de marcadores de ativação dos linfócitos B em todos os pacientes (%)**

Marcadores (média±DP)	Indução	Fim	6h Pós	24h Pós	p
	Anestésica	Anastomoses	Fim Anastomoses	Fim Anastomoses	
<b>CD19</b>	11,3±4,0	8,9±4,1	13,6±8,0	17,9±7,9	< 0,001
<b>CD25</b>	0,5±0,6	0,5±0,7	1,0±0,8	1,0±1,1	= 0,003
<b>CD26</b>	3,0±4,3	2,2±2,0	2,2±2,0	2,4±1,8	= 0,939
<b>CD69</b>	3,7±3,5	4,1±2,9	6,4±4,3	3,4±2,2	< 0,001
<b>DR</b>	11,5±4,0	9,0±4,00	13,9±7,4	18,1±8,1	< 0,001

## Discussão

A cirurgia de revascularização miocárdica realizada sem a utilização de CEC tem sido muito valorizada com o propósito de diminuir a morbidade, mortalidade e custos<sup>3-11,28-31</sup>. Além do esforço para se obterem evidências clínicas sobre a importância das novas técnicas, é também importante que sejam esclarecidos os aspectos fisiopatológicos envolvidos.

Na cirurgia de revascularização miocárdica existe aumento da liberação de citocinas e da expressão de moléculas de adesão celular tanto em leucócitos quanto no endotélio<sup>32-48</sup>. A atividade dos mediadores solúveis e o contato com as moléculas de adesão podem induzir a ativação dos linfócitos<sup>49</sup>.

A elevação de citocinas e aumento de expressão de moléculas de adesão celular estão relacionadas ao trauma cirúrgico e à circulação extracorpórea<sup>33,34</sup>. Já demonstrada menor atividade destes fatores nos pacientes submetidos à cirurgia sem utilização de CEC do que naqueles submetidos ao procedimento convencional<sup>16,50-54</sup>, sem, contudo, que isto tenha conseqüências clínicas evidentes<sup>16</sup>. Não há relato de estudo que tenha comparado a ativação linfocitária em pacientes submetidos à cirurgia de revascularização miocárdica com e sem CEC.



## **Marcadores de necrose miocárdica**

Savaris et al estudaram o comportamento das troponinas I em pacientes submetidos a CRM convencional e encontraram uma relação inversa entre o nível de troponina e a fração de ejeção avaliada ecocardiograficamente no pós-operatório<sup>48</sup>. Um estudo retrospectivo, sobre o comportamento enzimático de pacientes que realizaram CRM, não mostrou diferença significativa dos níveis de CK-MB ou troponina I entre pacientes operados com CEC (n=181) e, sem CEC (n=122)<sup>55</sup>. No estudo de Leal et al, os pacientes submetidos à cirurgia com CEC tiveram níveis significativamente mais elevados de troponina do que os submetidos à cirurgia sem CEC. Não houve porém, entre os operados com CEC, correlação entre os valores registrados das enzimas e tempo de isquemia ou tempo de CEC, o que sugere ser a elevação maior, registrada no grupo com CEC, decorrente de dano miocárdico diretamente ligado a diferenças técnicas da cirurgia e não pelo processo da CEC<sup>56</sup>. No estudo de Wan et al, os níveis de troponina I, nos pacientes operados sem CEC foram inferiores aos dos pacientes operados com CEC e houve correlação entre os valores de troponina 24 horas após a cirurgia e os níveis de IL-8. Isto evidenciaria que o grau de dano miocárdico pudesse estar relacionado à intensidade do processo inflamatório desencadeado na cirurgia<sup>16</sup>. Czerny et al também encontraram elevação mais acentuada nos pacientes operados com CEC do que nos operados sem CEC, não só para troponina I, mas também para CK-MB e mioglobina. Neste estudo, que não incluiu IL-8, diferentemente do anterior, não houve diferença significativa quanto aos marcadores inflamatórios entre os dois grupos de cirurgias. Em presença destes achados, os autores propõem que o dano miocárdico seria menos intenso, nas cirurgias sem CEC, principalmente por serem estes pacientes

submetidos à isquemia regional transitória produzida pelo colapso da artéria coronariana no momento da sua revascularização ao invés de isquemia global prolongada e cardioplegia, características da CEC. As alterações eventualmente relacionadas ao processo inflamatório seriam de importância muito menor<sup>14</sup>. A mediana dos valores de troponina I dos nossos pacientes passou a elevar-se nas medidas realizadas no pós-operatório. Os valores foram maiores no grupo operado com CEC, mas sem que se atingisse diferença significativa em nenhum destes momentos. Não consideramos que este resultado tenha sido prejudicado apenas pela falta de poder estatístico da nossa amostra, visto que, um dos relatos, que maiores evidências apresenta sobre esta diferença de comportamento das enzimas nos pacientes operados com e sem CEC, é constituído de apenas 30 pacientes. Os diferentes resultados encontrados pelos diversos autores, em nossa opinião, se devem ao fato de que interagem na elevação enzimática dos pacientes submetidos a CRM, vários mecanismos, relacionados à técnica cirúrgica, a CEC e às características individuais dos pacientes, que se manifestam de forma variável nos trabalhos apresentados.

### **Avaliação da Função Ventricular**

As modificações das dimensões e da função ventricular na CRM podem estar relacionadas às condições prévias dos pacientes, aos vários fatores que interagem durante o procedimento e ao resultado obtido na recuperação da perfusão miocárdica comprometida pela doença. A ecocardiografia é instrumento que pode ser extremamente útil no acompanhamento das alterações miocárdicas durante e após a cirurgia<sup>57</sup>. Os parâmetros de função sistólica e diastólica sofrem um comprometimento moderado durante a cirurgia sem

CEC em consequência do posicionamento do coração e da interrupção do fluxo coronariano. Estas alterações são mais marcadas quando há manuseio da artéria circunflexa e desaparecem ao final do procedimento<sup>58</sup>. Nos pacientes operados sem CEC, com fração de ejeção muito baixa (>30%) nota-se aumento significativo da contratilidade miocárdica nas avaliações realizadas um mês e um ano após a cirurgia<sup>59</sup>. No grupo que estudamos, entre os pacientes operados com CEC, houve diminuição estatisticamente significativa, mas em valores de discutível importância clínica, dos volumes sistólico e diastólico do ventrículo esquerdo, sem modificação da fração de ejeção. Já no grupo operado sem CEC, diminuiu apenas o volume diastólico, sem alteração significativa no volume sistólico, e isto se refletiu em diminuição da fração de ejeção em aproximadamente dez pontos percentuais em relação ao pré-operatório. Como nossos pacientes foram avaliados precocemente, ainda na fase hospitalar, é possível que estas alterações ainda sejam resultantes das modificações hemodinâmicas secundárias ao manuseio do coração, característico da técnica sem CEC. Por outro lado, a melhora da função ventricular, resultante do sucesso cirúrgico sobre a isquemia miocárdica, não seria de se esperar que fosse muito evidente por tratar-se de uma amostra na qual se excluíram os pacientes com a função ventricular muito comprometida, que deveriam expressar o maior benefício.

### **Comparação dos marcadores de ativação e cirurgia c/cec versus s/cec**

No grupo de pacientes que estudamos, foi avaliada expressão dos marcadores de ativação celular CD25, CD26, CD69 e DR em linfócitos T (CD3+) e linfócitos B (CD19+), em 2 medidas realizadas durante o ato operatório e 2 medidas realizadas até 24 horas após a

cirurgia. Quando comparados os pacientes operados com CEC e sem CEC, não foi encontrada diferença entre as curvas de expressão dos diversos marcadores de ativação, seja para linfócitos T (CD3+) ou para linfócitos B (CD19+). Este resultado é semelhante ao obtido na comparação de 8 pacientes submetidos à cirurgia de esôfago com pacientes submetidos à cirurgia cardíaca (4 cirurgias de revascularização miocárdica e duas cirurgias valvulares) que, da mesma forma, não mostrou diferença entre os grupos quanto à ativação linfocitária precoce estudada pela expressão de CD69<sup>22</sup>. Também não houve diferença entre os grupos de pacientes operados com ou sem CEC por Griebler et al<sup>60</sup>, em estudo que avaliou o efeito da CRM sobre as subpopulações de linfócitos. Conclui-se que a ação sobre os linfócitos, neste tipo de procedimento, seja resultante predominantemente do trauma cirúrgico e não pela circulação extracorpórea.

### **Comportamento dos marcadores de ativação no trans e pós-operatório**

Na avaliação da evolução dos marcadores de ativação linfocitária em todos os 28 pacientes por nós estudados, encontramos um aumento precoce da expressão de CD69 em linfócitos T (CD3+) e linfócitos B (CD19+). As curvas de expressão do marcador CD25 também sofreram elevação. Sua ascensão, pico máximo e descenso se registraram posteriormente aos pontos respectivos das curvas de CD69, evidenciando um comportamento que sugere ações em seqüência na ativação dos linfócitos. O marcador CD26 mostrou diminuição progressiva dos seus valores em linfócitos T e B. Persistiu com o mesmo comportamento até o 1º dia pós-operatório em linfócitos B, mas sofreu retorno parcial a valores pré-operatórios em linfócitos T, na medida realizada 24 horas após as

anastomoses coronarianas. O marcador DR não teve expressão alterada em linfócitos T. O marcador DR também mostra comportamento que acompanha a curva de linfócitos B.

As publicações que inicialmente se dedicaram ao comportamento dos linfócitos após procedimentos cirúrgicos mostram ausência ou mesmo diminuição da atividade linfocitária após cirurgias de grande porte. Esta aparente diminuição da capacidade imunitária poderia ser positiva por evitar reações exageradas do organismo aos diferentes produtos com que é posto em contato durante o ato cirúrgico, mas também aumentaria os riscos inerentes relacionados a complicações infecciosas<sup>61</sup>.

Misoph et al estudaram 27 pacientes submetidos a revascularização miocárdica e encontraram um aumento dos linfócitos no início da cirurgia e após um declínio, que atingia seus valores mínimos 8 horas após a inativação da heparina pela protamina. A partir deste ponto houve ascensão gradual até 24 horas após a cirurgia. Estudando as sub-populações de linfócitos, os linfócitos T auxiliares também mostravam valores mínimos 8 horas após a protamina, com elevação progressiva após. Os linfócitos T citotóxicos apresentaram uma elevação inicial, com posterior descenso até a última medida, e os linfócitos B apresentaram declínio inicial com ascensão posterior. Em relação a marcadores de ativação linfocitária, não houve modificação de CD25 e CD69 em nenhum dos leucócitos estudados. O marcador HLA-DR estava aumentado em seu valor máximo em linfócitos T citotóxicos 8 horas após a protamina, exatamente no mesmo ponto em estes linfócitos atingiam seu valor numérico mínimo. Os autores referem que a linfopenia, que é registrada por período muito breve, e as alterações diferentes nas diversas sub-populações de linfócitos sugerem tratar-se de uma reação imune ativa muito rápida e não um processo de imunossupressão, como previamente proposto<sup>21</sup>.

Diferentemente de Misoph et al, Shimaoka et al encontraram elevação da expressão de CD69, que é um marcador de ativação precoce dos linfócitos. A população deste estudo era constituída de pacientes submetidos a cirurgias esofágicas ou cardíacas<sup>22</sup>. A ativação precoce dos linfócitos levaria a anergia e apoptose. Estas seriam responsáveis pela diminuição da atividade e do número de linfócitos, encontrados quando a avaliação se realiza em momentos mais avançados em relação ao procedimento<sup>22</sup>. Este raciocínio vai de encontro aos resultados de Franke et al, que avaliaram a resposta inflamatória pós cirurgia de revascularização miocárdica desde o pré-operatório até cinco dias após a cirurgia<sup>61</sup>. Estes autores descrevem uma resposta bifásica. Uma resposta inicial, na qual estão presentes fatores pró-inflamatórios e antiinflamatórios relacionados ao sistema imune inato, que normaliza até o terceiro dia. A segunda fase (5<sup>o</sup>. dia PO) representaria a resposta do sistema imune adaptativo, dependente da atividade dos linfócitos, caracterizada por uma reação do tipo antiinflamatória. Isto explicaria porque a resposta inflamatória sistêmica ocorre imediatamente após a cirurgia enquanto as complicações infecciosas são mais tardias<sup>62</sup>.

Nosso trabalho, pelo aumento da expressão de CD69 e CD25 em curvas sucessivas compatíveis com uma ativação em cadeia, e pelo comportamento diversificado dos outros marcadores, reforça a possibilidade de que o trauma cirúrgico tenha como consequência à ativação de uma reação linfocitária muito rápida, com finalidades imunológicas específicas. Estas finalidades poderiam ser, como sugerem Shimaoka et al, a apoptose e anergia.

## **Teorias que integram os novos conhecimentos sobre Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica**

Vários autores tem procurado decifrar o complexo e multifatorial sistema que envolve a fisiopatologia da Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS) e sua conseqüência mais grave, a Falência de Múltiplos Órgãos (MODS). A regulação da apoptose parece ser um processo homeostático mediado por fatores intracelulares. O desencadeamento da apoptose através de sinalização específica intracelular seria a via final comum que levaria a resposta inflamatória exagerada, vista nas situações de SIRS, a evoluir para a falência de múltiplos órgãos<sup>63</sup>.

Inicialmente pensava-se que a resposta a qualquer agente, seja infecção, hemorragia ou trauma, era o desencadeamento pelo organismo de uma reação inflamatória capaz de amplificar a si mesma indefinidamente. O resultado seria um gravíssimo estado séptico que, freqüentemente, levava ao choque, disfunção de múltiplos órgãos e morte. Pouco se sabia da capacidade do corpo reduzir, por si mesmo, a atividade desta cascata inflamatória. As tentativas de utilizar terapêuticas direcionadas a atenuar os efeitos dos mediadores pró-inflamatórios tiveram resultados desapontadores. Hoje se propõe que, simultaneamente à ativação pró-inflamatória, o organismo inicia uma resposta antiinflamatória, da qual muitos agentes já foram identificados (p. ex. IL-4, IL-10, IL-11 e IL-13)<sup>64,65</sup>. Estes mediadores também inibem a atividade dos linfócitos T e B, podendo resultar em imunossupressão, que pode ser grave. Se a resposta antiinflamatória for suficientemente importante, ela se manifestará clinicamente por anergia imunológica e aumento da suscetibilidade a infecções. A esta ativação antiinflamatória foi proposta a designação de Síndrome da Resposta Anti-

Inflamatória Compensatória (CARS). A resposta ao agente externo deve ser vista como a interação entre os mediadores pró e antiinflamatórios. Se estes fatores antagônicos se opõem com intensidades semelhantes e o agente desencadeante é resolvido, recompõe-se a homeostasia. Quando o equilíbrio não pode ser estabelecido, surge uma reação grave que pode ser, predominantemente, inflamatória ou antiinflamatória. Quando houver predomínio de SIRS, teremos manifestações cardiovasculares graves, incluindo o choque e apoptose. Caso haja predomínio de CARS, teremos anergia imunológica e maior risco de infecções<sup>64</sup>.

Mesmo sendo esta proposta de um sistema binário para a resposta inflamatória, mais satisfatória do que a simples modulação de sistema exclusivamente pró-inflamatório, outras questões, mais arrojadas são levantadas. Considerando que a Resposta Inflamatória Sistêmica e a Falência de Múltiplos Órgãos são processos extremamente complexos, onde interagem vários órgãos, tecidos e agentes químicos, com mecanismos que se processam em múltiplas direções, surge a necessidade de modelos capazes de abranger toda esta complexidade. Atualmente, um novo entendimento dos sistemas complexos vem sendo buscado por uma variedade de cientistas no campo das ciências geológicas, biológicas, psicológicas e do comportamento. O campo da matemática que se dedica ao estudo dos sistemas complexos chama-se dinâmica não-linear. Os Sistemas Complexos Não-Lineares (SCNL) podem ser definidos como sistemas constituídos por um número muito grande e variável de componentes, onde cada um dos componentes, individualmente, apresenta grande variabilidade no correr do tempo, e são caracterizados por um alto grau de conectividade ou interdependência entre as variáveis. Os SCNL têm uma propriedade única mais importante, eles são capazes de criar a grande estabilidade e ordem que observamos diariamente no mundo que nos cerca. A propriedade fundamental dos SCNL de integrar as



múltiplas partes e suas complexas inter-relações, formando um conjunto estável e com propriedades definidas, é chamada de "ordem emergente"<sup>66</sup>.

Godin et al propõem que os vários fatores que concorrem à instalação da SIRS sejam vistos e estudados como um SCNL. Neste contexto, afirmam que a evolução da SIRS para a falência de múltiplos órgãos se instalaria quando houvesse dano irreversível dos órgãos em si ou das inter-relações entre os diversos componentes do sistema. Reforçam novamente que os efeitos inesperados e, até indesejados, das terapias anti-citocinas para sepse poderiam refletir a "não-linearidade" na fisiologia humana, ou, mais especificamente, na fisiopatologia da sepse e da falência de múltiplos órgãos<sup>67</sup>.

É cabível transpor para a situação da cirurgia cardíaca estes conceitos de equilíbrio entre mecanismos pró-inflamatórios e antiinflamatórios coexistindo dentro de um sistema complexo. Partindo destes princípios teóricos, podemos inferir a necessidade de existirem processos de ativação linfocitária indutores de apoptose e anergia imunológica que se contraponham à intensa atividade dos mecanismos pró-inflamatórios relacionados ao trauma cirúrgico, mantendo o equilíbrio do sistema, necessário à manutenção da estabilidade homeostática.

## **Conclusões**

**1.** A ativação linfocitária na cirurgia de revascularização miocárdica está relacionada primariamente ao trauma cirúrgico e não aos procedimentos da CEC

**2.** A CRM desencadeia ativação precoce dos linfócitos evidenciada pelo aumento da expressão de marcadores de membrana da ativação linfocitária. A forma como se apresentam as curvas de expressão dos diversos marcadoras sugerem uma ação integrada com finalidades imunológicas específicas.

**3.** Há elevação de troponinas na CRM, cuja intensidade não mostrou diferença entre pacientes operados com ou sem CEC.

**4.** Nosso estudo mostra que, nos primeiros dias após o procedimento, a cirurgia sem CEC houve uma pequena piora na contratilidade miocárdica avaliada pela fração de ejeção ao ecocardiograma, não registrada nas cirurgias com CEC.

## Referências

1. Favaloro RG. Saphenous vein autograph replacement of severe segmental coronary artery occlusion. *Ann Thorac Surg* 1968;33:5-11
2. Benetti FJ, Naselli G, Wood M, Geffner L. Direct myocardial revascularization without extracorporeal circulation. *Chest* 1991;100:312-15.
3. 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.
4. Buffolo E, Summo H, Aguiar LF, Teles CA, Branco JN. Myocardial revascularization in patients 70 years of age and older without the use of extracorporeal circulation. *Am J Geriatr Cardiol* 1997;61:7-15.
5. Malheiros SM, Brucki SM, Buffolo E, et al. Neurological outcome in coronary artery surgery with and without cardiopulmonary bypass. *Acta Neurol Scand* 1995;92:256-60.
6. Malheiros SM, Massaro AR, Buffolo E. Neurologic complications in coronary surgery without coronary bypass. *Ann Thorac Surg* 2000;69:1992-3.
7. Supramanian VA, McCabe JC, Geller CM. Minimally invasive direct coronary artery bypass grafting: two-year clinical experience. *Ann Thorac Surg* 1997;64:1648-55.

8. Spooner TH, Dyrud PE, Monson BK, Dixon GE, Robinson LD. Coronary artery bypass on the beating heart with the Octopus: a North American experience. *Ann Thorac Surg* 1998;66:1032-5.
9. Ascione R, Lloyd CT, Gomes WJ, Caputo M, Bryan AJ, Angelini GD. Beating versus arrested heart revascularization: evaluation of myocardial function in a prospective randomized study. *Eur J Cardiothorac Surg* 1999;15:685-90.
10. Arom KW, Flavin TF, Emery RW, Kshettry VR, Janey PA, Petersen RJ. Safety and efficacy of off-pump coronary artery bypass grafting. *Ann Thorac Surg* 2000;69:704-10.
11. Ankeney JL. To use or not to use the pump oxygenator in coronary bypass operations. *Ann Thorac Surg* 1975;19:108-9.
12. Angelini GD, Taylor FC, Reeves BC, Ascione R. Early and midterm outcome after off-pump and on-pump surgery in Beating Heart Against Cardioplegic Arrest Studies (BHCAS 1 and 2): a pooled analysis of two randomized controlled trials. *Lancet* 2002;359:1194-9.
13. Ascione R, Lloyd CT, Underwood MJ, Lotto AA, Pitsis AA, Angelini GD. Economic outcome of off-pump coronary artery bypass surgery: a prospective randomized study. *Ann Thorac Surg* 1999;68:2237-42.
14. 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 Cardiothorac Surg* 2000;17:737-42.

15. Menasche P. The systemic factor: the comparative roles of cardiopulmonary bypass and of-pump surgery in the genesis of patient injury during and following cardiac surgery. *Ann Thorac Surg* 2001;72:S2260-5.
16. Wan S, Izzat B, 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.
17. Parslow TG. Lymphocytes and lymphoid tissues. In Parslow TG, Stites DP, Terr AI, Imboden JB. *Medical Immunology*. 10<sup>th</sup> ed New York, Lange Medical Books, McGraw- Hill. 2001:40-60.
18. Petri I, Kaiser G, Gaál T, Kovács G, Petri G. Cellular immune functions after heart operations. *Acta Chirur Acad Sci Hung* 1981;22:29-36.
19. Velzen-Blad H, Dijkstra YJ, Heijnen CJ, Schurinck GA, Zegers BJM, Ballieux RE. Cardiopulmonary bypass and host defense functions in human beings: lymphocyte function. *Ann Thorac Surg* 1985;39:212-7.
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 S, Grossmann R, Keller F, Elert O. Response of the cellular immune system to cardiopulmonary bypass in vivo. *Thorac Cardiovasc Surgeon* 1997;45:217-223.
22. Shimaoka M, Hosotsubo K, Sugimoto M et al. The influence of surgical stress on T cells: enhancement of early phase lymphocyte activation. *Anesth Analg* 1998;87:1431-5.

23. Laqvoinne A, Canliez B, Eltchaninoff H, Koning R, Cribier A. Analytical and clinical performance of the Immulite cardiac troponin I assay. *Clin Chem* 2000;46:1989-90.
24. Whitterspoon LR, Babson AL, Olson DR. Immulite chemiluminescent immunoassay system. In Chan DW ed. *Immunoassay automative*. San Diego Academic Press. 1996:103-30.
25. Horder M, Elser RC, Gerhardt W, Mathieu M, Sampson EJ. IFCC Methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 7. IFCC method for creatinine kinase (ATP: creatinine N-phosphotransferase, EC 2.7.3.2). *J Int Fed Clin Chem* 1989;1:130-9.
26. Sahn DJ, DeMaria A, Kissio A. Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation* 1978;58:1072-86)
27. Schiller NB, Shah PM, Crawford M et al. Recommendations for quantitation of the left ventricle by two-dimensional echocardiography. American Society of Echocardiography Committee on Standards, subcommittee on Quantitation of Two-Dimensional Echocardiograms. *J Am Soc Echocardiog* 1989;2:358-67
28. Borst C Jansen EW, Gründeman PF. Less invasive coronary artery bypass grafting: without cardiopulmonary bypass and reduced surgical access. *Heart* 1997;77:302-3.
29. Cleveland JC, Shroyer LW, Chen AY, Peterson E, Grover, FL. Off-pump coronary artery bypass grafting decreases risk-adjusted mortality and morbidity. *Ann Thorac Surg* 2001;72:1282-9.

30. Lima RC, Escobar MAS, Salerno T et al. Avaliação hemodinâmica intra-operatória na cirurgia de revascularização miocárdica sem auxílio de circulação extracorpórea. Rev Bras Cir Cardiovasc 2000; 15:201-11.
31. Brasil A, Mariano JB, Santos FM, et al. Revascularização do miocárdio sem circulação extracorpórea: experiência e resultados iniciais. Rev Bras Cir Cardiovasc 2000;15:6-15.
32. Hall RI, Smith MS, Rocker G. The systemic inflammatory response to cardiopulmonary bypass: pathophysiological, therapeutic, and pharmacological considerations. Anesth Analg 1997;85:766-82.
33. Savaris N. Resposta imunoinflamatória à circulação extracorpórea: estado atual. Rev Bras Anesthesiol 1998;48:126-36.
34. Butler J, Rocker GM, Westaby S. Inflammatory response to cardiopulmonary bypass. Ann Thorac Surg 1993;55:552-9.
35. Menaché P. The inflammatory response to cardiopulmonary bypass and its impact postoperative myocardial function. Curr Opinion Cardiol 1995;10:597-604.
36. Royston D. The inflammatory response and extracorporeal circulation. J Cardiothorac Vasc Anesth 1997;11:341-54.
37. Miller BE, Levy JH. The inflammatory response to cardiopulmonary bypass. J Cardiothorac Vasc Anesth 1997;11:355-66.
38. 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.
39. Hill GE Whitten CW. The role of the vascular endothelium in inflammatory

- syndromes, atherogenesis and propagation of disease. *J Cardiothorac Anesth* 1997;11:316-21.
40. 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 Anesth* 1993;40:1016-21.
41. Menaché P, Haydar S, Peynet J et al. A potential mechanism of vasodilatation after warm heart surgery. The temperature-dependent release of cytokines. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1994;107:293-9.
42. Haeffner-Cavaillon N, Rousselier N, Ponzio O, et al. Induction of interleukin-1 production in patients undergoing cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1989;98:1110-6
43. Frerking B, Philip I, Dehoux M, Rodland C, Langlois JM, Desmots JM. Circulating cytokines in patients undergoing normothermic cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1994;108:636-41.
44. Kharazami A, Andersen LW, Back L, Valerius NH, Laub M, Rasmussen JP. Endotoxemia and enhanced generation of oxygen radicals by neutrophils from patients undergoing cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1989;98:381-5.
45. Nilson L, Kulander L, Nystrom SO, Eriksson. Endotoxin in cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1990;770-80.
46. Roake DA, Gaffin SL, Wells MT, Koen Y, Brock-Utine JG. Endotoxemia associated with cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1987;93:832-7.
47. Ohri SK, Becket J, Brannan J, Keogh BE, Taylor KM. Effects of cardiopulmonary



- bypass on gut blood flow, oxygen utilization, and intramucosal pH. *Ann Thorac Surg* 1994;57:1193-9.
48. 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.
49. Markewitz A, Lante W, Franke A, Marohl 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.
50. Strüber M, Cremer JT, Gohrbandt B, et al. Human cytokine responses to coronary artery bypass grafting with and without cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1999;68:1330-5.
51. 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.
52. Matata BM, Sosnowski AW, Galiñanes M. Off-pump bypass graft operation significantly reduces oxidative stress and inflammation. *Ann Thorac Surg* 2000;69:785-91.
53. 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;69:1198-204.
54. Schulze C, Conrad N, Schutz A, et al. Reduced expression of systemic proinflammatory cytokines after off-pump versus conventional coronary artery bypass grafting. *Thorac Cardiovasc Surg* 2000;48:364-9.

55. Soltoski PR, D'Ancona G, Salerno TA, et al. Enzimas miocárdicas na cirurgia de revascularização sem circulação extracorpórea. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 2000;15:105-8.
56. Leal JCF, Braile DM, Godoy MF, et al. Avaliação imediata da troponina I cardíaca em pacientes submetidos a revascularização do miocárdio. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 1999;14:247-53.
57. Al-Tabbaa A, Gonzalez RM, Lee D. The role of state-of-the-art echocardiography in the assessment of myocardial injury during and following cardiac surgery. *Ann Thorac Surg* 2001;72:S2214-9.
58. Biswas S, Clements F, Diodato L, Hughes GC, Landolfo K. Changes in systolic and diastolic function during multivessel off-pump coronary bypass grafting. *Eur J Cardiothorac Surg* 2001;20:913-7.
59. Eryilmaz S, Corapcioglu T, Eren NT, Yazicioglu L, Kaya K, Akalin H. Off-pump coronary bypass surgery in the left ventricular dysfunction. *Eur J Cardiothorac Surg* 2002;21:36-40.
60. Diegeler A, Tárnok A, Rauch Th, et al Changes of leukocyte subsets in coronary artery bypass surgery: Cardiopulmonary bypass versus "off-pump" techniques. *Thorac Cardiovasc Surg* 1998;46:327-32.
61. Brody JI, Pickering NJ, Fink GB, Behr ED. Altered lymphocyte subsets during cardiopulmonary bypass. *Am J Clin Pathol* 1987;87:626-8.
62. Frank A, Lante W, Fackeldey V et al. Proinflammatory and antiinflammatory cytokines after cardiac operations: different cellular sources at different times. *Ann Thorac Surg* 2002;74:363-71.
63. Papathanassoglou EDE, Moynihan JA, Ackerman MH. Does programmed cell death (apoptosis) play a role in the development of multiple organ dysfunction in critically ill patients? A review and a theoretical framework. *Crit Care Med* 2000;28:537-49.
64. Bone RC. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Crit Care Med* 1996;24:1125-28.

65. Kox WJ, Volk T, Kox SN, Volk HD. Immunomodulatory therapies in sepsis. *Intensive Care Med* 2000;26:S214-28.
66. Seely AJE, Christou NV. Multiple organ dysfunction syndrome: Exploring the paradigm of complex nonlinear systems. *Crit Care Med* 2000;28:2193-200.
67. Godin Paul J. Buchman TG. Uncoupling of biological oscillators: A complementary hypothesis concerning multiple organ dysfunction syndrome. *Crit Care Med* 1996;24:1107-16.

## **Anexo 1: Artigo original em inglês**

### **Off-pump coronary artery bypass grafting does not reduce lymphocyte activation: results of a randomized clinical study**

Celso Blacher, MD; Jorge P. Ribeiro, PhD

**Short title:** Cardiopulmonary bypass and lymphocyte activation

Medicine School, State University of Rio Grande do Sul, Internal Medicine Department

Santa Casa de Porto Alegre

Annes Dias 285,

90020090, Porto Alegre, RS, Brasil

**Key words:** cardiac surgery, myocardial revascularization, cardiopulmonary bypass, T lymphocytes, B lymphocytes.

**Word count:**

Corresponding author:

Dr. Celso Blacher

Murilo Furtado, 287/601

90470440 Porto Alegre, RS, Brasil

tel 55-51-33342822, fax 55-51-32253019

[blacher@via-rs.net](mailto:blacher@via-rs.net)

## ABSTRACT

**Background:** Coronary artery bypass surgery is known to be associated with alteration of inflammatory mediators and immune function, with early phase lymphocyte activation, that could be responsible for postoperative lymphopenia and lymphocyte unresponsiveness. There is lower enzymatic elevation in off-pump surgery but it is not associated with better clinical outcome. In this thesis, we test the hypothesis that off- pump coronary bypass surgery might result in less lymphocyte activation than on-pump coronary surgery. The influence of cardiopulmonary bypass on myocardium is evaluated by the evolution of cardiac enzymes (troponin I) and echocardiographic findings. We also study lymphocyte activation markers behavior during trans and post-operative period.

**Methods:** We studied lymphocyte activation response during the operative and post-operative period in 28 patients randomized to off-pump coronary surgery (n = 13) or conventional on-pump coronary surgery (n = 15) using flow cytometry to determine expression of CD23, CD25, CD26, CD69 and DR on T (CD3+) and B (CD19+) lymphocytes in the peripheral blood. At the same period, blood samples were tested for troponin I by chemo luminescent method. Uni-bidimensional echocardiograms were done previously and after surgery.

**Results:** There were no significant differences in any of the lymphocyte activation markers off-pump compared to on-pump coronary surgery. Considering all patients studied, there was an elevation of the proportional expression of CD69 and CD25 in T (CD3+) and B (CD19+) lymphocytes. In T lymphocytes, the higher proportional median value ( $\pm$  SE) of CD69 was observed 6 hours after completion of anastomosis ( $+75 \pm 476$  %), and CD25 had a more gradual elevation, with its peak median value ( $+48 \pm 24$  %) occurring 24 hours after

revascularization. In B-lymphocytes, CD69 peak median value ( $+104 \pm 269$  %) occurred also 6 hours after the end of anastomosis. CD25 had its peak median value ( $+150 \pm 773$  %) 12 hours after revascularization and its last measured value was elevated. The expression of CD 26 in T lymphocytes had an apparent decrease in proportional median values ( $-42 \pm 32$  %) 12 hours after end of anastomosis. There were no significant differences in enzymatic elevation between groups. By echocardiography, off-pump patients presented reduction of diastolic volume ( $p=0,001$ ) and ejection fraction ( $p=0,012$ ), and on-pump presented reduction of diastolic ( $p=0,006$ ) and systolic ( $p=0,01$ ) volumes).

**Conclusions:** 1) Compared to on-pump cardiopulmonary bypass, off-pump surgery does not reduce lymphocyte activation. 2) Coronary bypass surgery results in early activation of lymphocytes, with increased expression of CD69 and CD25 on T (CD3+) and B (CD19+) peripheral blood cells. The early elevation of CD69, and late elevation of CD25, may indicate two parts of a sequence of lymphocyte activation. 3) Cardiac enzymes and echocardiographic measurements behavior do not suggest better results on myocardial damage with off-pump surgery.

## INTRODUCTION

Myocardial revascularization surgery received a major impulse in 1968, following the publication of Dr. Favaloro's work with bypass grafting in 1968<sup>1</sup>. The morbidity and mortality that are still associated with this surgical procedure, despite several improvements, are attributed mostly to cardiac arrest, hypothermia, and the use of cardiopulmonary bypass (CPB). Therefore, since the 1990s, off-pump coronary artery bypass surgery (CABG) has been used as an alternative to improve treatment effectiveness and decrease cost.

Since the publication of the first results of off-pump CABG<sup>2,3</sup>, several investigators have reported a better clinical evolution in patients operated without CPB than in those submitted to the traditional technique, especially in selected high-risk groups<sup>4-10</sup>. However, the few papers so far that have focused on long-term follow-up reported an excessively high number of late revascularization procedures<sup>10,11</sup>. The recent publication of the BHACAS 1 and 2 studies showed decreased intrahospital morbidity and a similar evolution in the first 1 to 3 postoperative years in patients operated with and without CPB<sup>12</sup>.

The most important pathophysiologic mechanisms associated with CPB – myocardial ischemic damage, systemic inflammatory response and effects on cellular immunity – have received special attention. The extent of myocardial injury, assessed by measuring the release of creatine kinase-MB (CK-MB) and troponins, may be decreased in off-pump surgeries<sup>13,14</sup>. This may have important consequences for high-risk patients, especially those in whom myocardial function is already compromised<sup>14,15</sup>.

One of the most important effects of CPB is the activation of the complement cascade, causing activation of neutrophils and production of cytokines. Cytokines reinforce

the neutrophil activation process, promoting neutrophil adhesion to vessel walls and migration through the tissues, and making parenchymatous cells, including myocytes, more susceptible to neutrophil-derived products. Interleukine-8 (IL-8) plays an important role in the inflammatory process, which is counterbalanced by anti-inflammatory effects in which IL-10 has an important participation<sup>15</sup>. IL-6 is one of the acute-phase reactants released in response to tissue damage, which seems to be much more significant than the alterations associated with CPB<sup>15</sup>.

No difference has been found in the levels of IL-6 in patients submitted to of-pump or on-pump CABG<sup>14,16</sup>. This supports the notion that IL-6 is a marker of tissue damage, rather than being an inductor. In surgeries without CPB, the release of IL-8 is decreased and correlated with lower postoperative levels of troponin<sup>15</sup>. Off-pump surgeries have also been associated with increased release of IL-10<sup>14,16</sup>, which has an anti-inflammatory and protective effect on the reperfused myocardium<sup>15</sup>.

Lymphocytes are classified according to their specific functions. B lymphocytes produce immunoglobulins (antibodies), helper T lymphocytes have several immunological functions, and cytotoxic T lymphocytes eliminate cells carrying foreign proteins. To become active, lymphocytes require stimulation<sup>17</sup>. In the 1980s, Petri et al. assessed patients submitted to cardiac surgery and reported a decrease in lymphocyte activation. The study, which included patients submitted to closed-heart (off-pump) valve surgery, concluded that the effects of cardiac surgery on lymphocytes could be associated with CPB<sup>18</sup>. Other investigators have also studied the association between cardiac surgery and lymphocyte action, focusing on the possibility that a decrease in lymphocyte activity could increase the risk for infection<sup>19,20</sup>.



A study employing new flow cytometry techniques showed a significant decrease in lymphocyte activity, mainly B and cytotoxic T lymphocytes, after the beginning of CPB. In contrast, lymphopenia was observed 8 hours after the inactivation of heparin and was predominantly related to helper T lymphocytes. The authors considered that CPB was the main cause of the phenomena observed<sup>21</sup>.

More recently, a study including patients submitted to esophageal carcinoma surgery and cardiac surgery assessed the expression of CD69, an early activation marker<sup>22</sup>. The activation of lymphocytes in the trans- and postoperative period was significantly higher in helper than in cytotoxic T lymphocytes, with no difference between the two types of surgery. The authors concluded that the lymphopenia observed after the surgery was caused by a process related to the activation of helper T lymphocytes, probably apoptosis. However, until the present moment, no randomized studies have compared the activation of lymphocytes in patients submitted to coronary surgery with and without CPB.

The objectives of this study were: 1) to test the hypothesis that lymphocyte activation (and thus the inflammatory process) is less intense in off-pump than in on-pump CABG; 2) to assess the influence of CPB on myocardial damage through the study of cardiac enzymes (troponin I) and echocardiographic findings; 3) to study the behavior of lymphocyte activation markers during and after surgery.

## **PATIENTS AND METHODS**

### *Patients*

Twenty-eight consecutive patients with indication for myocardial revascularization surgery and clinical/anatomical characteristics that allowed surgery without CPB were randomly allocated to two groups: on-pump and off-pump CABG. All patients were assessed in terms of lymphocyte activation, troponin I release and echocardiographic measurements, and all were managed following the routine of the service. The study project was approved by the Research Ethics Committee at Santa Casa of Porto Alegre, and patients provided written informed consent prior to randomization.

Patients presenting one of the following characteristics were not included in the study: previous history of heart surgery; acute myocardial infarction 3 months before the study; need for concomitant cardiac procedure (valve replacement, correction of congenital defects, or other surgical procedures); renal failure, defined as serum creatinine above 2 mg%; immunodeficiency syndrome; chronic or perioperative corticotherapy; ejection fraction below 40% in the angiographic study of the left ventricle; active infection; unstable angina requiring intensive care; and class III or IV heart failure according to the classification of the New York Heart Association (NYHA).

After randomization, the patients were excluded from the study in the presence of any trans- or postoperative events that could interfere with the parameters under analysis, such as acute myocardial arrest, characterized by the appearance of new Q waves; decrease of over 25% in R wave amplitude in two or more contiguous leads; levels of creatinephosphate kinase isoenzyme MB (CPKMB)  $\geq 5\%$  of the CPK value for over 18 hours; shock, characterized by systolic pressure  $< 80$  mmHg, oliguria and signs of tissue

hypoperfusion (nonresponsive to volume infusion); and cardiac arrhythmia requiring electric cardioversion/defibrillation.

### *Anesthesia*

Patients received 0.02-0.04 mg/kg oral lorazepam in the night before surgery and 90 minutes before anesthesia induction. Anesthesia was induced with midazolam (50-100 µg/kg) and 1-2 mg/kg propofol. Muscle relaxation was achieved with pancuronium (0.008 mg/kg). Mechanical ventilation was carried out with a current volume of 10-12 ml/kg, a respiratory frequency of 10-12 mpm (subsequently altered according to blood gas samples), and fraction of inspired oxygen (FiO<sub>2</sub>) of 30%.

In patients operated with CPB, anesthesia was maintained by means of continuous infusion of midazolam (0.5-2 µg/kg .min) and fentanyl (0,04–0,16 µg/kg . min). Additional doses of midazolam (1-3 mg) and/or fentanyl (50-200 µg) were administered during skin incision, sternotomy, handling of the aorta or whenever anesthesia was suspected to have become superficial. After ECC was completed, lower doses of both drugs were used.

In the off-pump group, subarachnoid administration of preservative-free fentanyl (100 µg) and morphine (0.5 mg) was performed prior to anesthesia induction. Anesthesia was maintained with isoflurane (expiratory concentration of 0.5-1.5 vol%). Midazolam and fentanyl were administered as described for the on-pump group.

During surgery, systolic arterial pressure was kept as close as possible to 100-120 mmHg with the aid of continuous infusion of vasodilators (nitroglycerin and/or sodium nitroprussiate) or vasopressors (noradrenaline) associated with anesthetic adjustments as

described above. Heart rate was maintained between 60 and 80 bpm with betablockers (metoprolol) or with atrial stimulation by pacemakers, whenever possible.

To treat myocardial ischemia, determined by assessment of the ST segment, arrhythmia associated with coronary clamping or altered regional motility, the etiological factor (tachycardia, changes in arterial pressure, or procoagulation in patients with unstable preoperative angina) was eliminated, and nitroglycerin was administered.

In the event of decreased cardiac output, continuous dopamine infusion (2-5 µg/kg . min) was used, guided by the determinants of cardiac output (preload, peripheral or pulmonary vascular resistance, heart rate, rhythm and contractility). In the off-pump group, such alterations were assessed whenever the position of the heart was changed for exposure of the coronary vein to be revascularized.

In the group operated with CPB, 5 mg/kg heparin was administered every hour (1 mg/kg) for anticoagulation. The action of heparin was controlled through the activated clotting time, which was kept above 480 seconds. In the off-pump group, an initial dose of 1.5 mg/kg was used, in addition to continuous infusion of heparin at 1000 U/h. Reversion of heparin action was obtained with protamine at a mg/mg ratio.

Volume replacement was performed with saline solution at 0.9% to counterbalance the following losses: 1 ml/kg/h during preoperative fasting, insensible losses (2 ml/kg/h during surgery), translocation (2-4 ml/kg/h), diuresis (volume to volume), and blood loss (volume to volume). Blood losses resulting in hemodynamic instability and associated with circulating hemoglobin concentrations below 9 mg% or hematocrit concentrations below 28% were restored with administration of packed red blood cells. Glycemia was maintained between 100 and 200 mg/% through the administration of glucose at 5%, and, in diabetic

patients, through intravenous insulin infusion (5-10 IU). In both groups, patients were transferred to the intensive care unit after the surgery and kept on mechanical ventilation until they fulfilled the criteria for weaning and extubation.

### *Surgical technique*

**On-pump CABG.** All patients were submitted to median sternotomy. After dissection of the left internal thoracic artery and the greater vena saphena magna, aortic cannulation was performed and a two-stage cannula was introduced into the right atrium. The CPB technique was carried out with mild hypothermia (32 °C), with an MRX cq14 3000ml membrane oxygenator (Braile Biomédica, Brazil), a Sarns™ 8000 perfusion system with five roller pumps, 3M safety monitors, 3M arterial flow and cardioplegia monitors, a Sarns™ occluder and a Sechrist® mixer. Temperature was controlled with a thermometer through the nasopharynx. The CPB circuit volume was kept at 1,750 ml with Ringer-Lactate solution and addition of red blood cell concentrate so as to reach a final hematocrit volume of 30%. Arterial flow was maintained at 2.5 l/m<sup>2</sup> and, at the moment off the cardioplegia the Braile Biomedica system was used, with an induction dose and maintenance doses every 10 minutes. Distal anastomoses were initially performed with 7-0 prolene continuous suture, and proximal anastomoses, with 6-0 prolene suture. Crystalloids were administered at 7 ml/kg . hour. Anticoagulation was reverted after CPB completion and after cannula removal with protamine sulfate at a dose of 1:1 for each mg of heparin. The need for blood transfusion was regulated by hemodynamic data and by hematocrit and hemoglobin measurements. Patients were transferred to the intensive care unit with mean

arterial pressure between 60 and 70 mmHg, receiving volume or vasoactive agents as needed.

**Off-pump CABG.** After sternum opening and dissection of the left internal thoracic artery and greater vena saphena magna, a CTS Off-Pump Coronary Artery Bypass System (OPCAB)<sup>™</sup> spacer/stabilizer was used. Following the administration of heparin, a Lima stitch was made in the posterior pericardium, and a 2-cm stitch was used to build a tripod on which the heart could be rotated. Pacemaker wires were implanted in the right ventricle. First, anastomosis of the left internal thoracic artery was performed on the anterior descending artery. Once the grafting site was selected, 4-0 prolene suture with felt was passed through the tourniquet around the artery at a proximal point. After the stabilizer was placed, the artery was incised, and a CTS<sup>®</sup> shunt of appropriate diameter was introduced into the lumen of the vessel. The proximal point was released, and intraluminal blood flow was reestablished; then, anastomosis was started with 7-0 prolene continuous suture. Before the last stitch, the internal shunt was withdrawn, eliminating all the air, and the suture was completed. Afterwards, the saphenous vein was implanted in the aorta or in the internal thoracic artery and anastomoses were performed, as described above. A CO<sub>2</sub> ventilator was used in order to obtain a bloodless field. All bypasses were tested with a Doppler flowmeter, and whenever the flow was not satisfactory, new anastomoses were made. The blood aspirated from the field was stored in a Transfusam<sup>®</sup> collector and reinfused afterwards.

### *Blood dosages*

Blood samples were collected from the arterial cannula as follows: *On-Pump Group*: Time 1 (T1), right after anesthesia induction; T2, on aortic declamping; T3, 6 hours after declamping; T4, 24 hours after declamping. *Off-Pump Group*: T1, right after anesthesia induction; T2, at the end of coronary anastomoses; T3, 6 hours after anastomosis completion; T4, 24 hours after anastomosis completion.

The blood samples were collected and stored in Vacutainer tubes (Becton Dickinson UK Ltd., Plymouth, England) without anticoagulant agents, and immediately centrifuged. Sera were stored at -20 °C for posterior biochemical analysis of troponin I levels. The sample set aside for assessment of lymphocyte activity was collected and maintained at room temperature in Vacutainer tubes containing tripotassium ethylene-diaminetetraacetic acid (K<sub>3</sub>EDTA) until processing (24 hours later at the most). Troponin dosages were carried out using the chemiluminescence method in Immulite devices (DPC - Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, USA)<sup>23,24</sup>. CK and CK-MB dosages were performed with the automated kinetic method using an Integra 700 device (Roche Diagnostic Systems, Besel, Switzerland)<sup>25</sup>. Total peripheral arterial blood samples were tested with monoclonal antibodies. The direct immunofluorescence technique was used to assess FITC, PE, PerCP and other fluorochrome conjugates, in a panel with the following surface markers: CD3, CD19, CD25, CD26, CD69, and HLADR. Samples were incubated with fluorescent antibodies, lysed (FACS Lysing Solution), washed and suspended in 0.1% paraformaldehyde for posterior analysis in a flow cytometer (BD FACSCalibur, San Jose, USA). Data were analyzed with the Cell Quest software.

### *Echocardiography*

Uni-bidimensional color Doppler echocardiograms were performed 2 weeks before and after the procedure, prior to hospital discharge. A Hewlett Packard device (model Sonus 5500) was used, and the usual techniques were followed. Heart dimensions and the performance of the left ventricle were assessed, following to the recommendations of the American Society of Echocardiography<sup>26,27</sup>.

### *Statistical analysis*

Continuous variables with normal distribution are presented as means  $\pm$  standard deviation, and nonparametric data are presented as medians  $\pm$  standard error. Categorical variables were analyzed with the chi-square test or Fisher's exact test, as appropriate. For continuous variables, we employed the t test, two-way variance analysis for repeated measures, Friedman's test and variance analysis for repeated measures. Significance was set at  $p < 0.05$ . The Statistical Package for the Social Sciences, Version 8.0 (SPSS Inc., USA) was used for data analysis.



## RESULTS

Table 1 presents the characteristics of the two groups after randomization. The groups were similar in terms of age, sex, skin color, previous disease and comorbidities. Mean surgery duration was lower in on-pump procedures than in off-pump procedures, but there was no difference between the two groups in the number of grafts implanted.

Table 1

The maximum CPK and CPK-MB concentration in the immediate postoperative period was not different in the groups operated with and without CPB (Table 1). No increase in troponin levels was detected in transoperative blood samples from either group (Table 2). A postoperative increase in troponin concentration was observed; this increase was higher in the on-pump than in the off-pump group, but the difference was not statistically significant.

Table 2

Pre and postoperative echocardiographic measurements are presented in Table 3. In the on-pump group, systolic and diastolic volume decreases were observed postoperatively. Other pre and postoperative measurements were not significantly different: the group submitted to off-pump surgery presented a decrease in diastolic volume and ejection fraction after surgery and a nonsignificant increase in systolic volume. Systolic/diastolic diameters did not show differences before and after the procedure.

### Table 3

The assessment of T lymphocytes (CD3+) revealed similar results for both groups. Similarly, there was no difference in the expression of lymphocyte activity markers CD25 (p=0.41), CD26 (p=0.50), CD69 (p=0.312), and DR (p=0.56) in T lymphocytes (CD3+) (Table 4).

### Table 4

The percentage of B lymphocytes (CD19+) and lymphocyte activation markers CD25, CD26, CD69 and DR in B lymphocytes (CD19+) (Table 5) was similar in the two groups during the study period.

### Table 5

Since there was no difference in lymphocyte activation between the groups operated with or without CPB, the two groups were combined for analysis of the response of markers to surgical trauma (Tables 6 and 7).

### Table 6

### Table 7

The expression of different lymphocyte activation markers in T lymphocytes (CD3+) and B lymphocytes (CD19+) had distinct behaviors. In T lymphocytes (CD3+), there was evidence of early lymphocyte activation, with an increased percentage of CD69 activation right after anesthesia induction; values continued to increase until the completion of coronary anastomoses (3rd hour). From then on, the percentage of lymphocyte activation markers in CD3+ cells tended to stabilize, reaching levels similar to those measured before the surgery (27th hour) ( $p < 0.001$ ). The CD25 curve was similar to the CD69 curve, although the increase in CD 25 levels started later. An increase was observed starting at the 9th hour (6 hours after completion of coronary anastomoses), with the last measurement presenting the highest value ( $p = 0.027$ ). The levels of the CD26 activation marker decreased in the beginning of the procedure. The lowest CD26 values, about 20% lower than initial values, were observed 6 hours after coronary anastomoses were completed (9th hour). From that moment on, the expression of CD26 tended to return to levels that were similar to those found in the preoperative measurement (27th hour) ( $p < 0.001$ ). Percentages related to the DR marker presented a slight decrease, which was more pronounced 6 hours after the end of anastomoses (9th hour), and then returned to initial values ( $p = 0.91$ ) (Table 4 and Figure 1).

#### Figure 1

In B lymphocytes (CD19+), the expression of CD69 increased starting at the completion of coronary anastomoses (3rd hour), reached its peak 6 hours later (9th hour), and returned to values similar to those obtained in the first measurement, during anesthesia

induction (27th hour) ( $p < 0.001$ ). The CD25 marker, after a decrease at the end of coronary anastomoses (3rd hour), had a significant increase in the 9th hour, and a new decrease in the last measurement (27th hour). However, the levels of CD25 in B lymphocytes did not return to initial values ( $p = 0.003$ ). The expression of CD26 did not follow the relative increase observed in B lymphocytes. Rather, there was a gradual and inexpressive decrease, which started 6 hours after the end of anastomoses (9th hour) and continued until the last measurement (27th hour) ( $p = 0.94$ ). The DR curve was similar to that of CD19, with no alterations in expression in B lymphocytes throughout the study period ( $p < 0.001$ ) (Table 5 and Figure 2).

Figure 2

## COMMENT

Off-Pump CABG has been considered as an alternative to decrease morbidity, mortality and cost<sup>3-11,28-31</sup>. When evaluating new techniques, in addition to collecting clinical evidence, it is also important to clarify pathophysiologic aspects associated with the procedure.

In myocardial revascularization surgery, there is an increase in the release of cytokines and in the expression of cellular adhesion molecules, both in leukocytes and in the endothelium<sup>32-48</sup>; the activity of soluble mediators and the contact with adhesion molecules may lead to the activation of lymphocytes<sup>49</sup>.

The increase in cytokine levels and in the expression of adhesion molecules is associated with surgical trauma and CPB<sup>33,34</sup>. A decrease in the activity of these factors has been demonstrated in patients submitted to surgery without CPB in comparison to patients submitted to the conventional procedure<sup>16,50-54</sup>, however with no evidence of clinical implications<sup>16</sup>. Still, no study so far has focused on lymphocyte activation in patients submitted to myocardial revascularization surgery with and without CPB.

### *Myocardial necrosis markers*

In patients submitted to the conventional technique with CPB, an inverse association between the level of troponins and the ejection fraction has been observed echocardiographically in the postoperative period<sup>48</sup>. A retrospective study on the enzymatic behavior of patients submitted to myocardial revascularization surgery did not find a significant difference in the levels of CK-MB or troponin I between patients operated with CPB (n=181) and without CPB (n=122)<sup>55</sup>. In the study by Leal et al.<sup>56</sup>, patients submitted

to on-pump surgery had significantly higher levels of troponin when compared to those submitted to off-pump procedure. However, in on-pump patients, enzymatic values did not correlate with duration of ischemia or duration of CPB, which suggests that the greater increase observed in the CPB group resulted from the myocardial damage caused by technical differences in the surgical procedures, and not by CPB itself.

In another study<sup>16</sup>, the levels of troponin I in patients operated without CPB were lower than in patients operated with CPB, and a correlation between troponin values 24 hours after surgery and IL-8 levels was observed. This suggests that the degree of myocardial damage may be related to the intensity of the inflammatory process caused by surgery. Czerny et al.<sup>14</sup> also found a more pronounced increase of troponin I, CK-MB and myoglobins in patients operated with CPB in relation to those operated without CPB. In that study, which did not include IL-8, there was no significant difference in terms of inflammatory markers between the two surgery groups. Based on those findings, the authors suggested that myocardial damage would be less intense in off-pump surgeries, mainly because patients are submitted to transitory regional ischemia, rather than to prolonged global ischemia, as occurs in CPB. Thus, the alterations resulting from the inflammatory process would be less important<sup>14</sup>.

In our patients, an increased in the median value for troponin I was observed in all postoperative measurements. Although values were higher in the group operated with CPB, the difference was not significant. In our opinion, the different results found by different authors are due to the several mechanisms that interact to raise enzyme levels in patients submitted to myocardial revascularization, such as the surgical technique, CPB, and the individual characteristics of patients.

### *Ventricular function assessment*

In terms of ventricular assessment, the changes observed in both size and function during myocardial revascularization procedures may be associated with the patient's previous status, with several factors that interact during the procedure and with the result obtained in terms of myocardial reperfusion. Echocardiography is extremely useful in the follow-up of myocardial alterations during and after surgery<sup>57</sup>. Systolic and diastolic function parameters are moderately compromised during surgery without CPB due to the positioning of the heart and the interruption of coronary flow. These alterations are more marked when the circumflex artery needs to be manipulated, but they disappear after the procedure<sup>58</sup>. In patients operated without CPB, with a very low ejection fraction (>30%), a significant increase in myocardial contractility has been observed in evaluations carried out 1 month and 1 year after the surgical procedure<sup>59</sup>.

In on-pump patients, there was a statistically significant decrease in systolic and diastolic volumes in the left ventricle, without alterations in the ejection fraction; however, the clinical significance of the decrease is questionable. In the group operated without CPB, a decrease was observed in diastolic volume only, with no significant alterations in systolic volume; this translated into a decrease of approximately 10% in the ejection fraction in relation to preoperative values. Since our patients were assessed rather early, before hospital discharge, these alterations may still have been the result of hemodynamic changes secondary to the manipulation of the heart which takes place during off-pump procedures. On the other hand, we would not expect an impressive improvement in ventricular function,

since patients with highly compromised ventricular function (who would benefit the most from the effects of surgery on myocardial ischemia) were excluded.

#### *Comparison of activation markers in off-pump and on-pump CABG*

In our group of patients, the expression of CD25, CD26, CD69 and DR in T lymphocytes (CD3+) and B lymphocytes (CD19+) was assessed by two measurements during surgery and by two measurements performed up to 24 hours postoperatively. When patients operated with and without CPB were compared, no difference was found between the expression of different markers. This result is similar to that obtained in the comparison of eight patients submitted to esophageal surgery with patients submitted to cardiac surgery (four myocardial revascularization surgeries and two valve surgeries), which did not show differences between the groups concerning early lymphocyte activation, assessed by measuring the expression of CD69<sup>22</sup>. There was also no difference between patients operated with or without CPB on lymphocyte subpopulations studied postoperatively<sup>60</sup>. We conclude that the effect on lymphocyte activation is mainly a result of surgical trauma.

#### *Behavior of activation markers during and after surgery*

The assessment of lymphocyte activation markers in our 28 patients revealed an early increase in the expression of CD69 in T lymphocytes (CD3+) and B lymphocytes (CD19+). The expression curves for CD25 also showed elevation (similarly to CD69). However, the increase, peak and decrease in CD25 levels occurred later than for CD69, suggesting a mechanism of successive lymphocyte activation. The levels of CD26 decreased progressively in T and B lymphocytes. This was observed until the 1st postoperative day in



B lymphocytes, but T lymphocyte values presented a partial return to initial values in the measurement carried out 24 hours after coronary anastomoses. There were no changes in DR levels in T lymphocytes. The behavior of the DR curve was similar to that of the B lymphocyte curve.

Initially, studies focusing on the behavior of lymphocytes following surgical procedures showed absent or decreased lymphocyte activity after major surgeries. This apparent decrease in immune function is at the same time positive, since it could prevent exaggerated reactions during surgery, and negative, since it may also increase the risk for infection<sup>61</sup>.

Misoph et al.<sup>21</sup> studied 27 patients submitted to myocardial revascularization and found an increase in lymphocytes at the beginning of surgery, with a posterior decrease. Minimal lymphocyte values were achieved 8 hours after the inactivation of heparin by protamine. From that moment on, a gradual increase was observed until 24 hours after the procedure. Helper T lymphocytes showed minimal values 8 hours after protamine administration, followed by a progressive elevation; cytotoxic T lymphocytes presented an initial elevation, followed by a decrease that was still observed in the last measurement; and B lymphocytes presented an initial decrease followed by increase. In relation to lymphocyte activation markers, no change was observed by Misoph et al. in CD25 and CD69 expression. The HLA-DR marker reached its peak in cytotoxic T lymphocytes 8 hours after the administration of protamine, exactly when these lymphocytes reached their minimal value. According to those authors, lymphopenia, recorded for an extremely short period, in addition to the different alterations found in lymphocyte subpopulations suggest the

occurrence of an extremely fast immune reaction rather than the presence of a process of immune suppression, as previously proposed<sup>21</sup>.

Differently from Misoph et al., Shimaoka et al.<sup>22</sup> found an increase in the expression of CD69, an early lymphocyte activation marker. Shimaoka et al. studied a population of patients submitted to esophageal and cardiac surgeries. According to those authors, the early activation of lymphocytes could lead to anergy and apoptosis and these phenomena would account for the decreased activity and number of lymphocytes observed in late evaluations<sup>22</sup>.

Franke et al., who evaluated the inflammatory response to myocardial revascularization from the preoperative period until the 5<sup>th</sup> postoperative day<sup>61</sup>, describe a biphasic inflammatory response: the first phase would be characterized by the presence of pro- and anti-inflammatory factors associated with the innate immune system, which would be normalized by the 3rd postoperative day. The second phase (5th postoperative day) would correspond to the onset of an adaptive immune system response. This response would be dependent on lymphocyte activity and characterized by an anti-inflammatory-type reaction. This would explain why the systemic inflammatory response occurs immediately after surgery, while infectious complications appear later<sup>62</sup>.

In our study, the increased expression of CD69 and CD25 is compatible with a sequential lymphocyte activation mechanism. This observation, in addition to the different behaviors showed by other markers, reinforces the hypothesis that surgical trauma results in extremely fast lymphocyte activation, with specific immunological purposes – which could be, as suggested<sup>23</sup>, apoptosis and anergy.

### ***New theories on the systemic inflammatory response syndrome***

Several authors have sought to understand the complex and multifactorial system involved in the pathophysiology of systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and its severe consequences, namely multiple organ failure. Apoptosis regulation seems to be a homeostatic process mediated by intracellular factors; the activation of apoptosis caused by specific intracellular signaling events could lead to multiple organ failure due to the exaggerated inflammatory response observed in SIRS<sup>63</sup>.

Originally, the organism was thought to respond to any agent – infection, hemorrhage or trauma – by triggering an increased inflammatory response. The result would be severe sepsis leading to shock, multiple organ failure, and death. Little was known about the ability of the human body to reduce the activity of this inflammatory cascade. In addition, the results of experiments with different forms of treatment aimed at attenuating the effects of anti-inflammatory mediators were disappointing.

Nowadays, the body is believed to initiate an anti-inflammatory response simultaneously to the activation of pro-inflammatory mechanisms, and several agents associated with this anti-inflammatory response have already been identified (e.g. IL-4, IL-10, IL-11, and IL-13)<sup>64,65</sup>. These mediators also inhibit the activity of T and B lymphocytes, and may result in immune suppression. If the anti-inflammatory response is sufficiently strong, then it will manifest itself by means of immunological anergy and increased susceptibility to infection – known as compensatory anti-inflammatory response syndrome (CARS).

The response of the body to external agents should be seen as an interaction between pro- and anti-inflammatory mediators. Thus, if the antagonistic factors present similar

intensity and the causal agent is eliminated, homeostasis can be restored. However, when balance is not established, a severe reaction – either inflammatory or anti-inflammatory – occurs. With predominance of SIRS; severe cardiovascular manifestations, including shock and apoptosis, will be observed. On the other hand, if CARS predominates, then immunologic anergy and an increased risk for infection will be present<sup>64</sup>.

Although the proposition of a dual inflammatory response system is more satisfactory than an exclusive modulation by a pro-inflammatory system, new questions are raised. Considering that systemic inflammatory response and multiple organ failure are extremely complex processes (in which several organs, tissues and chemical agents interact in the presence of multidirectional mechanisms), there is a need for new models that comprise all this complexity. A new understanding of these complex systems has been sought by a variety of investigators in the fields of geological, biological, psychological and behavioral sciences. In mathematics, the area that investigates complex systems is called nonlinear dynamics. Complex nonlinear systems can be defined as the combination of a great and variable number of components, where each individual component presents great variability in time. In addition, these systems are characterized by a high degree of interconnectivity or interdependency between variables. Complex nonlinear systems present an extremely important property: they are capable of establishing stability and order in the world that surrounds us. This fundamental property of integrating multiple parts and their complex inter-relations, forming a stable set with defined properties, is called emergent order<sup>66</sup>.

Godin et al. suggest that the several factors contributing towards the onset of SIRS should be studied as a complex nonlinear system. In this context, they state that the

progression of SIRS to multiple organ failure occurs when the organs themselves or the inter-relations between system components suffer irreversible damage. They underscore that the unexpected – and even undesirable – effects of anticytokine therapies for treatment of sepsis may be merely reflecting nonlinearity in human physiology, or, more specifically, in the pathophysiology of sepsis and multiple organ failure<sup>67</sup>.

It is fair to assume that these concepts of balance between pro- and anti-inflammatory mechanisms co-existing in a complex system can be applied to cardiac surgery. Based on such theoretical principles, it is possible to infer the existence of lymphocyte activation processes that induce apoptosis and immunological energy in order to counterbalance the intense activity of pro-inflammatory mechanisms associated with surgical trauma, maintaining the necessary balance to ensure homeostatic stability.

## CONCLUSIONS

1. Lymphocyte activation in myocardial revascularization surgery is primarily associated with surgical trauma and not with CPB *per se*.

2. Myocardial revascularization surgery causes the early activation of lymphocytes, as evidenced by the increased expression of lymphocyte activation markers. The expression curves of several markers suggest an integrated action with specific immunological aims.

3. There was an increase in troponins in operated patients with no difference between on-pump and off-pump groups.

4. Our study showed that, on the first postoperative days, off-pump surgery patients had a slight worsening in myocardial contractility, detected through echocardiographic assessment of ejection fraction; this worsening did not occur in on-pump surgery.

## REFERENCES

1. Favaloro RG. Saphenous vein autograph replacement of severe segmental coronary artery occlusion. *Ann Thorac Surg* 1968;33:5-11.
2. Benetti FJ, Naselli G, Wood M, Geffner L. Direct myocardial revascularization without extracorporeal circulation. *Chest* 1991;100:312-5.
3. 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.
4. Buffolo E, Summo H, Aguiar LF, Teles CA, Branco JN. Myocardial revascularization in patients 70 years of age and older without the use of extracorporeal circulation. *Am J Geriatr Cardiol* 1997;61:7-15.
5. Malheiros SM, Brucki SM, Buffolo E, et al. Neurological outcome in coronary artery surgery with and without cardiopulmonary bypass. *Acta Neurol Scand* 1995;92:256-60.
6. Malheiros SM, Massaro AR, Buffolo E. Neurologic complications in coronary surgery without coronary bypass. *Ann Thorac Surg* 2000;69:1992-3.
7. Supramanian VA, McCabe JC, Geller CM. Minimally invasive direct coronary artery bypass grafting: two-year clinical experience. *Ann Thorac Surg* 1997;64:1648-55.
8. Spooner TH, Dyrud PE, Monson BK, Dixon GE, Robinson LD. Coronary artery bypass on the beating heart with the Octopus: a North American experience. *Ann Thorac Surg* 1998;66:1032-5.

9. Ascione R, Lloyd CT, Gomes WJ, Caputo M, Bryan AJ, Angelini GD. Beating versus arrested heart revascularization: evaluation of myocardial function in a prospective randomized study. *Eur J Cardiothorac Surg* 1999;15:685-90.
10. Arom KW, Flavin TF, Emery RW, Kshetry VR, Janey PA, Petersen RJ. Safety and efficacy of off-pump coronary artery bypass grafting. *Ann Thorac Surg* 2000;69:704-10.
11. Ankeney JL. To use or not to use the pump oxygenator in coronary bypass operations. *Ann Thorac Surg* 1975;19:108-9.
12. Angelini GD, Taylor FC, Reeves BC, Ascione R. Early and midterm outcome after off-pump and on-pump surgery in Beating Heart Against Cardioplegic Arrest Studies (BHCAS 1 and 2): a pooled analysis of two randomized controlled trials. *Lancet* 2002;359:1194-9.
13. Ascione R, Lloyd CT, Underwood MJ, Lotto AA, Pitsis AA, Angelini GD. Economic outcome of off-pump coronary artery bypass surgery: a prospective randomized study. *Ann Thorac Surg* 1999;68:2237-42.
14. 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 Cardiothorac Surg* 2000;17:737-42.
15. Menasche 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:S2260-5.



16. Wan S, Izzat B, 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.
17. Parslow TG. Lymphocytes and lymphoid tissues. In Parslow TG, Stites DP, Terr AI, Imboden JB. *Medical Immunology*. 10th ed. New York: Lange Medical Books/McGraw-Hill, 2001:40-60.
18. Petri I, Kaiser G, Gaál T, Kovács G, Petri G. Cellular immune functions after heart operations. *Acta Chirur Acad Sci Hung* 1981;22:29-36.
19. Velzen-Blad H, Dijkstra YJ, Heijnen CJ, Schurinck GA, Zegers BJM, Ballieux RE. Cardiopulmonary bypass and host defense functions in human beings: lymphocyte function. *Ann Thorac Surg* 1985;39:212-7.
20. De Angeli S, Paccagnella A, Mordacchini M, et al. The effects of prolonged cardiopulmonary bypass on cell-mediated immunity. *Thorac Cardiovasc Surg* 1994;42:14-20.
21. Misoph M, Babin Ebell J, Schwender S, Grossmann R, Keller F, Elert O. Response of the cellular immune system to cardiopulmonary bypass in vivo. *Thorac Cardiovasc Surg* 1997;45:217-23.
22. Shimaoka M, Hosotsubo K, Sugimoto M, et al. The influence of surgical stress on T cells: enhancement of early phase lymphocyte activation. *Anesth Analg* 1998;87:1431-5.
23. Laqvoine A, Canliez B, Eltchaninoff H, Koning R, Cribier A. Analytical and clinical performance of the Immulite cardiac troponin I assay. *Clin Chem* 2000;46:1989-90.

24. Whitterspoon LR, Babson AL, Olson DR. Immulite chemiluminescent immunoassay system. In Chan DW, ed. Imunoassay automative. San Diego: San Diego Academic Press, 1996:103-30.
25. Horder M, Elser RC, Gerhardt W, Mathieu M, Sampson EJ. IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 7. IFCC method for creatinine kinase (ATP: creatinine N-phosphotransferase, EC 2.7.3.2). J Int Fed Clin Chem 1989;1:130-9.
26. Sahn DJ, DeMaria A, Kissio A. Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. Circulation 1978;58:1072-86.
27. Schiller NB, Shah PM, Crawford M, et al. Recommendations for quantitation of the left ventricle by two-dimensional echocardiography. American Society of Echocardiography Committee on Standards, subcommittee on Quantitation of Two-Dimensional Echocardiograms. J Am Soc Echocardiog 1989;2:358-67.
28. Borst C, Jansen EW, Gründeman PF. Less invasive coronary artery bypass grafting: without cardiopulmonary bypass and reduced surgical access. Heart 1997;77:302-3.
29. Cleveland JC, Shroyer LW, Chen AY, Peterson E, Grover, FL. Off-pump coronary artery bypass grafting decreases risk-adjusted mortality and morbidity. Ann Thorac Surg 2001;72:1282-9.
30. Lima RC, Escobar MAS, Salerno T, et al. Avaliação hemodinâmica intra-operatória na cirurgia de revascularização miocárdica sem auxílio de circulação extracorpórea. Rev Bras Cir Cardiovasc 2000;15:201-11.

31. Brasil A, Mariano JB, Santos FM, et al. Revascularização do miocárdio sem circulação extracorpórea: experiência e resultados iniciais. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 2000;15:6-15.
32. Hall RI, Smith MS, Rocker G. The systemic inflammatory response to cardiopulmonary bypass: pathophysiological, therapeutic, and pharmacological considerations. *Anesth Analg* 1997;85:766-82.
33. Savaris N. Resposta imunoinflamatória à circulação extracorpórea: estado atual. *Rev Bras Anesthesiol* 1998;48:126-36.
34. Butler J, Rocker GM, Westaby S. Inflammatory response to cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1993;55:552-9.
35. Menaché P. The inflammatory response to cardiopulmonary bypass and its impact postoperative myocardial function. *Curr Opinion Cardiol* 1995;10:597-604.
36. Royston D. The inflammatory response and extracorporeal circulation. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 1997;11:341-54.
37. Miller BE, Levy JH. The inflammatory response to cardiopulmonary bypass. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 1997;11:355-66.
38. 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.
39. Hill GE, Whitten CW. The role of the vascular endothelium in inflammatory syndromes, atherogenesis and propagation of disease. *J Cardiothorac Anesth* 1997;11:316-21.

40. 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 Anesth* 1993;40:1016-21.
41. Menaché P, Haydar S, Peynet J, et al. A potential mechanism of vasodilatation after warm heart surgery. The temperature-dependent release of cytokines. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1994;107:293-9.
42. Haeffner-Cavaillon N, Rousselier N, Ponzio O, et al. Induction of interleukin-1 production in patients undergoing cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1989;98:1110-6.
43. Frering B, Philip I, Dehoux M, Rodland C, Langlois JM, Desmonts JM. Circulating cytokines in patients undergoing normothermic cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1994;108:636-41.
44. Kharazami A, Andersen LW, Back L, Valerius NH, Laub M, Rasmussen JP. Endotoxemia and enhanced generation of oxygen radicals by neutrophils from patients undergoing cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1989;98:381-5.
45. Nilson L, Kulander L, Nystrom SO, Eriksson. Endotoxin in cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1990;770-80.
46. Rocke DA, Gaffin SL, Wells MT, Koen Y, Brock-Utine JG. Endotoxemia associated with cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1987;93:832-7.
47. Ohri SK, Becket J, Brannan J, Keogh BE, Taylor KM. Effects of cardiopulmonary bypass on gut blood flow, oxygen utilization, and intramucosal pH. *Ann Thorac Surg* 1994;57:1193-9.

48. 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.
49. Markewitz A, Lante W, Franke A, Marohl 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.
50. Strüber M, Cremer JT, Gohrbandt B, et al. Human cytokine responses to coronary artery bypass grafting with and without cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1999;68:1330-5.
51. 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.
52. Matata BM, Sosnowski AW, Galiñanes M. Off-pump bypass graft operation significantly reduces oxidative stress and inflammation. *Ann Thorac Surg* 2000;69:785-91.
53. 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;69:1198-204.
54. Schulze C, Conrad N, Schutz A, et al. Reduced expression of systemic proinflammatory cytokines after off-pump versus conventional coronary artery bypass grafting. *Thorac Cardiovasc Surg* 2000;48:364-9.

55. Soltoski PR, D'Ancona G, Salerno TA, et al. Enzimas miocárdicas na cirurgia de revascularização sem circulação extracorpórea. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 2000;15:105-8.
56. Leal JCF, Braile DM, Godoy MF, et al. Avaliação imediata da troponina I cardíaca em pacientes submetidos à revascularização do miocárdio. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 1999;14:247-53.
57. Al-Tabbaa A, Gonzalez RM, Lee D. The role of state-of-the-art echocardiography in the assessment of myocardial injury during and following cardiac surgery. *Ann Thorac Surg* 2001;72:S2214-9.
58. Biswas S, Clements F, Diodato L, Hughes GC, Landolfo K. Changes in systolic and diastolic function during multivessel off-pump coronary bypass grafting. *Eur J Cardiothorac Surg* 2001;20:913-7.
59. Eryilmaz S, Corapcioglu T, Eren NT, Yazicioglu L, Kaya K, Akalin H. Off-pump coronary bypass surgery in the left ventricular dysfunction. *Eur J Cardiothorac Surg* 2002;21:36-40.
60. Diegeler A, Tárnok A, Rauch Th, et al Changes of leukocyte subsets in coronary artery bypass surgery: Cardiopulmonary bypass versus "off-pump" techniques. *Thorac Cardiovasc Surg* 1998;46:327-32.
61. Brody JI, Pickering NJ, Fink GB, Behr ED. Altered lymphocyte subsets during cardiopulmonary bypass. *Am J Clin Pathol* 1987;87:626-8.
62. Frank A, Lante W, Fackeldey V et al. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines after cardiac operations: different cellular sources at different times. *Ann Thorac Surg* 2002;74:363-71.

63. Papathanassoglou EDE, Moynihan JA, Ackerman MH. Does programmed cell death (apoptosis) play a role in the development of multiple organ dysfunction in critically ill patients? A review and a theoretical framework. *Crit Care Med* 2000;28:537-49.
64. Bone RC. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Crit Care Med* 1966;24:1125-8.
65. Kox WJ, Volk T, Kox SN, Volk HD. Immunomodulatory therapies in sepsis. *Int Care Med* 2000;26:S214-28.
66. Seely AJE, Christou NV. Multiple organ dysfunction syndrome: Exploring the paradigm of complex nonlinear systems. *Crit Care Med* 2000;28:2193-200.
67. Godin Paul J, Buchman TG. Uncoupling of biological oscillators: A complementary hypothesis concerning multiple organ dysfunction syndrome. *Crit Care Med* 1996;24:1107-16.

**Table 1.** Clinical characteristics and surgical data after randomization.

<b>Variable</b>	<b>On-Pump</b>	<b>Off-Pump</b>	<b>p</b>
n	15	13	
Age - mean $\pm$ SD	61 $\pm$ 10.2	63 $\pm$ 7.3	0.61
Males - n (%)	8 (53.3)	10 (76.9)	0.37
White - n (%)	14 (93.3)	12 (92.3)	1
Previous infarction - n (%)	7 (46.7)	8 (61.5)	0.68
Class I-II heart failure - n (%)	0 (0.0)	2 (15.4)	0.21
Hypertension - n (%)	10 (66.7)	10 (76.9)	0.86
Chronic obstructive pulmonary disease - n (%)	2 (13.3)	3 (23.1)	0.86
Diabetes mellitus - n (%)	2 (13.3)	1 (7.7)	1
Peptic disease - n (%)	1 (6.7)	2 (15.4)	0.9
Peripheral arterial disease - n (%)	2 (13.3)	2 (15.4)	1
Duration of surgery (min) - mean $\pm$ SD	268 $\pm$ 46	312 $\pm$ 43	0.02
Peak CPK (U/L) - mean $\pm$ SD	302 $\pm$ 174	390 $\pm$ 300	0.34
Peak CPK-MB (U/L) - mean $\pm$ SD	15 $\pm$ 6	18 $\pm$ 10	0.53
No of revascularized vessels - mean $\pm$ SD	2.7 $\pm$ 1.0	2.6 $\pm$ 0.5	0.78



**Table 2.** Troponin variation during and after surgery (ng/mL).

<b>Samples</b>	<b>On-Pump</b>		<b>Off-Pump</b>		<b>p</b>
	<b>Median</b>	<b>SE</b>	<b>Median</b>	<b>SE</b>	
Anesthesia induction	0	0.05	0	0	0.35
Anastomosis completion	0	0.1	0	0.07	0.44
6 hours after anastomoses	2.2	1.26	0.87	0.53	0.08
24 hours after anastomoses	1.1	3.12	1	1.29	0.73
p	<0.001		<0.001		

**Table 3.** Echocardiographic measurements before and after surgery.

Measurements	On-Pump			Off-Pump		
	Preoperative (mean ± SD)	Postoperative (mean ± SD)	p	Preoperative (mean ± SD)	Postoperative (mean ± SD)	p
Diastolic diameter (mm)	49 ± 5	49 ± 6	0.11	51 ± 5	49 ± 7	0.18
Systolic diameter (mm)	31 ± 6	32 ± 7	0.15	31 ± 4	34 ± 6	0.09
Diastolic volume (mL)	87 ± 30	79 ± 36	0.01	112 ± 33	96 ± 36	0.01
Final systolic volume (mL)	33 ± 17	32 ± 18	0.01	44 ± 27	56 ± 36	0.27
Ejection fraction (%)	64 ± 9	65 ± 9	0.77	63 ± 12	56 ± 11	0.01

**Table 4.** T lymphocyte activation markers according to type of surgery (%).

<b>Markers (mean ± SD)</b>	<b>Type of surgery</b>	<b>of Anesthesia induction</b>	<b>Anastomoses completion</b>	<b>6 hours after anastomoses</b>	<b>24 hours after anastomoses</b>	<b>P</b>
<b>CD3</b>	On-Pump	70.4 ± 7.2	64.9 ± 7.9	50.6 ± 11.8	61.37 ± 9.1	0.65
	Off-Pump	72.2 ± 8.1	69.7 ± 9.4	51.2 ± 10.8	62.7 ± 8.3	
<b>CD25</b>	On-Pump	5.8 ± 3.5	4.9 ± 2.8	6.1 ± 3.7	8.9 ± 5.1	0.31
	Off-Pump	7.9 ± 6.4	7.6 ± 4.9	6.4 ± 3.3	8.4 ± 5.0	
<b>CD26</b>	On-Pump	30.7 ± 10.9	26.6 ± 11.9	18.4 ± 8.6	26.9 ± 9.3	0.96
	Off-Pump	28.6 ± 14.1	25.4 ± 10.3	17.5 ± 8.0	24.2 ± 10.7	
<b>CD69</b>	On-Pump	7.6 ± 5.6	13.2 ± 11.0	10.7 ± 5.9	6.6 ± 3.0	0.79
	Off-Pump	4.6 ± 4.0	10.2 ± 8.3	9.8 ± 4.5	5.2 ± 2.2	
<b>DR</b>	On-Pump	4.9 ± 2.2	4.9 ± 2.3	5.8 ± 4.1	4.4 ± 1.9	0.14
	Off-Pump	7.0 ± 5.43	5.9 ± 3.6	5.5 ± 4.3	6,3 ± 4,4	

**Table 5.** B lymphocyte activation markers according to type of surgery (%).

<b>Markers (mean ± SD)</b>	<b>Type of surgery</b>	<b>of Anesthesia induction</b>	<b>Anastomoses 6 completion</b>	<b>hours anastomoses</b>	<b>after anastomoses</b>	<b>after P</b>
<b>CD19</b>	On-Pump	12.0 ± 5.0	8.7 ± 4.5	12.7 ± 4.7	19.3 ± 7.2	0.19
	Off-Pump	10.5 ± 2.7	9.1 ± 3.8	14.5 ± 10.6	16.3 ± 8.7	
<b>CD25</b>	On-Pump	0.5 ± 0.7	0.6 ± 0.9	1.0 ± 0.8	0.9 ± 0.9	0.96
	Off-Pump	0.5 ± 0.6	0.4 ± 0.3	1.1 ± 0.9	1.0 ± 1.3	
<b>CD26</b>	On-Pump	1.9 ± 1.2	2.1 ± 1.5	1.8 ± 1.2	2.4 ± 1.3	0.25
	Off-Pump	4.3 ± 6.0	2.3 ± 2.4	2.7 ± 2.6	2.4 ± 2.2	
<b>CD69</b>	On-Pump	4.6 ± 3.8	4.5 ± 3.4	7.0 ± 3.9	4.1 ± 1.8	0.92
	Off-Pump	2.7 ± 3.0	3.6 ± 2.3	5.7 ± 4.7	2.6 ± 2.5	
<b>DR</b>	On-Pump	12.3 ± 4.9	9.2 ± 4.7	13.7 ± 5.2	20.2 ± 8.6	0.32
	Off-Pump	10.7 ± 2.6	8.9 ± 3.2	14.1 ± 9.4	16.2 ± 7.4	

**Table 6.** T lymphocyte activation markers in all patients (%).

<b>Markers (mean ± SD)</b>	<b>Anesthesia induction</b>	<b>Anastomoses completed</b>	<b>6 hours after anastomoses</b>	<b>24 hours after anastomoses</b>	<b>p</b>
<b>CD3</b>	71.2 ± 7.6	67.2 ± 8.8	50.9 ± 11.1	62.0 ± 8.6	< 0.001
<b>CD25</b>	6.9 ± 5.2	6.3 ± 4.2	6.3 ± 3.4	8.6 ± 4.9	= 0.027
<b>CD26</b>	29.7 ± 12.3	26.0 ± 11.0	18.0 ± 8.2	25.7 ± 9.9	< 0.001
<b>CD69</b>	6.3 ± 5.1	11.9 ± 9.8	10.3 ± 5.2	6.0 ± 2.7	< 0.001
<b>DR</b>	5.9 ± 4.2	5.4 ± 3.0	5.7 ± 4.1	5.3 ± 3.4	= 0.912

**Table 7.** B lymphocyte activation markers in all patients (%).

<b>Markers</b>	<b>Anesthesia</b>	<b>Anastomoses</b>	<b>6 hours after</b>	<b>24 hours after</b>	<b>P</b>
<b>(mean ± SD)</b>	<b>induction</b>	<b>completed</b>	<b>anastomoses</b>	<b>anastomoses</b>	
<b>CD19</b>	11.3 ± 4.0	8.9 ± 4.1	13.6 ± 8.0	17.9 ± 7.9	< 0.001
<b>CD25</b>	0.5 ± 0.6	0.5 ± 0.7	1.0 ± 0.8	1.0 ± 1.1	= 0.003
<b>CD26</b>	3.0 ± 4.3	2.2 ± 2.0	2.2 ± 2.0	2.4 ± 1.8	= 0.939
<b>CD69</b>	3.7 ± 3.5	4.1 ± 2.9	6.4 ± 4.3	3.4 ± 2.2	< 0.001
<b>DR</b>	11.5 ± 4.0	9.0 ± 4.00	13.9 ± 7.4	18.1 ± 8.1	< 0.001

### **Legends to figures**

**Figure 1.** Behavior of T lymphocyte activation markers. \*  $p < 0.0166$  in relation to initial values.

**Figure 2.** Behavior of B lymphocyte activation markers. \*  $p < 0.0166$  in relation to initial values.

Figure 1

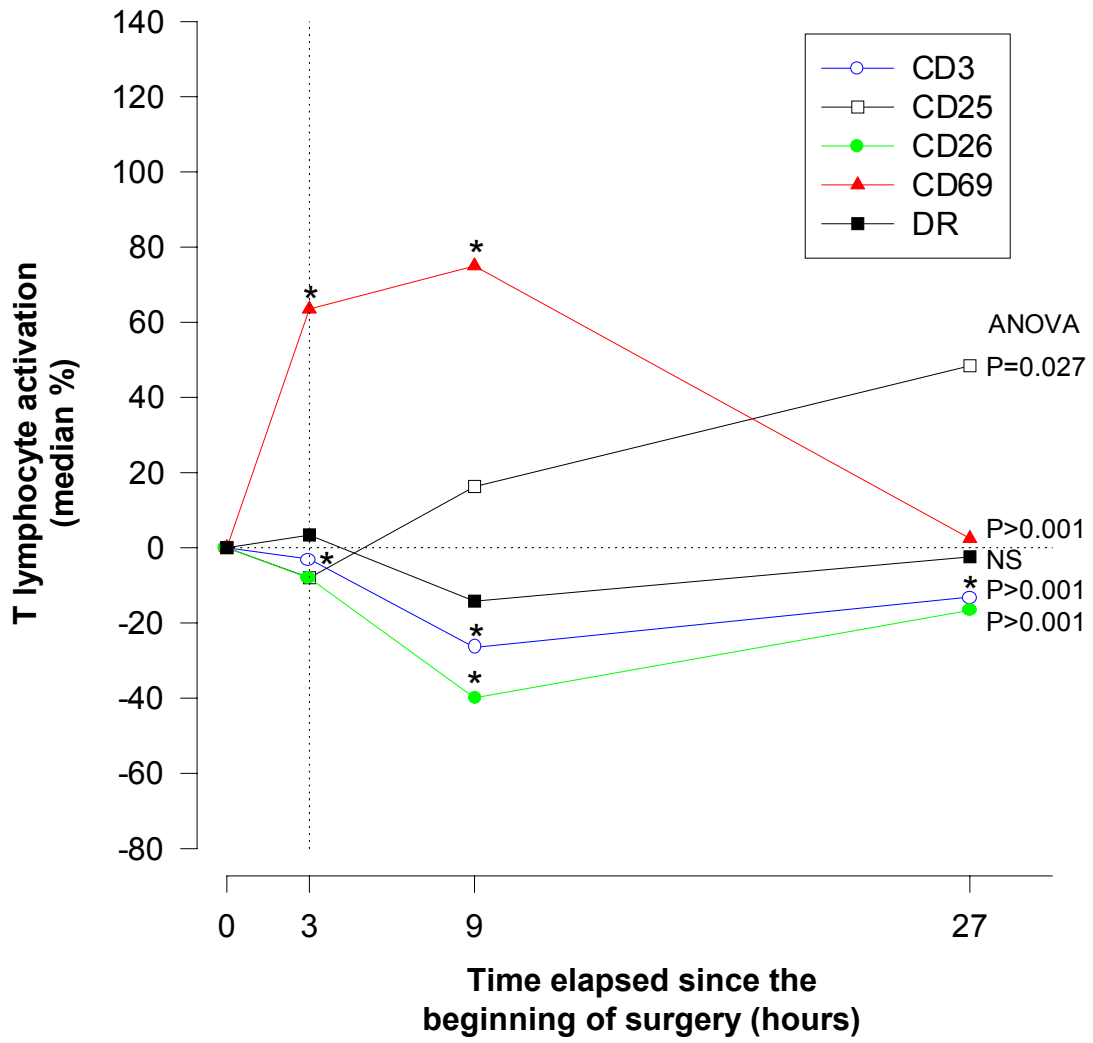
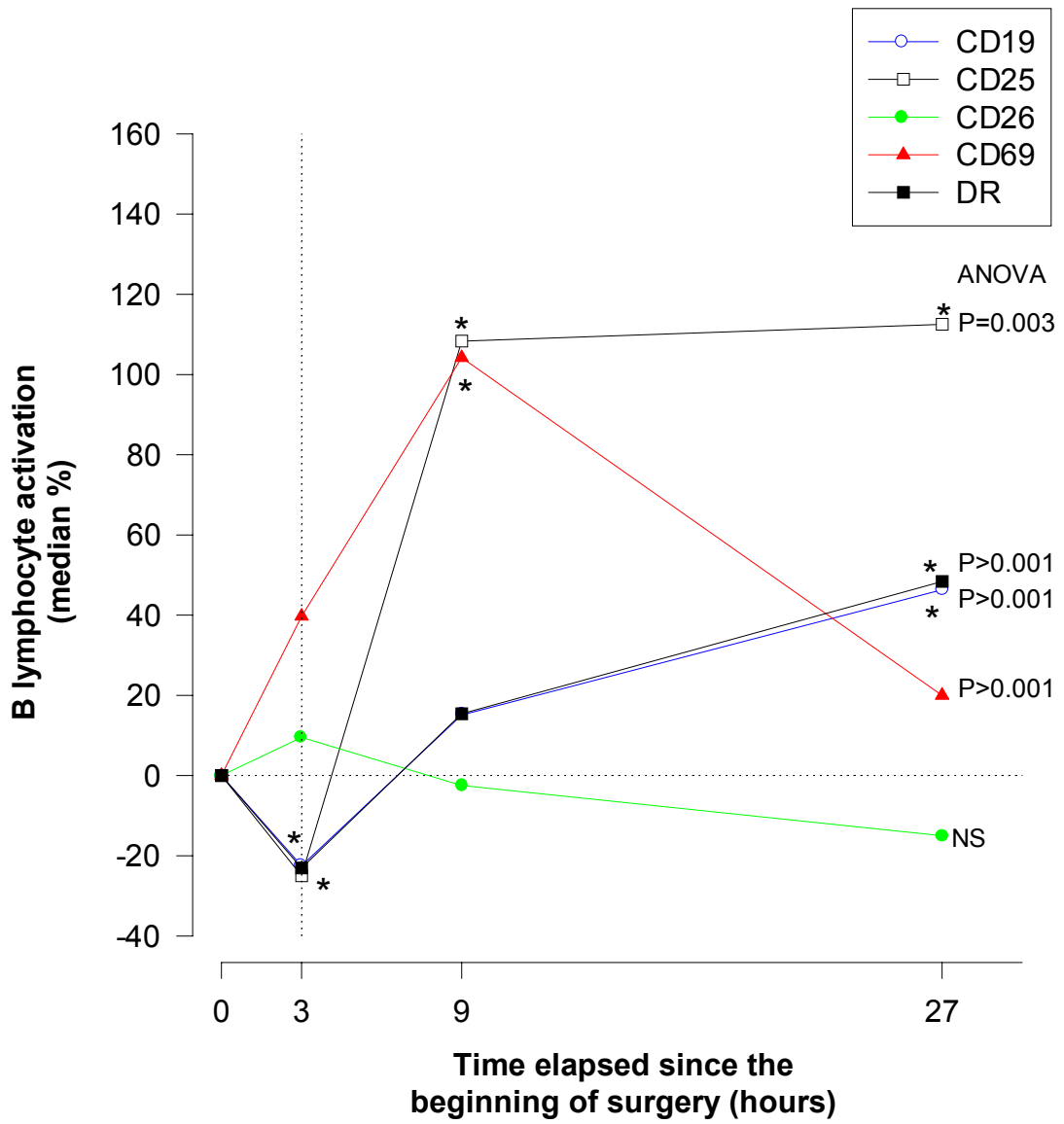




Figure 2



## **Anexo 2: Consentimento informado**

### **AUTORIZAÇÃO PARA PARTICIPAR DE UM PROJETO DE PESQUISA**

Nome do Estudo: Atividade imunoinflamatória em cirurgia de revascularização miocárdica com e sem circulação extracorpórea.

Responsáveis pelo projeto: Dr Celso Blacher e Dr. Jorge Pinto Ribeiro

#### 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 implantes 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) ou sem circulação extracorpórea. A escolha do tipo de cirurgia a ser realizado depende de critérios técnicos e da aceitação do paciente. O procedimento considerado mais adequado para seu caso lhe será proposto pelos médicos e o Sr. terá oportunidade de participar desta decisão.

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 4 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 de 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 publicadas apenas com finalidade científica, mantendo-se o anonimato.

8. Indenizações e ressarcimentos

Não estão previstos ressarcimento para cobrir despesas inerentes ao estudos. Não há 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 225-3019.

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

Porto Alegre,

.....

Assinatura do paciente

.....

Assinatura do pesquisador responsável