

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: PEDIATRIA E
CIÊNCIAS APLICADAS À PEDIATRIA

PERFIL PLASMÁTICO DA ICAM-1 E DA VCAM-1 NO
PÓS-OPERATÓRIO CARDÍACO DE LACTENTES
SUBMETIDOS À CIRCULAÇÃO EXTRACORPÓREA

ANGELA HUNSCHE

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Porto Alegre, Brasil, 2001

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: PEDIATRIA E
CIÊNCIAS APLICADAS À PEDIATRIA

PERFIL PLASMÁTICO DA ICAM-1 E DA VCAM-1 NO
PÓS-OPERATÓRIO CARDÍACO DE LACTENTES
SUBMETIDOS À CIRCULAÇÃO EXTRACORPÓREA

ANGELA HUNSCHE

Orientadora: Profa. Dra. Silvana Molossi

“ A apresentação desta dissertação é exigência do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Pediatria e Ciências Aplicadas à Pediatria, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Mestre “

Porto Alegre, Brasil, 2001

**Dedico este estudo ao amor da minha vida, Gabriel,
por manter meus dias repletos de felicidade e tornar
meus sonhos sempre mais reais.**

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu pai, Ernesto, pelo estímulo, cobrança, apoio e carinho que me fizeram sempre buscar o melhor.

A minha mãe, Valesca, pelo amor, pelo incentivo em todos os momentos e por ter sido sempre, a vida inteira, minha confidente e melhor amiga.

Ao meu irmão, Ricardo, pelas inquisições e dúvidas que me estimularam sempre a buscar respostas.

A minha avó, Alicia, minha maior incentivadora, que tem o privilégio de assistir de um ângulo bem mais elevado este momento da minha vida.

Ao meu sogro Herman e a minha sogra Raquel, por terem me acolhido com tanto carinho e vibrado sempre com minhas conquistas.

A minha grande amiga e cunhada, Jeanine, pelos conselhos e carinhos incondicionais.

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra Silvana Molossi, pela amizade e pelo exemplo de determinação e competência profissional.

À Dra Carisi Anne Polanczyc, pelo incentivo, auxílio e amizade.

À Prof. Dra. Nadine Clausell, por ter dividido parte do vasto conhecimento que acumula comigo, de uma forma sempre tão disponível.

À Prof. Dra. Newra Rotta, pelo carinho, compreensão e apoio.

Ao Dr. Jarbas Oliveira, pelo auxílio e conhecimento compartilhado.

À Dra. Lúcia Pellanda pelo carinho e pela competência profissional durante a realização da análise estatística.

Ao Dr. Paulo Antonacci Carvalho pelo exemplo, amizade e apoio nos caminhos da pediatria.

Ao Dr. Luís Jung pelo auxílio nas coletas e avaliações intraoperatórias e pela obtenção da bibliografia pertinente.

Aos Drs. Eduardo Ludwig, Paulo Carvalho, Roberto Ludwig e César Graeff Santos, por terem me aberto as portas para um caminho profissional estimulante e recompensador.

Ao Dr. Osvaldo Estrela Anselmi, pelo apoio e incentivo determinantes na minha vida profissional.

À Dra. Denise Grobocopatel e ao Dr. Neivo da Silva Júnior pela compreensão nos meus períodos de ausência e pelo companheirismo diário.

Às Dras. Aline Botta e Lisiane Dalle Mulle pelo coleguismo e amizade.

Aos funcionários da UTI Pediátrica da Santa Casa, do Bloco Cirúrgico do Hospital São Francisco e do Laboratório Central da Santa Casa pelo auxílio e compreensão durante a fase de coleta de dados.

Aos funcionários do Laboratório de Medicina Nuclear da Santa Casa pela torcida em todos os momentos.

A minha família e aos meus amigos, pelo carinho e incentivo.

Aos pacientes e a seus pais ou responsáveis, por terem consentido em participar deste estudo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro necessário para a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Pediatria e Ciências Aplicadas à Pediatria pelo profissionalismo e capacitação.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE TABELAS	xv
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xviii
INTRODUÇÃO	1
1. Circulação Extracorpórea.....	3
2. Marcadores da Resposta Inflamatória.....	7
2.1 Ativação do Complemento.....	7
2.2 Metabólitos do Ácido Aracdônico.....	8
2.3 Óxido Nítrico.....	10
2.4 Radicais Livres de Oxigênio.....	10
2.5 Endotoxina.....	11
2.6 Fator Ativador de Plaquetas.....	12
2.7 Endotelinas.....	12
2.8 Citocinas.....	13
2.8.1 Fator de Necrose Tumoral- α	14
2.8.2 Interleucina-1.....	15
2.8.3 Interleucina-2.....	16
2.8.4 Interleucina-6.....	16
2.8.5 Interleucina-8.....	17

2.8.6 Interleucina-10.....	18
2.9 Mediadores da Adesão Celular.....	19
2.9.1 Aderência dos neutrófilos e monócitos às células endoteliais.....	20
2.9.2 Moléculas de adesão e seus receptores solúveis.....	21
2.9.2.1 Selectinas.....	22
2.9.2.1.1 Selectina-L.....	23
2.9.2.1.2. Selectina-P.....	24
2.9.2.1.3 Selectina-E.....	25
2.9.2.2 Integrinas.....	26
2.9.2.3 Superfamília Imunoglobulina.....	29
2.9.2.3.1 Molécula de adesão intercelular-1.....	29
2.9.2.3.2 Molécula de adesão intercelular-2.....	31
2.9.2.3.3 Molécula de adesão celular-vascular-1.....	31
3. Racionalização do Presente Estudo.....	33
HIPÓTESE.....	39
OBJETIVOS.....	40
MATERIAL E MÉTODOS.....	41
1. População em Estudo.....	41
2. Delineamento.....	41
3. Seleção da Amostra.....	42
3.1 Critérios de inclusão.....	42
3.2 Critérios de exclusão.....	42
4. Manejo Intra-operatório.....	42

5. Coleta das Amostras.....	43
6. Quantificação das Moléculas de Adesão Solúveis.....	44
7. Obtenção dos Dados dos Pacientes.....	45
8. Análise Estatística dos Dados.....	47
9. Considerações Éticas.....	48
RESULTADOS	49
1. Características Clínicas da Amostra.....	49
2. Variáveis Hemodinâmicas.....	50
3. Variáveis Laboratoriais.....	51
4. Complicações Pós-operatórias e Evolução Clínica.....	51
5. Níveis Plasmáticos das Moléculas de Adesão.....	52
5.1 Molécula de adesão intercelular-1 solúvel.....	52
5.2 Molécula de adesão celular-vascular-1 solúvel.....	52
6. Perfil dos Dados Referentes a Pacientes Acianóticos e Cianóticos.....	53
DISCUSSÃO	78
1. Características Clínicas da População Estudada.....	79
2. Complicações Pós-operatórias e Evolução Clínica.....	82
3. Níveis Plasmáticos das Moléculas de Adesão Solúveis.....	83
3.1 Molécula de adesão intercelular-1 solúvel.....	84
3.2 Molécula de adesão celular-vascular-1 solúvel.....	87
4. Perfil dos Dados Referentes a Pacientes Acianóticos e Cianóticos.....	89
5. Considerações Finais.....	89
6. Limitações do Presente Estudo.....	91

7. Implicações Futuras.....	92
CONCLUSÕES.....	95
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96
ANEXO 1.....	117

LISTA DE ABREVIATURAS

ASA	classificação do estado físico do paciente - <i>American Society of Anesthesiology</i>
C	complemento
CD	<i>cellular determinant</i>
CEC	circulação extracorpórea
céls/ μ l	células/microlitro
CIA	comunicação interatrial
CIV	comunicação interventricular
CoAo	coartação da aorta
CPB	<i>cardiopulmonary bypass</i>
DSAV	defeito do septo atrioventricular
E	endotelial
EDTA	etilenodiaminotetraacetato
ELAM-1	molécula de adesão leucócito-endotelial
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EM	estenose mitral
ET	endotelina
FC	frequência cardíaca
FMO	falência de múltiplos órgãos
FOP	forâmen oval patente
g/dl	gramas/decilitro
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>

HP	hipertensão pulmonar
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICAM-1	molécula de adesão intercelular-1
IL	interleucina
IM	insuficiência mitral
IRA	insuficiência renal aguda
IT	insuficiência tricúspide
KDa	quilodáton
Kg	quilogramas
L	leucocitária
LAM-1	molécula de adesão leucocitária-1
LPS	lipopolissacarídeo
LT	leucotrienos
mg	miligramas
ml	mililitros
mmol/l	milimol/litro
MP	marca-passo
m ²	metro quadrado
µg	microgramas
n	número de pacientes
ng	nanogramas
NS	não significativo
ON	óxido nítrico

P	plaquetária
PCA	persistência do canal arterial
PCR	parada cardiorrespiratória
PAE	pressão do átrio esquerdo
PAF	fator ativador de plaquetas
PAM	pressão arterial média
PAP	pressão da artéria pulmonar
PG	prostaglandina
PGI ₂	prostaciclina
PVC	pressão venosa central
RNA _m	<i>messenger ribonucleic acid</i>
SARA	síndrome da angústia respiratória do adulto
SNC	sistema nervoso central
SPSS	<i>statistics package for social science</i>
TGV	transposição de grandes vasos
TNF- α	fator de necrose tumoral- α
TOF	tetralogia de Fallot
VCAM-1	molécula de adesão celular-vascular-1
VLA	<i>very late antigen</i>

Nota: Algumas siglas foram mantidas na forma original, em inglês, por serem assim conhecidas internacionalmente.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – A resposta inflamatória e o endotélio.....	37
Figura 2 – A resposta inflamatória e as moléculas de adesão.....	38
Figura 3 – Tempo de intubação x evolução clínica.....	63
Figura 4 – Tábua de sobrevida de Kaplan-Meyer.....	64
Figura 5 – Níveis plasmáticos seqüências da ICAM-1.....	66
Figura 6 – Níveis plasmáticos seqüenciais da ICAM-1.....	67
Figura 7 – Níveis plasmáticos seqüenciais da VCAM-1.....	68
Figura 8 – Níveis plasmáticos seqüenciais da VCAM-1.....	69
Figura 9 – Níveis plasmáticos seqüenciais da ICAM-1 x diagnóstico.....	76
Figura 10 – Níveis plasmáticos seqüenciais da VCAM-1 x diagnóstico.....	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Diagnóstico das cardiopatias congênitas.....	55
Tabela 2 – Características demográficas dos pacientes.....	56
Tabela 3 – Variáveis intra-operatórias.....	57
Tabela 4 – Variáveis pós-operatórias.....	58
Tabela 5 – Variáveis hemodinâmicas.....	59
Tabela 6 – Variáveis laboratoriais.....	60
Tabela 7 – Complicações pós-operatórias.....	61
Tabela 8 – Evolução clínica.....	62
Tabela 9 – Níveis plasmáticos das moléculas de adesão solúveis conforme o período de tempo.....	65
Tabela 10 – Características demográficas dos pacientes acianóticos e cianóticos.....	70
Tabela 11 – Variáveis intra-operatórias dos pacientes acianóticos e cianóticos.....	71
Tabela 12 – Variáveis pós-operatórias dos pacientes acianóticos e cianóticos.....	72
Tabela 13 – Complicações pós-operatórias dos pacientes acianóticos e cianóticos.....	73
Tabela 14 – Evolução clínica dos pacientes acianóticos e cianóticos.....	74
Tabela 15 – Níveis plasmáticos das moléculas de adesão solúveis dos pacientes acianóticos e cianóticos conforme o período de tempo.....	75
Tabela 16 – Crianças cardiopatas submetidas a cirurgias cardíacas com uso de CEC.....	94

RESUMO

Introdução – Grande parte da população de crianças portadoras de defeitos cardíacos congênitos torna-se criticamente doente durante o primeiro ano de vida e necessita tratamento cirúrgico. No entanto, durante cirurgias cardíacas, ocorre uma resposta inflamatória intensa desencadeada pelo período de circulação extracorpórea (CEC), o que provoca disfunção de órgãos e tecidos. Os neutrófilos assumem um papel importante e complexo neste período, envolvendo a ligação às células endoteliais, ativação e liberação de mediadores inflamatórios. Esse processo é iniciado e mantido através de moléculas de adesão específicas, como a molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e a molécula de adesão celular-vascular-1 (VCAM-1). Formas solúveis destas moléculas apresentam variações de seus níveis durante cirurgias cardíacas com uso de CEC. Há poucos dados na literatura relacionados ao comportamento destas moléculas após cirurgia cardíaca com uso de CEC em lactentes, estando seu significado no plasma ainda por ser decifrado.

Objetivos – Mensurar os níveis plasmáticos das moléculas de adesão solúveis ICAM-1 e VCAM-1 em condições basais e após exposição ao circuito de CEC em lactentes submetidos à cirurgia cardíaca para correção de defeitos cardíacos congênitos. Comparar os níveis plasmáticos destas moléculas entre pacientes acianóticos e cianóticos.

Métodos – Foram estudados 21 lactentes, durante o período de junho de 1998 a março de 1999, submetidos à cirurgia cardíaca com uso de CEC. Foram analisados os níveis plasmáticos da ICAM-1 e da VCAM-1 solúveis pelo método de ELISA, na indução anestésica, ao término da CEC e 8 e 26 horas após o término da CEC.

Resultados – As patologias cardíacas congênitas mais comuns foram defeito do septo atrioventricular e tetralogia de Fallot. As médias de idade e de peso foram 6,6 meses e 5,8 Kg. As medianas dos tempos de CEC e de clampeamento de aorta foram, respectivamente, 87 e 53 minutos. Todos os lactentes utilizaram inotrópicos. As medianas dos tempos de intubação e de internação foram 72 horas e 21 dias. A taxa de mortalidade dos pacientes foi de 9,5%. Os níveis basais da ICAM-1 e da VCAM-1 foram significativamente mais elevados do que aqueles considerados normais ($P < 0,0001$). Os níveis da ICAM-1 diminuíram significativamente ao término da CEC ($P < 0,001$), voltando a aumentar significativamente 8 horas após o término deste período ($P < 0,005$), sem no entanto, alcançar os valores basais 26 horas depois. A VCAM-1 apresentou comportamento semelhante. No entanto, 26 horas após CEC houve diminuição significativa de seus níveis em relação ao valor identificado 8 horas após tal período ($P < 0,005$). Não houve diferença estatisticamente significativa quanto aos valores das moléculas entre pacientes acianóticos e cianóticos ($P > 0,1$). Não houve associação entre os valores das moléculas e as variáveis perioperatórias e os desfechos clínicos.

Conclusões – Os níveis plasmáticos das moléculas de adesão solúveis ICAM-1 e VCAM-1 são aumentados em lactentes com cardiopatias congênitas acianóticas e cianóticas no seu estado basal. Os níveis plasmáticos de ICAM-1 e VCAM-1 solúveis variam após exposição ao circuito de CEC em lactentes submetidos à cirurgia cardíaca para correção de cardiopatias congênitas, apresentando um comportamento característico nestes pacientes. Não há diferenças no comportamento das moléculas entre pacientes acianóticos e cianóticos.

ABSTRACT

Introduction – A large number of children presenting with congenital cardiac defects become critically ill in the first year of life and need definitive surgical treatment. Nevertheless, there is an intense inflammatory response as a result of cardiac surgery, triggered by the use of cardiopulmonary bypass (CPB), leading to organ and tissue injury. Neutrophils have an important and complex role during that period, promoting adherence to endothelial cells, release and activation of inflammatory mediators. This process is initiated and maintained by specific adhesion molecules, such as intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and vascular-cellular adhesion molecule-1 (VCAM-1). Soluble forms of these molecules present variable levels throughout cardiac surgeries with CPB. There is few information about the behaviour of these molecules after cardiac surgeries with CPB in infants, and the significance of these findings are yet to be unraveled.

Objectives – To measure the soluble ICAM-1 e VCAM-1 plasmatic levels at baseline and after CPB exposure in infants undergoing cardiac surgery for repair of cardiac defects. To compare these molecules plasmatic levels in acyanotic and cyanotic patients.

Methods – 21 infants undergoing cardiac surgery with CPB were studied, between June 1998 and March 1999. Soluble ICAM-1 and VCAM-1 plasmatic levels were measured using ELISA at induction of anesthesia, at the end of the CPB, and 8 hours and 26 hours after CPB.

Results – Atrioventricular septal defects and tetralogy of Fallot were the most common congenital cardiac defects. The age and weight mean values were 6,6 months and 5,8 Kg. The median values of CPB time and aortic cross-clamping time were 87 minutes and 53 minutes. All infants used inotropic drugs. The median values of intubation time and hospitalization time were 72 hours and 21 days. The patients mortality rate was 9,5%. The baseline levels of ICAM-1 and VCAM-1 were higher than normal values ($P < 0,0001$). The ICAM-1 levels significantly decreased at the end of CPB ($P < 0,001$), significantly increasing 8 hours after that period ($P < 0,005$), without reaching baseline values 26 hours after that. VCAM-1 presented a similar behaviour. Nevertheless, its levels decreased significantly 26 hours after CPB, compared with levels measured 8 hours after that period ($P < 0,005$). There was no statistically significant difference in molecules levels in acyanotic and cyanotic patients ($P > 0,1$). There was no significant association between molecules levels and perioperative variables or clinical endpoints.

Conclusions – The soluble ICAM-1 and VCAM-1 baseline plasmatic levels are higher than normal in infants presenting acyanotic and cyanotic congenital cardiopathies. The soluble ICAM-1 and VCAM-1 plasmatic levels vary after CPB exposure in infants undergoing reparative congenital cardiac surgeries, presenting a characteristic behaviour in these patients. There are no differences in these molecules behaviour in acyanotic and cyanotic patients.

INTRODUÇÃO

Os defeitos cardíacos integram o grupo de malformações congênitas maiores e constituem, neste grupo, as alterações mais prevalentes (YAGEL et al., 1997; LeBLANC & RUSSELL, 1998; SRIVASTAVA, 1999). Estão presentes em 0,8 a 1% das crianças nascidas vivas (CASTANEDA et al., 1989; KIDD et al., 1993; YAGEL et al., 1997; LeBLANC & RUSSELL, 1998; SMEETON et al., 1999; SRIVASTAVA, 1999), e em 10% dos fetos espontaneamente abortados (SRIVASTAVA, 1999). São responsáveis por mais de 20% das mortes perinatais que resultam de malformações congênitas (KIDD et al., 1993; YAGEL et al., 1997; SMEETON et al., 1999) e por mais da metade das mortes na infância causadas por malformações letais (YAGEL et al., 1997). Dados referentes ao censo realizado no Rio Grande do Sul pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 1991, indicam um número entre 926 a 2000 nascimentos de portadores de cardiopatia congênita (IBGE, censo 1991). No ano de 1996, para uma população de 9,6 milhões de habitantes no Rio Grande do Sul, calcula-se que nasceram cerca de mil crianças cardiopatas (IBGE, censo 1996).

Grande parte da população de crianças portadoras de defeitos cardíacos congênitos torna-se criticamente doente durante o primeiro ano de vida e necessita de tratamento cirúrgico. De acordo com o *New England Regional Infant Cardiac Program Study*, a mortalidade por doença cardíaca congênita ocorre principalmente nos primeiros meses de vida (CASTANEDA et al., 1989). Nos sobreviventes, doença cardíaca congênita crítica provoca, progressivamente, um dano orgânico secundário mais severo e, eventualmente, irreversível, principalmente em coração, pulmões, rins e sistema nervoso central (DAVIES et al., 1990;

LANTERI et al., 1995; YAU et al., 1996; DITTRICH et al., 1998). Além dessas seqüelas anatômicas e funcionais, existem outras bem mais difíceis de serem analisadas e quantificadas, como as anormalidades psicomotoras e cognitivas, que podem também limitar de forma significativa o desenvolvimento de crianças com doenças cardíacas congênitas (LAANE et al., 1997; SAMANGO-SPROUSE & SUDDABY,1997). O prognóstico relacionado ao neurodesenvolvimento de crianças com cardiopatias congênitas inclui um amplo espectro de desordens do desenvolvimento, desde distúrbios de linguagem e de aprendizado, até retardo mental e do desenvolvimento e paralisia cerebral (SAMANGO-SPROUSE & SUDDABY,1997).

As cirurgias corretivas primárias para essas cardiopatias congênitas oferecem a oportunidade de se produzir um impacto tanto na mortalidade causada pelo defeito subjacente, quanto nos efeitos secundários provocados pelas malformações cardíacas no desenvolvimento de outros sistemas orgânicos e na abordagem cognitiva (CASTANEDA et al., 1989).

No entanto, durante cirurgias cardíacas, o miocárdio está exposto a muitos danos traumáticos e metabólicos, principalmente durante o período de circulação extracorpórea (CEC). O sistema de CEC é um método de perfusão corporal no qual as funções cardíaca e pulmonar são substituídas por um circuito extracorpóreo constituído de um oxigenador sangüíneo artificial, de bomba(s) sangüínea(s) e de outros dispositivos associados. O uso de um circuito extracorpóreo fornece um ambiente controlado para a cirurgia do coração e dos grandes vasos (HSU, 1997). No entanto, está claramente estabelecido que, após grandes cirurgias cardíacas, ocorre uma resposta inflamatória sistêmica importante, desencadeada

pela incompatibilidade sangüínea após contato com o circuito de CEC (BUTLER et al., 1993; BOLDT et al., 1993; GILLINOV et al., 1994; PETAEJAE et al., 1995; CREMER et al., 1996; BOYLE et al., 1996; WAN et al., 1997; HALL et al., 1997; HSU, 1997; MILLER et al., 1997; ROYSTON, 1997; ASIMAKOPOULOS & TAYLOR, 1998; LIEBOLD et al., 1999; BAUFRETON et al., 1999; HENRIQUES & FORTE, 2000; PARET et al., 2000).

1) CIRCULAÇÃO EXTRACORPÓREA

O pai da circulação extracorpórea cirúrgica em seres-humanos foi o Dr. John H. Gibbon, cujo interesse e determinação em desenvolver tal sistema surgiu em 1931 (NOLAN et al., 1997; FOU, 1997). Em 6 de maio de 1953, John Gibbon utilizou, pela primeira vez, seu aparato para o reparo de um defeito do septo interatrial em uma paciente de 18 anos. Enquanto isso, o Dr. C. Walton Lillehei iniciou o uso de circulação cruzada na Universidade de Minnesota, onde um pai com tipo sangüíneo compatível serviu como oxigenador de uma criança portadora de defeito cardíaco congênito. John Kirkland, na clínica Mayo, iniciou o uso do aparato de circulação extracorpórea IBM-Gibbon em março de 1955, tendo realizado 8 cirurgias durante os primeiros três meses, com quatro sobreviventes. Parecia óbvio desde o início que a circulação extracorpórea era lesiva e que, por isso, o cirurgião deveria atuar com a maior facilidade possível, a fim de minimizar o tempo de CEC (NOLAN et al., 1997).

Durante a última década, o endotélio vascular foi implicado como participante ativo da manutenção da homeostase cardiovascular normal (VERRIER & MORGAN, 1998), mantendo a fluidez sangüínea através da inibição da coagulação e da resistência à adesão

dos leucócitos sangüíneos (BEVILACQUA, et al., 1994). Essa estrutura biológica não mais é considerada uma barreira inerte que separa o sangue dos tecidos corporais. Pesquisas extensas têm revelado que o endotélio exerce um papel importante na regulação da permeabilidade da membrana, no transporte de lipídios, no tônus vasomotor, na coagulação, na fibrinólise e na inflamação. Essa regulação é alcançada através da expressão de proteínas de superfície derivadas do endotélio ou pela secreção de fatores solúveis biologicamente ativos. As células endoteliais são extremamente sensíveis aos insultos que ocorrem durante a CEC. Esses insultos fazem com que as células endoteliais alterem rapidamente seu fenótipo, gerando uma resposta chamada ativação celular endotelial . Essa ativação provoca rompimento na função de barreira, aumento da vasoconstrição, coagulação anormal, adesão de leucócitos e proliferação de músculo liso (VERRIER, 1998). Teoricamente, essas mudanças servem como proteção; no entanto, no caso da CEC, quando os estímulos são severos, essa mesma resposta é excessiva (ASIMAKOPOULOS & TAYLOR, 1998; BAUFRETON et al., 1999), resultando em dano tecidual e resposta fibroproliferativa anormal (VERRIER, 1998). A representação esquemática deste processo encontra-se na figura 1. A resposta inflamatória corporal sistêmica induzida pela CEC é considerada a principal responsável pela disfunção orgânica pós-operatória que ocorre em cirurgias cardíacas (BUTLER et al., 1993; BOLDT et al., 1993; GILLINOV et al., 1993, 1994, 1994; ELGEBALY et al., 1994; PETAEJAE et al., 1995; HORNICK & GEORGE, 1996; CREMER et al., 1996; HSU, 1997; BOYLE et al., 1996, 1997; WAN et al., 1997; HALL, et al., 1997; MILLER, et al., 1997; WATANABE et al., 1998; LIEBOLD et al., 1999; BAUFRETON et al., 1999; ICHINOSE et al., 1999; HENRIQUES & FORTE, 2000; PARET et al., 2000). Kirklin sugeriu, então, que os efeitos deletérios da CEC eram secundários à exposição do sangue às superfícies anormais da mesma, o que iniciava uma

resposta inflamatória corporal generalizada, caracterizada pela ativação sangüínea de vários sistemas do organismo, implicados como mediadores deste processo (KIRKLIN, 1991).

Atualmente, identificam-se duas fontes principais de ativação sangüínea associadas ao desencadeamento da resposta inflamatória durante a CEC: fatores independentes do material (trauma cirúrgico, isquemia-reperfusão dos órgãos, mudanças na temperatura corporal e liberação de endotoxina) (BUTLER et al., 1993; SAWA et al., 1996; WAN et al., 1997; HALL et al., 1997; BOYLE et al., 1997; BAUFRETON et al., 1999) e fatores dependentes do material (exposição do sangue a superfícies e condições não fisiológicas) (BUTLER et al., 1993; HORNICK & GEORGE, 1996; WAN et al., 1997; HALL et al., 1997; BAUFRETON et al., 1999). Tais fatores têm sido documentados na literatura como responsáveis pela indução de uma resposta inflamatória complexa, que inclui ativação dos mediadores humorais e celulares da inflamação, entre eles: ativação do complemento (C), liberação de citocinas, ativação dos leucócitos, expressão de moléculas de adesão e produção de várias substâncias, incluindo radicais livres de oxigênio, metabólitos do ácido aracdônico, fator ativador de plaquetas (PAF), óxido nítrico (ON) e endotelinas (ET) (AMERICAN COLLEGE OF CHEST PHYSICIANS / SOCIETY OF CRITICAL CARE MEDICINE CONSENSUS CONFERENCE, 1992; BUTLER et al., 1993; FINN et al., 1993; GILLINOV et al., 1993, 1994, 1994; KILBRIDGE et al., 1994; BOLDT et al., 1995, 1995; WALSH et al., 1995; SEGHAYE et al., 1996; WAN et al., 1997; Hall et al., 1997; WATANABE et al., 1998).

Tal cascata inflamatória pode contribuir para o desenvolvimento de complicações pós-operatórias, entre elas, falência respiratória, disfunção renal, distúrbios da coagulação,

distúrbios neurológicos, alterações na função hepática, falência de múltiplos órgãos (FMO) (AMERICAN COLLEGE OF CHEST PHYSICIANS / SOCIETY OF CRITICAL CARE MEDICINE CONSENSUS CONFERENCE, 1992; BOYLE et al., 1997) e febre de origem não infecciosa, tendo sido coletivamente denominadas de síndrome pós-perfusão (BOLDT et al., 1995; BOYLE et al., 1997). A magnitude dessa síndrome clínica está associada à intensidade da ativação da resposta inflamatória (MILLER & LEVY, 1997).

A ativação da resposta inflamatória provoca extravasamento capilar, o que resulta em aumento no conteúdo de água tecidual, especialmente em lactentes e crianças (NAIK et al., 1991; ELLIOTT, 1993; WANG et al., 1996; DRAAISMA et al., 1997; ASHRAF et al., 1997; WATANABE et al., 1998). Esse processo pode levar à sobrecarga hídrica, impedir a troca gasosa pulmonar e retardar a separação da ventilação mecânica. Além disso, a hemodiluição das plaquetas e dos fatores de coagulação promove o dano hemostático que é geralmente observado nessas crianças (JOURNOIS et al., 1994). O uso de CEC em correção de defeitos cardíacos congênitos tem sido associado a uma resposta inflamatória sistêmica e a seqüelas clínicas pós-operatórias muito semelhantes àquelas observadas em pacientes sépticos, tais como febre, leucocitose, extravasamento capilar, disfunção respiratória, disfunção renal, disfunção do sistema nervoso central (SNC) (DUVAL et al., 1999) e FMO (TÁRNOK et al., 1999), o que contribui para a morbimortalidade relacionada ao uso desta técnica (NAIK et al., 1991; ELLIOTT, 1993; WANG et al., 1996; DRAAISMA et al., 1997; ASHRAF et al., 1997; MILLER & LEVY, 1997; WATANABE et al., 1998). A representação esquemática da resposta inflamatória aos estímulos traumáticos ou microbianos encontra-se na figura 1.

Duas fases de ativação celular endotelial parecem contribuir para a disfunção de órgãos após a CEC. Na fase imediata, os produtos de degradação do C circulante iniciam uma resposta adesiva nos neutrófilos. A segunda fase é mais prolongada, já que novas proteínas, como selectina-endotelial (E), molécula de adesão intercelular (ICAM)-1 e interleucina (IL)-8 são produzidas e expressas por células endoteliais em resposta à exposição às citocinas, lipopolissacarídeos (LPS) e mediadores inflamatórios circulantes (BOYLE et al., 1997).

2) MARCADORES DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA

2.1 Ativação do Complemento

O sistema C consiste de 20 proteínas plasmáticas e forma parte do mecanismo de defesa do organismo (ASIMAKOPOULOS & TAYLOR, 1998). É ativado num sistema de cascata pelas vias clássica e alternativa, constituindo seus subprodutos de ativação a primeira onda de mediadores inflamatórios liberados sistemicamente após o início da CEC (GILLINOV et al., 1994; MILLER & LEVY, 1997; EDMUNDS, 1998). A exposição do sangue aos circuitos extracorpóreos ativa a via alternativa, que parece ser o principal mecanismo de ativação do C durante a CEC, levando à formação de C3a e C5a (formas ativadas do C), enquanto que a reversão da heparina com protamina ativa a via clássica (BUTLER et al., 1993; BOYLE et al., 1997; MILLER & LEVY, 1997), ocorrendo um aumento associado nos níveis de C4a e posterior aumento nos níveis de C3a (WAN et al., 1997). As anafilatoxinas C3a e C5a provocam liberação de histamina dos mastócitos e basófilos, aumentam a permeabilidade vascular, estimulam os leucócitos a liberar radicais livres de

oxigênio e enzimas lisossômicas (GILLINOV et al., 1994) e estimulam os monócitos a transcrever o ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) que codifica a produção das citocinas fator de necrose tumoral- α (TNF- α), IL-1 e IL-6 (STEINBERG et al., 1993). O C3a é um potente estimulador da agregação plaquetária. Muitos autores têm demonstrado níveis elevados de C3a durante e após a CEC (JANSEN et al., 1992), bem como elevação nos níveis de C5b-9 (STEINBERG et al., 1993). Os níveis de C3a começam a aumentar dentro de 10 minutos de exposição a esta técnica, sendo que os níveis persistem aumentando até atingir o pico no fim da mesma (MILLER & LEVY, 1997). O C5a é um subproduto solúvel da ativação do C (BOYLE et al., 1997), tornando-se um marcador deste processo, além de estimular a agregação dos neutrófilos e a aderência às células endoteliais (ASIMAKOPOULOS & TAYLOR, 1998), o extravazamento capilar, a degranulação de neutrófilos e a expressão da molécula de adesão dos neutrófilos selectina-plaquetária (P) na superfície das plaquetas e no endotélio (BOYLE et al., 1997). Estudos realizados em crianças demonstraram níveis elevados de C5a no final da CEC (SEGHAYE et al., 1993, 1994), bem como a correlação entre a ativação do C e a duração da mesma, sendo incerta sua relevância clínica (MILLER & LEVY, 1997). Muitos estudos têm relacionado a morbidade pós-operatória à ativação do C (WAN et al., 1997).

2.2 Metabólitos do Ácido Aracdônico

O ácido aracdônico é um ácido graxo poliinsaturado presente em grande quantidade nas membranas celulares. Sua liberação leva à formação de prostanóides e leucotrienos (LT).

Os prostanóides mais importantes são o tromboxano A₂ e as prostaglandinas (PG) (WAN et al., 1997). A fonte primária é a membrana celular dos neutrófilos, mas o líquido pleural também pode ser fonte de tromboxano e prostaciclina durante a CEC (SINGH et al., 1995). O tromboxano A₂, que tem fortes propriedades vasoconstritoras, também promove agregação plaquetária. As PG, como a PGE₁, a PGE₂ e a prostaciclina (PGI₂), são também liberadas durante a CEC, podendo seus efeitos vasodilatador e antiagregador plaquetário, contrabalançar os efeitos do tromboxano A₂. Além disso, podem ter efeitos protetores no coração e no pulmão (WAN et al., 1997).

Os LT são potentes quimiotáticos produzidos pelos neutrófilos, monócitos e macrófagos após estimulação por C5a e IL-8 e a sua concentração sérica aumenta durante a CEC (GADALETA & MIHRAN, 1994). A lipooxigenase cataliza a conversão de ácido aracdônico em LT B, C, D e E. O LTB₄ afeta os neutrófilos, induzindo quimiotaxia, agregação, aderência às células endoteliais, degranulação com liberação de enzimas proteolíticas e geração de radicais tóxicos do oxigênio. Os LTC₄, LTD₄ e LTE₄ constituem a entidade conhecida como substância de reação lenta da anafilaxia. Esses LT têm propriedades vasoconstritoras arteriolares profundas (ao menos tão potente quanto a angiotensina) e promovem marcado aumento da permeabilidade vascular (mil vezes maior que a histamina) (MILLER & LEVY, 1997). Acredita-se que a produção de LT tenha um papel importante na síndrome da angústia respiratória do adulto (SARA) e na FMO (GADALETA & MIHRAN, 1994).

2.3 Óxido Nítrico

O ON corresponde ao fator relaxante derivado do endotélio, sendo um grande regulador do tônus vasomotor e do fluxo sanguíneo. Pode prevenir a formação de trombos, através da inibição da adesão de plaquetas e neutrófilos ao endotélio (WAN et al., 1997). Sob a influência da endotoxina e das citocinas, uma forma induzível da enzima ON sintetase é expressa pelo endotélio vascular e pelas células musculares lisas, o que leva à produção e liberação aumentada de ON (HALL et al., 1997). Os efeitos resultantes incluem relaxamento do músculo liso vascular (levando à hipotensão), depressão miocárdica e injúria pulmonar, eventos estes observados após cirurgias cardíacas (FINKEL et al., 1992; HALL et al., 1997). O ON inibe a adesão dos neutrófilos às células endoteliais, inibe a agregação plaquetária e pode ter um papel na injúria por isquemia-reperusão (HILL, 1998). A administração de heparina (LI et al., 1996), bem como as citocinas pró-inflamatórias, podem aumentar a liberação de ON (WAN et al., 1997). Tem sido demonstrada a geração de ON durante cirurgia cardíaca com CEC, permanecendo níveis elevados após este período (RUVOLO et al., 1994).

2.4 Radicais Livres de Oxigênio

A ativação dos leucócitos resulta na liberação de grandes quantidades de radicais livres de oxigênio, como os radicais superóxido, hidroxil e perhidroxil, que agem nos lipídios da membrana para aumentar a permeabilidade da mesma. Os radicais livres de oxigênio podem prejudicar a disponibilidade de ON, provocando vasoespasmo e trombose após a reperusão do coração isquêmico, além de estarem implicados na diminuição da função

cardíaca e pulmonar (WAN et al., 1997). A atividade dos radicais livres de oxigênio está aumentada durante e após a CEC (BUTLER et al., 1993; PESONEN et al., 1995).

2.5 Endotoxina

A endotoxina, potente ativador da cascata inflamatória, é um LPS associado com membranas celulares de microorganismos Gram-negativos, cujos níveis circulantes encontram-se elevados durante e após a CEC (ROCKE et al., 1987; NILSON et al., 1990; BUTLER et al., 1993; MILLER & LEVY, 1997; BOYLE et al., 1997). Existem várias fontes possíveis de endotoxina durante a CEC, podendo ser resultado da contaminação de circuitos extracorpóreos, cateteres arteriais pulmonares, fluidos intravenosos ou produtos sanguíneos (MILLER & LEVY, 1997). No entanto, o intestino é, provavelmente, uma das fontes mais importantes (RIDDINGTON et al., 1996). A vasoconstrição esplâncnica durante a CEC pode resultar em isquemia da mucosa intestinal, que pode levar a mudanças na permeabilidade intestinal e à conseqüente liberação de endotoxina na circulação (BOYLE et al., 1997). Os níveis de endotoxina estão correlacionados com o grau de comprometimento hemodinâmico e com o tempo de clampeamento da aorta (ROCKE et al., 1987). A presença de endotoxina pode ser, em parte, responsável pela ativação do complemento, através da via alternativa, pela liberação aumentada de citocinas, incluindo TNF- α , e pela ativação dos neutrófilos (BOYLE et al., 1997). A presença de endotoxina na circulação sistêmica tem sido associada ao desenvolvimento de acidemia láctica, baixa resistência vascular sistêmica e função ventricular deprimida (SUFFREDINI et al., 1989).

2.6 Fator Ativador de Plaquetas

O PAF é um fosfolípido sintetizado por plaquetas, células endoteliais vasculares e, possivelmente, pelo miocárdio. O PAF possui propriedades agregadoras e ativadoras plaquetárias, estando seus receptores presentes não só nas plaquetas, como também nos neutrófilos, monócitos e células endoteliais. O PAF é um potente quimiotático, ativador e agregador dos neutrófilos, apresentando um papel crucial na injúria por isquemia-reperusão do miocárdio (WAN et al., 1997). O PAF pode ter efeitos cardíacos e hemodinâmicos deletérios, tendo estudos experimentais descrito o seu papel como mediador chave da injúria miocárdica e pulmonar após CEC (ZEHR et al., 1995).

2.7 Endotelinas

A ET-1 é um peptídeo com 21 resíduos de aminoácidos, liberado pelo endotélio. É o vasoconstritor endógeno mais potente já observado, estando envolvido na regulação da pressão sanguínea arterial e do débito cardíaco (DAVIES & HAGEN, 1993; MICHAEL & MARKEWITZ, 1996). Intervenções cirúrgicas para correção de defeitos cardíacos congênitos ou lesões valvulares podem reduzir a pressão arterial pulmonar, e essas mudanças vasculares têm sido correlacionadas com diminuição dos níveis plasmáticos de ET-1 (ISHIKAWA et al., 1995). Os níveis de pico plasmático de ET-1 ocorrem no fim da CEC e se correlacionam positivamente com a duração da técnica (WAN et al., 1997). O pulmão é um sítio importante tanto de produção como de metabolização da ET-1 (DUPUIS et al., 1996).

2.8 Citocinas

As citocinas são pequenas proteínas geradas nos tecidos sob uma variedade de circunstâncias, tendo múltiplas funções fisiológicas (FINKEL et al., 1992; ASIMAKOPOULOS & TAYLOR, 1998). Assemelham-se a hormônios pois, após serem produzidas e liberadas por suas células de origem, são transportadas até lugares distantes do corpo e afetam a função de certas células nesses locais (MILLER & LEVY, 1997). Em contraste aos hormônios, no entanto, as citocinas têm múltiplos efeitos biológicos e são produzidas primariamente em resposta a estímulos externos (ASIMAKOPOULOS & TAYLOR, 1998). O TNF- α e várias IL exercem papéis significativos na resposta inflamatória corporal (BUTLER et al., 1993). As citocinas atuam como mensageiras intercelulares em resposta à ativação celular. Se o estímulo para sua produção é sustentado, ou se é de magnitude suficiente, as citocinas podem tornar-se ativas sistemicamente, exercendo efeitos fisiopatológicos em coração, pulmões, fígado, sistema de coagulação e sistema nervoso central (FINKEL et al., 1992). As manifestações clínicas da liberação sistêmica de citocinas incluem: febre, nível reduzido de consciência, instabilidade hemodinâmica e depressão miocárdica. A liberação de citocinas pró-inflamatórias pode contribuir para o desenvolvimento de FMO (PARTRICK et al., 1996). Todas essas alterações podem ser verificadas no curso pós-operatório precoce após CEC (HALL et al., 1997). A liberação de citocinas pode ser estimulada por um número de fatores, incluindo isquemia-reperfusão, ativação do C, liberação de endotoxina e efeito de outras citocinas (WAN et al., 1997), podendo ser modulada por anestesia que, por sua vez, possivelmente, influencie a função endotelial e a concentração de moléculas de adesão circulantes

(BOLDT et al., 1998). As citocinas liberadas durante e após a CEC são: TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8 e IL-10 (HALL et al., 1997), tendo as citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1, bem como as citocinas inflamatórias IL-6 e IL-8 particular importância (BUTLER et al., 1993; BOYLE et al., 1997; ASIMAKOPOULOS & TAYLOR, 1998).

2.8.1 Fator de necrose tumoral- α

Vários estudos demonstraram níveis elevados de TNF- α durante e após CEC (BUTLER et al., 1993; WAN et al., 1997; ASIMAKOPOULOS & TAYLOR, 1998). O TNF- α , também conhecido como caquectina, tem esse nome devido a sua habilidade em produzir necrose hemorrágica de tumores e ao seu papel em causar a caquexia da doença crônica (MILLER & LEVY, 1997). É um dos mais precoces e importantes mediadores endógenos liberados na resposta inflamatória, sendo encontrado em muitas linhas celulares, como monócitos sanguíneos, macrófagos peritoneais e alveolares, células de Kupffer, mastócitos, células endoteliais e linfócitos (HALL et al., 1997). O TNF- α induz a produção de outros mediadores humorais da inflamação, como IL-1, IL-6, leucotrienos e PAF, induz a síntese de proteínas hepáticas de fase aguda e estimula os neutrófilos a degranular e a aderir às células endoteliais. Além disso, tem um importante papel em perpetuar tanto os componentes humorais, quanto os celulares da resposta inflamatória corporal à CEC (MILLER & LEVY, 1997). Os efeitos fisiológicos do TNF- α incluem hipotensão, febre, produção aumentada das proteínas de fase aguda e níveis diminuídos de albumina sérica (HALL et al., 1997), podendo contribuir para a disfunção miocárdica e a instabilidade hemodinâmica após a CEC (OHKAWA et al., 1995). Níveis plasmáticos desta citocina

umentam em associação com a CEC, tendo picos bimodais 2 horas e 18-24 horas após estabelecimento da mesma. Os seus níveis aumentam mais rápido do que os de qualquer outra citocina, indicando seu papel como iniciador neste ramo da resposta inflamatória humoral (MILLER & LEVY, 1997).

2.8.2 Interleucina-1

A IL-1, previamente conhecida como pirógeno-endógeno, tem propriedades biológicas semelhantes às do TNF- α , incluindo a produção de febre (BUTLER et al., 1993), sonolência e hipotensão, expressão da óxido nítrico sintetase, indução da síntese de PG, inibição da lipase lipoproteína, atividade pró-coagulante e síntese aumentada de proteínas da fase aguda (HALL et al., 1997). Além disso, promove a ativação de neutrófilos e células endoteliais com subsequente adesão aumentada entre essas células, o acúmulo de neutrófilos na vasculatura de múltiplos órgãos, a produção de anticorpos pelos linfócitos e a produção de IL-6 e IL-8. A IL-1 parece ter o papel central no sistema das IL, devido a sua multiplicidade de ações em muitas células-alvo e devido a sua habilidade em induzir a produção de outras IL (MILLER & LEVY, 1997). A IL-1 é produzida por monócitos e macrófagos que foram estimulados por TNF- α , C3a e C5a. Níveis plasmáticos da IL-1 aumentam após a CEC, alcançando um pico 24 horas depois (ASIMAKOPOULOS & TAYLOR, 1998). A IL-1 tem duas isoformas: a IL-1 α e a IL-1 β . A primeira não foi identificada na circulação de pacientes com qualquer doença. Mais de 80% da IL-1 β detectável está localizada intracelularmente, sendo o seu aparecimento na circulação,

praticamente, um reflexo da destruição celular (HALL et al., 1997). A IL-1 β tem sido descrita como aumentada durante a CEC (MARKEWITZ et al., 1993).

2.8.3 Interleucina-2

A IL-2 é uma citocina envolvida na resposta imune mediada por células. É responsável por funções imunes, como proliferação e diferenciação de células-T e respostas de pele do tipo hipersensibilidade retardada (MARKEWITZ et al., 1993). Os receptores da IL-2 estão aumentados durante cirurgias cardíacas, podendo representar uma tentativa de modular a resposta imune (HALL et al., 1997).

A CEC tem sido associada de uma forma ainda mais consistente com a produção de IL-6 e IL-8 (WAN et al., 1997). Os níveis dessas citocinas pró-inflamatórias têm sido correlacionados com a duração da CEC e com o tempo de clampeamento da aorta (BOYLE et al., 1997). Níveis elevados de IL-6 e IL-8 após CEC estão associados à disfunção cardíaca e podem ser utilizados como marcadores do intenso processo inflamatório que ocorre durante a CEC (TÁRNOK et al., 1999).

2.8.4 Interleucina-6

A IL-6 é produzida por monócitos, macrófagos, linfócitos, fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais e células musculares lisas em resposta a sua estimulação por TNF- α , endotoxina e , especialmente, IL-1 (HALL et al., 1997; HILL, 1998). A IL-6, em conjunto

com o TNF- α e a IL-1 β , é um pirógeno-endógeno (HALL et al., 1997). Seu efeito mais significativo é a coordenação da reação inflamatória sistêmica generalizada, conhecida como resposta de fase aguda. Essa reação consiste de febre, taquicardia, leucocitose, alteração na permeabilidade vascular, catabolismo líquido, síntese diminuída de albumina e produção aumentada de proteínas da fase aguda pelos hepatócitos (BUTLER et al., 1993). A IL-6 também exerce um papel como depressor miocárdico (FINKEL et al., 1992). Os níveis de IL-6 encontram-se elevados durante cirurgias cardíacas (BUTLER et al., 1992; MARKEWITZ et al., 1993; MILLAR et al., 1993; JOURNOIS et al., 1994, 1995; SAWA et al., 1996; WANG et al., 1996). Níveis plasmáticos de IL-6 aumentam 2 horas após o início da CEC, alcançando o pico em 4-12 horas (LIEBOLD et al., 1999), mantendo-se significativamente elevados 24 horas após o início da mesma (BUTLER et al., 1992; SAWA et al., 1996; BOYLE et al., 1997). Níveis plasmáticos de IL-6 podem se correlacionar com a severidade do dano tecidual induzido pela cirurgia e com a resposta inflamatória à CEC, sendo responsável por grande parte da morbidade associada a essa técnica (MILLER & LEVY, 1997).

2.8.5 Interleucina-8

A IL-8 é um potente quimiotático para os neutrófilos (DAVIES & HAGEN, 1993; BOYLE et al., 1996). É produzida por monócitos, células endoteliais, macrófagos alveolares e fibroblastos, como consequência da estimulação deles por TNF- α , IL-1 e endotoxina (MILLER & LEVY, 1997). Níveis plasmáticos de IL-8 começam a aumentar durante a CEC no início do reaquecimento, com picos ocorrendo 1-3 horas após, havendo níveis

detectáveis ainda presentes com 24 horas (BUTLER et al., 1992; SAWA et al., 1996; BOYLE et al., 1997). É responsável pela regulação da quimiotaxia específica dos neutrófilos, pela estimulação das espécies reativas de oxigênio, pela regulação da migração transendotelial dos neutrófilos e pelo vazamento plasmático dependente dos neutrófilos (HALL et al., 1997). Causa aumento na expressão de moléculas de adesão nos neutrófilos e estimula a degranulação dos neutrófilos e a geração de radicais tóxicos de oxigênio, provocando dano às células endoteliais e aos tecidos circundantes (MILLER & LEVY, 1997). Isso sugere que a IL-8 pode ter um importante papel no direcionamento das células polimorfonucleares no desenvolvimento da resposta inflamatória sistêmica durante cirurgias cardíacas, promovendo a união entre os mediadores humorais e celulares da inflamação (FINN et al., 1993). Aumentos nas concentrações plasmáticas de IL-8 têm sido descritos durante cirurgias cardíacas tanto em crianças como em adultos (MILLAR et al., 1993; JOURNOIS et al., 1994, 1995; BOYLE et al., 1996; SAWA et al., 1996; WANG et al., 1996).

2.8.6 Interleucina-10

A liberação da citocina anti-inflamatória IL-10 durante a CEC exerce um número de efeitos anti-inflamatórios, incluindo inibição da síntese de citocinas inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 (WAN et al., 1997; HALL et al., 1997).

A expressão e a liberação das citocinas constituem um dos principais mecanismos que regula o próximo passo da resposta inflamatória, ou seja, a interação célula-a-célula mediada através das moléculas de adesão (ASIMAKOPOULOS & TAYLOR, 1998).

2.9 Mediadores da Adesão Celular

Há mais de cem anos os cientistas documentaram o fato de os leucócitos se ligarem ao endotélio antes de transmigrarem aos sítios de inflamação. No entanto, uma compreensão mais profunda dos mecanismos moleculares envolvidos na adesão dos leucócitos desenvolveu-se somente na década passada. Moléculas de adesão específicas, que são expressas nos leucócitos, plaquetas, e células endoteliais, participam deste processo (ASIMAKOPOULOS & TAYLOR, 1998).

O envolvimento dos neutrófilos, dos monócitos e das células endoteliais na reação inflamatória após CEC ocorre após ativação dessas células (MILLER & LEVY, 1997). A ativação tem sido definida como a aquisição de novas funções por estas células, como a síntese de níveis elevados de certas proteínas, bem como a habilidade de aderência entre si (POBER & COTRAN, 1990). Subseqüentemente, os neutrófilos e os monócitos migram através das células endoteliais, deixando o espaço intravascular e liberando toxinas que provocam lise celular e tecidual. Os mediadores inflamatórios humorais exercem papéis proeminentes em iniciar e perpetuar essas interações dos neutrófilos com as células endoteliais (MILLER & LEVY, 1997).

2.9.1 Aderência dos neutrófilos e monócitos às células endoteliais

Um passo inicial no dano tecidual é a aderência dos neutrófilos e dos monócitos ao endotélio vascular (BOLDT et al., 1995), que depende de uma redução das forças dinâmicas e da expressão de moléculas de adesão de superfície específicas para cada uma dessas células. Uma diminuição nas forças dinâmicas que impulsionam os neutrófilos e os monócitos através dos vasos, secundária ao extravasamento de líquido, é vista mais marcadamente nas vênulas pós-capilares e permite aumento do contato dos neutrófilos e monócitos com as células endoteliais, facilitando a adesão entre eles (POBER & COTRAN, 1990). Diferentes alterações das células endoteliais produzidas como resultado da resposta inflamatória levam ao aumento da permeabilidade vascular. Uma contração reversível e de curta duração das células endoteliais ocorre rapidamente após o processo inflamatório ter se iniciado como resultado das ações da trombina, da histamina (ambas por ativação de contato e pelas cascatas do C) e dos LT (especialmente LTC₄). Subseqüentemente, o citoesqueleto das células endoteliais é alterado pelas ações do TNF- α e da IL-1, a nível de mensageiros nucleares. Isso produz um espaço aumentado na junção das células endoteliais, acentuando o grau de permeabilidade vascular. Finalmente, as células endoteliais são danificadas por enzimas proteolíticas e radicais tóxicos do oxigênio liberados por neutrófilos ativados (MILLER & LEVY, 1997). Isso leva à retração permanente e lise das células endoteliais e, posteriormente, aumenta o extravasamento de líquido das vênulas (POBER & COTRAN, 1990).

2.9.2 Moléculas de adesão e seus receptores solúveis

A adesão real dos neutrófilos e monócitos às células endoteliais é promovida pela expressão de moléculas de adesão específicas nas superfícies dessas células (SPRINGER, 1990; BOLDT et al., 1995; ASIMAKOPOULOS & TAYLOR, 1998; KALAWSKI et al., 1998). Através dessa ligação, um processo fisiopatológico complexo é ativado, resultando em dano microvascular importante e conseqüente dano tecidual (BOLDT et al., 1995; KALAWSKI et al., 1998). Três famílias de receptores de adesão foram identificadas: a família selectina (expressa tanto nos neutrófilos, quanto nas células endoteliais), a família integrina (expressa somente nos leucócitos), e a superfamília imunoglobulina (expressa nas células endoteliais e nos leucócitos) (SPRINGER, 1990; ASIMAKOPOULOS & TAYLOR, 1998; KALAWSKI et al., 1998). Para facilitar a adesão entre os neutrófilos e as células endoteliais, cada um desses receptores se liga a um contra-receptor, chamado de ligante na célula oposta a fim de manter as células unidas (MILLER & LEVY, 1997).

O processo resumido descreve uma série de eventos que agem seqüencialmente para levar ao acúmulo de leucócitos inflamatórios: 1) rolar dos leucócitos, mediado pelas selectinas; 2) ativação de leucócitos, induzida pelos quimiotáticos; e 3) adesão firme dos leucócitos ativados às células endoteliais e plaquetas estimuladas, mediada pelas integrinas e pelas proteínas da superfamília imunoglobulina (GILLILAND et al., 1999). Tal processo está representado esquematicamente na figura 2. No entanto, cada um dos passos acima pode ser individualmente regulado, com diferentes células expressando receptores para diferentes agonistas. Isso fornece potencial ao sistema para o recrutamento seletivo de leucócitos

(CELI et al., 1997). A representação esquemática da interação dos leucócitos com as células endoteliais encontra-se na figura 2.

Além das moléculas ligadas à membrana, subformas solúveis e ainda potencialmente ativas de várias moléculas de adesão têm sido encontradas (GEARING & NEWMAN, 1993; BOLDT et al., 1995; GEORGE et al., 1997; BLUME et al., 1997). Mudanças na concentração dessas moléculas de adesão solúveis circulantes têm sido verificadas como possíveis marcadores da extensão do dano vascular (BLUME et al., 1997; GRÜNENFELDER et al., 2000) e da doença inflamatória (BOLDT et al., 1995). Tais moléculas foram previamente medidas em pacientes com uma ampla variedade de doenças associadas com inflamação sistêmica, incluindo sepse, doença pulmonar aguda e diabetes melito insulino-dependente (BLUME et al., 1997). Em pacientes adultos sépticos foram descritas como marcadores de prognóstico (GEARING & NEWMAN, 1993; COWLEY et al., 1994). O aumento dos níveis plasmáticos das moléculas de adesão solúveis pode resultar tanto de um aumento da expressão das células endoteliais ativadas e subsequente aumento da liberação no sangue circulante, do aumento da quebra proteolítica das formas ligadas ao endotélio, secundário ao dano celular endotelial, ou de ambas (GEARING & NEWMAN, 1993; BOLDT et al., 1998; ; GRÜNENFELDER et al., 2000).

2.9.2.1 Selectinas

As selectinas são um grupo de receptores glicoproteicos expressos tanto nos leucócitos quanto nas células endoteliais (ASIMAKOPOULOS & TAYLOR, 1998), que auxiliam a regular a ligação dos leucócitos ao endotélio nos sítios de inflamação (SPRINGER, 1990).

O contato inicial na cascata de adesão leucocitária é feito através do chamado rolar inicial dos leucócitos (CELI et al., 1997) e da sua ligação frouxa ao endotélio sob fluxo hemodinâmico, realizado pelas selectinas (BOYLE et al., 1996). As selectinas compõem um grupo de três moléculas que estão relacionadas intimamente em estrutura e função. São elas: selectina-leucocitária (L) (CD62L) ou molécula de adesão leucocitária (LAM)-1, selectina-E (CD62E) ou molécula de adesão leucócito-endotelial (ELAM)-1 e selectina-P (CD62P) (CELI et al., 1997; ASIMAKOPOULOS & TAYLOR, 1998; KAPLANSKI et al., 1998). Aumentos específicos dos níveis de selectinas e expressão celular aumentada têm sido observados de forma variável durante cirurgias cardíacas (GILLINOV et al., 1993; BOLDT et al., 1995; BURNS et al., 1995; OSMER & LINKE, 1996).

2.9.2.1.1 Selectina-L

A selectina-L é encontrada na superfície da maioria dos neutrófilos, monócitos e linfócitos circulantes humanos (GEARING & NEWMAN, 1993; BEVILACQUA et al., 1994) e participa na iniciação da adesão desses leucócitos ao endotélio ativado (KALAWSKI et al., 1998). A expressão de selectina-L aumenta transitoriamente após a ativação dos leucócitos (BEVILACQUA & NELSON, 1993). O grau de expressão de selectina-L no leucócito serve como um bom marcador de ativação. Os estudos mostram que a expressão de selectina-L na superfície leucocitária aumenta ou permanece inalterada durante a CEC (LE DEIST et al., 1995; GALINANES et al., 1996). Como a expressão de selectina-L na superfície celular aumenta e subseqüentemente diminui durante a ativação leucocitária, é provável que diversos investigadores tenham analisado os leucócitos nos seus estudos, em diferentes estágios de ativação (ASIMAKOPOULOS & TAYLOR, 1998).

A selectina-L solúvel circula em pelo menos duas isoformas: uma de 62 KDa e outra de aproximadamente 75-100 KDa. Parecem representar o mesmo fragmento, embora sejam diferentemente glicosiladas e derivadas de linfócitos e neutrófilos, respectivamente. No entanto, as formas livres das moléculas são bioativas e, quando em grande concentração, podem inibir essencialmente toda a adesão mediada pela selectina-L. Em concentrações fisiológicas, a selectina-L solúvel pode causar aproximadamente 15-20% de inibição da ligação do linfócito ao endotélio (GEARING & NEWMAN, 1993).

2.9.2.1.2 Selectina-P

A selectina-P é uma glicoproteína armazenada nas plaquetas e nas células endoteliais que pode rapidamente alcançar a superfície celular sob ativação após uma variedade de estímulos, entre eles trombina, histamina e componentes terminais do complemento (GEARING & NEWMAN, 1993; BEVILACQUA et al., 1994; CELI et al., 1997). A selectina-P sustenta a ligação dos leucócitos às plaquetas e às células endoteliais (ASIMAKOPOULOS & TAYLOR, 1998), podendo sua expressão ser induzida pelas citocinas pró-inflamatórias IL-1 e TNF- α (BEVILACQUA et al., 1994). Há evidências de que a selectina-P participa no dano tecidual cardíaco mediado pelos neutrófilos causado por isquemia miocárdica e de que a neutralização da selectina-P resulta em melhor recuperação da função cardíaca após um período de isquemia (ASIMAKOPOULOS & TAYLOR, 1998). Mudanças nas plaquetas, como degranulação e defeito funcional, ocorrem durante a CEC, assim como algum grau de ativação plaquetária, resultando em expressão aumentada da selectina-P na superfície das plaquetas. A expressão de selectina-P aumenta

precocemente (RINDER et al., 1994), enquanto que as concentrações plasmáticas de selectina-P solúveis aumentam perto do fim da CEC em pacientes adultos e pediátricos (KOMAI & HAWORTH, 1994; PEYNET et al., 1995), podendo estar relacionadas à evolução clínica em crianças (LOTAN et al., 2001). A selectina-P durante a CEC promove ativação plaquetária (ASIMAKOPOULOS & TAYLOR, 1998).

A selectina-P é encontrada no plasma de indivíduos normais, e parece ser aproximadamente 3 KDa menor que a selectina-P nativa. Há, no entanto, sugestão de um possível papel anti-inflamatório para essa molécula (GEARING & NEWMAN, 1993).

2.9.2.1.3 Selectina-E

A selectina-E é transitória e precocemente expressa no endotélio ativado e sustenta a adesão da maioria dos grupos de leucócitos (neutrófilos, monócitos, eosinófilos e alguns linfócitos) (SPRINGER, 1990; BEVILACQUA et al., 1994; KALAWSKI et al., 1998). É expressa em uma variedade de condições inflamatórias agudas e crônicas, sendo sua expressão induzida em resposta à IL-1, ao TNF- α , aos LPS e à endotoxina bacteriana (KALAWSKI et al., 1998; LAWSON et al., 1999). Ela medeia a adesão dos neutrófilos de forma diferente daquela utilizada pelas integrinas e, como a selectina-L, funciona em um estágio precoce da ligação do neutrófilo ao endotélio (SPRINGER, 1990; PARET et al., 2000). Um estudo de pacientes pediátricos revelou que a indução do RNAm da selectina-E ocorre em tecidos cardíacos e não cardíacos durante a CEC (KILBRIDGE et al., 1994).

Devido a sua mínima expressão nas células endoteliais em repouso, aumentos de selectina-E no endotélio e de sua forma solúvel são marcadores adequados da ativação endotelial (PARET et al, 2000). A selectina-E solúvel no sangue é biologicamente ativa quando medida pela sua habilidade em mediar adesão dos neutrófilos a uma superfície (GEARING & NEWMAN, 1993). Níveis de selectina-E solúvel são liberados na circulação periférica, obtendo picos de concentração entre 6-12 horas após CEC (LIEBOLD et al., 1999). O mecanismo de liberação de selectina-E solúvel não foi estabelecido (GEARING & NEWMAN, 1993).

Após o seu rolar inicial, os leucócitos aderem firmemente ao endotélio inflamado. Esse processo envolve interações adesivas entre as integrinas e os integrantes da superfamília imunoglobulina (CELI et al., 1997).

2.9.2.2 Integrinas

As integrinas constituem o maior grupo de receptores de adesão e são encontradas na maioria dos tipos celulares, incluindo leucócitos. Elas são proteínas de superfície celular, com uma porção transmembrana, que respondem a sinais de ativação celular e medeiam sua função através da sua união a ligantes específicos (STEWART et al., 1995). Cada integrina contém uma subunidade α e β associada com estrutura característica (SPRINGER, 1990; STEWART et al., 1995; CELI et al., 1997; MILLER & LEVY, 1997). Esses receptores são responsáveis por interações célula-célula e célula-matriz e, como o nome integrina denota, elas integram o ambiente extracelular com o citoesqueleto

intracelular (MILLER & LEVY,1997). As integrinas são classificadas em subgrupos baseados na cadeia β (ASIMAKOPOULOS & TAYLOR, 1998), tendo sido identificadas seis subfamílias de integrinas ($\beta 1$ a $\beta 6$) (MILLER & LEVY,1997). Após a ativação leucocitária e o rolar dos leucócitos no endotélio por meio da expressão de selectinas, a ligação das integrinas aos seus ligantes endoteliais regula muitas respostas leucocitárias, incluindo a adesão firme ao endotélio, a migração em direção aos tecidos, a degranulação e a fagocitose (ASIMAKOPOULOS & TAYLOR, 1998). Uma vez ativadas, as integrinas se ligam a integrantes da superfamília imunoglobulina, cuja síntese pelo endotélio vascular pode ser estimulada durante o processo inflamatório (CELI et al., 1997). Níveis aumentados de integrinas têm sido identificados durante cirurgias cardíacas (GILLINOV et al., 1993; SAWA et al., 1996).

As integrinas- $\beta 1$, também conhecidas como integrinas do antígeno muito tardio (*very late antigen integrins* – VLA), são expressas em um amplo número de células (SPRINGER, 1990; ASIMAKOPOULOS & TAYLOR, 1998). Elas dividem a mesma cadeia β e são distinguidas através de diferentes subunidades. Os leucócitos expressam as integrinas- $\beta 1$ que contêm as subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ e $\alpha 6$ (ASIMAKOPOULOS & TAYLOR, 1998). A integrina $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4 ou CD49d) é de particular importância na interação leucócito-célula endotelial devido a sua habilidade em interagir com o ligante endotelial da molécula de adesão celular-vascular (VCAM)-1. A VLA-4 pode mediar o rolar de linfócitos e eosinófilos independentemente das selectinas, mas não é expressa nos neutrófilos (BEVILACQUA et al., 1994).

Os receptores na subfamília $\beta 2$ são chamados de integrinas dos leucócitos porque eles são expressos somente nos leucócitos e facilitam a adesão entre os leucócitos e outras células (SPRINGER, 1990; MILLER & LEVY, 1997). O grupo é composto por: LFA-1 (CD11a/CD18 ou $\alpha L\beta 2$), Mac-1 (CD11b/CD18 ou $\alpha M\beta 2$), P150,95 (CD11c/CD18 ou $\alpha X\beta 2$) e $\alpha D\beta 2$ (CELI et al., 1997). Mac-1 e LFA-1 têm um importante papel nos mecanismos fisiopatológicos associados com a resposta inflamatória (ASIMAKOPOULOS & TAYLOR, 1998). A LFA-1 (CD11a/CD18) funciona como um receptor para a ICAM-1 e a ICAM-2 e a Mac-1 também se liga a ICAM-1 (SPRINGER, 1990). As integrinas- $\beta 2$ são o grupo de integrinas mais extensivamente investigado em pacientes submetidos à CEC (ASIMAKOPOULOS & TAYLOR, 1998), estando sua expressão pelos neutrófilos aumentada durante a mesma, alcançando um pico aos 60 minutos (GILLINOV et al., 1993, 1994, 1994; ZEHR et al., 1995). A cadeia αM (CD11b) alcança seu pico de expressão dentro de 4 horas após descontinuação da CEC nos neutrófilos e após 24 horas nos monócitos (RINDER et al., 1992, 1994; Le DEIST et al., 1995; ERNOFSSON et al., 1997). O Mac-1 foi estabelecido como marcador de ativação leucocitária durante a CEC (ASIMAKOPOULOS & TAYLOR, 1998). A expressão da cadeia αX está aumentada nos neutrófilos e monócitos durante e logo após a CEC na maioria dos estudos (Le DEIST et al., 1995; ERNOFSSON et al., 1997), embora tenha permanecido sem modificações, ou mesmo diminuída, em outros estudos (ASIMAKOPOULOS & TAYLOR, 1998). A αL (CD11a) não tem expressão aumentada nos neutrófilos durante a CEC (Le DEIST et al., 1995).

2.9.2.3 Superfamília Imunoglobulina

As moléculas de adesão da superfamília imunoglobulina são glicoproteínas expressas principalmente pelas células endoteliais, participando na adesão celular como contra-receptores para certas integrinas dos leucócitos (CELI et al., 1997). São também expressas em células que são alvo para linfócitos T ativados. A superfamília imunoglobulina é constituída pela ICAM-1 (CD54), pela ICAM-2 e pela VCAM-1 (MILLER & LEVY, 1997).

A ICAM-1 e a ICAM-2 são os dois receptores de imunoglobulina que participam na adesão dos neutrófilos às células endoteliais e na migração extravascular dos neutrófilos (BEVILACQUA et al., 1994). A adesão dos neutrófilos às células endoteliais é um processo dinâmico e é promovido, em grande parte, pela estimulação dessas células por produtos das cascatas inflamatórias humorais (MILLER & LEVY, 1997).

2.9.2.3.1 Molécula de adesão intercelular-1

A ICAM-1 é expressa na superfície de vários tipos celulares, incluindo leucócitos e células endoteliais (LAWSON et al., 1999). No endotélio vascular, a ICAM-1 está presente em níveis baixos sob condições normais e a sua expressão é dramaticamente estimulada após ativação das células endoteliais por TNF- α , IL-1, interferon- γ , endotoxina ou LPS (SPRINGER, 1990; SHIMIZU et al., 1992; DAVIES & HAGEN, 1993; KILBRIDGE et al., 1994; KAPLANSKI et al., 1998; KALAWSKI et al., 1998; LAWSON et al., 1999),

tendo seu pico aproximadamente 1-2 horas após exposição a essas substâncias e permanecendo assim por mais de 24 horas (KILBRIDGE et al., 1994; MILLER & LEVY, 1997). No endotélio, a ICAM-1 tem um importante papel na migração dos leucócitos aos sítios de inflamação, permitindo a adesão firme e a diapedese dos leucócitos via interação com seus ligantes (KALAWSKI et al., 1998; LAWSON et al., 1999). Os ligantes da ICAM-1 são os receptores integrinas ligados à membrana LFA-1 (CD11a,CD18) e Mac-1 (CD11b,CD18) nos leucócitos, assim como fibrinogênio, hialurônio, P150,95, CD43, rinovírus e eritrócitos infectados com *Plasmodium falciparum* (KILBRIDGE et al., 1994; CELI et al., 1997; GEORGE et al., 1997; KALAWSKI et al., 1998; LAWSON et al., 1999). A ligação da ICAM-1 na superfície de células endoteliais humanas em repouso leva à expressão de VCAM-1 (LAWSON et al., 1999).

SETH et al. (1991) foram os primeiros a demonstrar a presença de ICAM-1 solúvel no soro humano em 1991, através do uso de método de identificação imunológica que utiliza eletroforese em gel (*Immunoblotting*). Rothlein et al. (1991), no mesmo ano, confirmaram este achado por meio da utilização do método de ensaio enzimático imunoabsorvente quantitativo (*enzyme-linked immunosorbent assay* – ELISA). Os níveis de ICAM-1 estão elevados na inflamação, na infecção e em cânceres, bem como em pacientes com infecção por HIV (*human immunodeficiency virus*) (GEARING & NEWMAN, 1993).

Níveis plasmáticos pré-operatórios de ICAM-1 solúvel têm variado muito em pacientes submetidos a cirurgias cardíacas. Os níveis diminuem imediatamente após clampeamento da aorta (BOLDT et al., 1995, 1995), possivelmente devido a sua ligação aos leucócitos ativados e aumenta significativamente 24 horas após a cirurgia (ASIMAKOPOULOS &

TAYLOR, 1998). Alguns investigadores não demonstraram qualquer aumento nos níveis plasmáticos pós-operatórios de ICAM-1 (GILLINOV et al., 1993; BOLDT et al., 1995; CREMER et al., 1996; LIEBOLD et al., 1999). Revestimento com heparina, hipotermia a 28°C, dose elevada de aprotinina e o uso de oxigenador de membrana ou de bolhas falharam em influenciar a concentração plasmática de ICAM-1 durante a CEC (BOLDT et al., 1995).

2.9.2.3.2 Molécula de adesão intercelular-2

A ICAM-2 é uma molécula não induzível, expressa por células endoteliais e plaquetas, que se liga à LFA-1 (SHIMIZU et al., 1992; GEORGE et al., 1997; CELI et al., 1997). A expressão da ICAM-2 aparentemente não se modifica em função das citocinas inflamatórias (BEVILACQUA et al., 1994). A ICAM-2 parece não existir na forma solúvel (ROTHLEIN et al., 1991).

2.9.2.3.3 Molécula de adesão celular-vascular-1

Células endoteliais não estimuladas expressam muito pouca VCAM-1 de superfície celular (SHIMIZU et al., 1992; LI et al., 1993; KALAWSKI et al., 1998). Durante exposição aos agentes pró-inflamatórios, no entanto, essa molécula de adesão torna-se proeminentemente expressa pelas células endoteliais. Os agonistas que induzem a expressão de VCAM-1 na superfície endotelial são: IL-1 β , IL-4, TNF- α (SHIMIZU et al., 1992; LI et al., 1993), LPS e endotoxina, sustentando a adesão dos linfócitos, monócitos e eosinófilos através da

interação com seu contra-receptor, a integrina $\alpha 4\beta 1$ (CD49d/CD29, VLA4) (CRONSTEIN & WEISSMANN, 1993; BEVILACQUA et al., 1994; CELI et al., 1997; GEORGE et al., 1997; LAWSON et al., 1999; LEY & HUO, 2001; CYBULSKY et al., 2001).

Embora a VCAM-1 seja estruturalmente semelhante à ICAM-1 e a outras moléculas de adesão, o seu padrão de regulação é único. Sua expressão é rapidamente induzida por condições pró-ateroescleróticas em coelhos, camundongos e humanos (LEY & HUO, 2001). Estudos prévios sugeriram um papel importante da VCAM-1 na iniciação do processo de aterosclerose (LI et al., 1993; LEY & HUO, 2001; CYBULSKY et al., 2001). Além da formação de lesões ateroscleróticas, a VCAM-1 provavelmente também seja importante na formação da neoíntima após dano arterial. Isto porque esta molécula facilita a infiltração dos monócitos nas artérias danificadas, ou porque ela diretamente aumenta a proliferação de células musculares lisas (LEY & HUO, 2001).

Os níveis de VCAM-1 estão elevados no soro de pacientes com câncer e com doenças inflamatórias (CRONSTEIN & WEISSMANN, 1993; GEARING & NEWMAN, 1993), bem como em pacientes apresentando rejeição a transplantes cardíacos (TAYLOR et al., 1992). Níveis médios de VCAM-1 correspondem a 431-504 ng/ml em indivíduos normais (GEARING & NEWMAN, 1993). A VCAM-1 solúvel mostrou níveis plasmáticos aumentados 24 horas após CEC em um estudo com pacientes adultos (BOLDT et al., 1995) e níveis diminuídos intraoperatoriamente em um estudo pediátrico (BOLDT et al., 1995) realizado pelos mesmos investigadores.

3) RACIONALIZAÇÃO DO PRESENTE ESTUDO

Estudos em animais sugerem que, seguindo a expressão de moléculas de adesão, os neutrófilos e monócitos ativados podem ser amplamente responsáveis pelo dano pulmonar (GILLINOV et al., 1994, 1994), bem como pela injúria miocárdica por isquemia-reperfusão (YOUKER et al., 1994). A ativação dos neutrófilos e dos monócitos durante cirurgias cardíacas pode, parcialmente, explicar achados como alterações na ventilação-perfusão (TONZ et al., 1995) e dano endotelial após cirurgia cardíaca (HALL et al., 1997).

Níveis elevados de moléculas de adesão solúveis, como a ICAM-1, por exemplo, são encontrados em pacientes com várias síndromes inflamatórias, entre elas, choque séptico, deficiência de adesão dos leucócitos, câncer, transplantes (GEARING et al., 1992), dano pulmonar agudo e diabetes melito insulino-dependente (BLUME et al., 1997). O estudo realizado por SESSLER et al. (1993), comparou níveis plasmáticos de ICAM-1 solúvel em pacientes com diagnóstico de sepse, sepse severa e choque séptico. As concentrações desta molécula foram marcadamente mais elevadas em pacientes com sepse fatal, do que em pacientes com sepse que sobreviveram. Os autores verificaram, assim, uma correlação prognóstica positiva entre concentrações plasmáticas de ICAM-1 solúvel maiores que 1000 ng/ml e taxa de óbitos. Os mesmos autores demonstraram uma correlação positiva entre níveis aumentados de ICAM-1 solúvel e ocorrência de dano a órgãos-alvo em pacientes com choque séptico (SESSLER, et al., 1995). ENDO et al. (1995), confirmaram o valor prognóstico de níveis plasmáticos elevados de ICAM-1 solúvel em pacientes com FMO.

Estudos mostraram que níveis plasmáticos de ICAM-1 solúvel aumentam não somente após exposição aguda das células endoteliais a citocinas pró-inflamatórias, mas também em muitas doenças crônicas do sistema cardiovascular. TSUTAMOTO et al. (1995) descreveram que, em pacientes com insuficiência cardíaca congestiva crônica, as concentrações plasmáticas de ICAM-1 solúvel aumentam com a severidade da doença e diminuem, posteriormente, após tratamento que apresente melhora dos sintomas.

Níveis plasmáticos de ICAM-1 solúvel têm sido descritos como tendo valor prognóstico após transplante cardíaco (BALLANTYNE et al., 1992). GEORGE et al. (1997) verificaram que os valores de VCAM-1 solúveis podem ser marcadores potenciais não invasivos para rejeição precoce a transplante cardíaco em adultos.

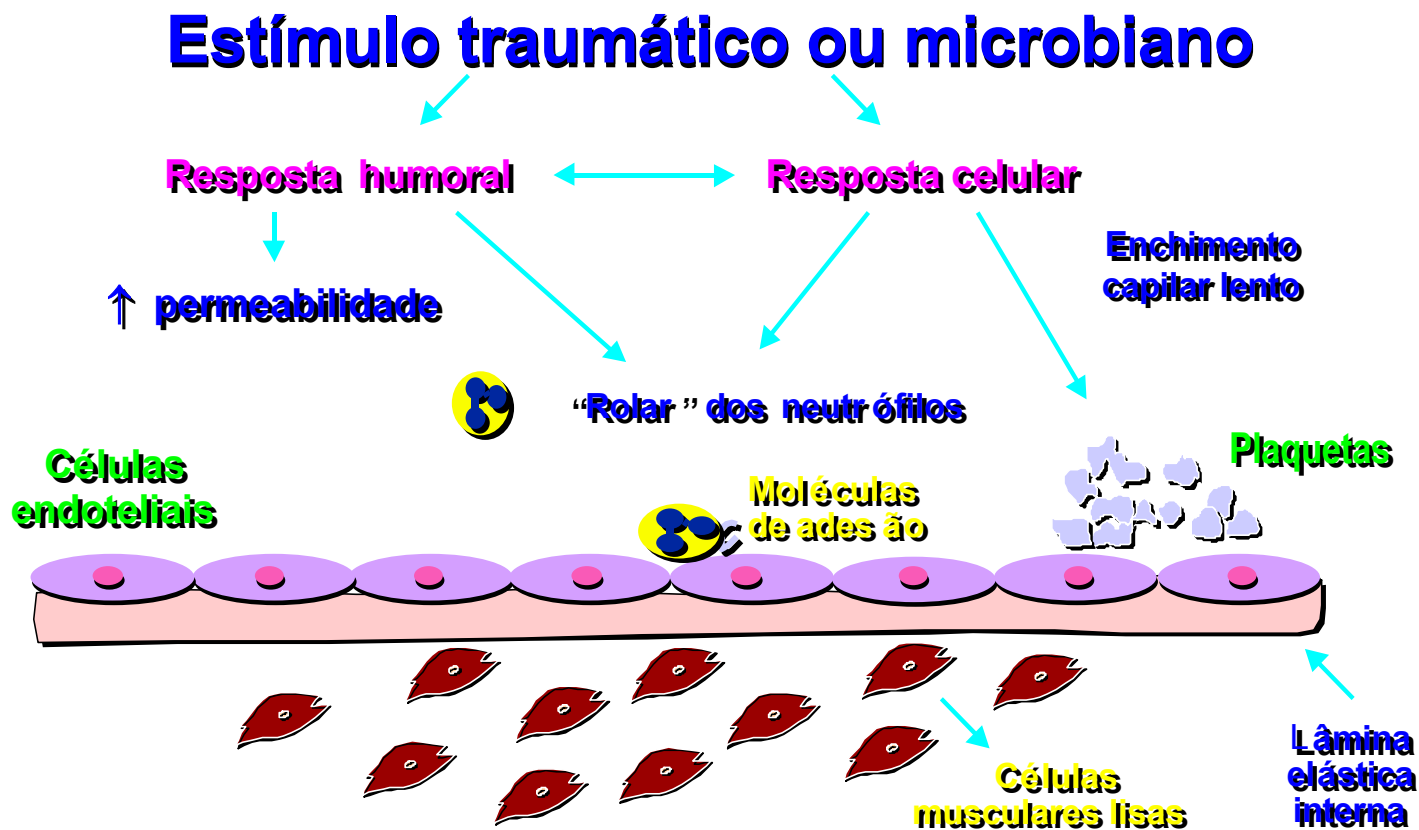
BOLDT et al. (1995) verificaram que pacientes adultos submetidos a cirurgias cardíacas eletivas apresentavam diminuição significativa dos níveis de ICAM-1 e VCAM-1 durante CEC, com retorno aos valores basais e com valores acima dos basais de ICAM-1 e VCAM-1, respectivamente, no período pós-operatório. Outros estudos mostraram que pacientes adultos submetidos a cirurgias cardíacas apresentam níveis plasmáticos aumentados de moléculas de adesão solúveis após CEC (BOLDT et al., 1998; GALEA et al, 1998; GRÜNENFELDER et al., 2000, 2000). KALAWSKI et al. (1998) verificaram que a reperfusão do miocárdio isquêmico durante cirurgia de revascularização miocárdica resulta em aumento significativo dos níveis plasmáticos de ICAM-1 e de VCAM-1.

TÀRNOK et al. (1999) analisaram os níveis de selectina-E e de ICAM-1 solúveis em crianças submetidas à cirurgia cardíaca com e sem uso de CEC, tendo verificado

diminuição destes níveis durante a CEC que não alcançaram os valores basais posteriormente. BOLDT et al. (1995) encontraram resultados semelhantes a este estudo em crianças com menos de 5 anos de idade submetidas à cirurgia cardíaca com uso de CEC. BLUME et al. (1997) avaliaram os níveis séricos das moléculas de adesão solúveis durante e após CEC em crianças e adolescentes cardiopatas submetidos a cirurgias cardíacas e a associação destes níveis com variáveis peri-operatórias. Foi evidenciado um aumento nos valores de ICAM-1 e VCAM-1 solúveis nas primeiras 6 horas, os quais permaneceram elevados durante 42 horas. Além disso, os níveis das moléculas de adesão solúveis após CEC modificaram-se mais significativamente em pacientes com o maior potencial para ocorrência de dano vascular: jovens, cianóticos, com longos períodos de CEC e de curso pós-operatório.

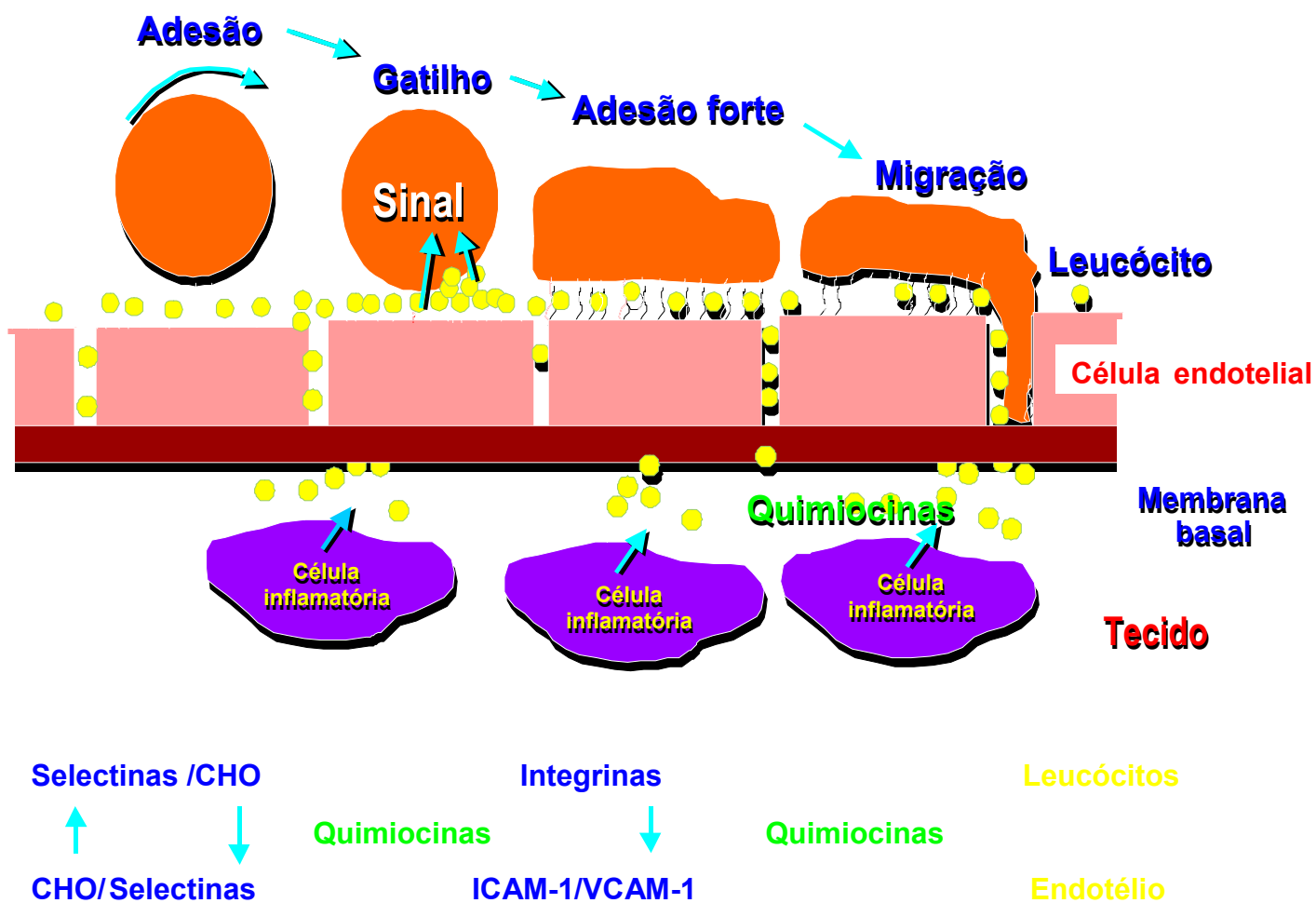
O fato de muitos pacientes se recuperarem com sucesso após CEC, apesar da resposta inflamatória maciça, sugere que as respostas aos estímulos inflamatórios variam individualmente. Isto demonstra a reserva fisiológica corporal e as vias inibitórias que previnem a disseminação do dano aos órgãos após cirurgias cardíacas (KIRKLIN, 1991). Recentemente, no entanto, tem sido verificado um número aumentado de pacientes submetidos a cirurgias cardíacas com uma reserva fisiológica limitada. Neonatos e lactentes, assim como idosos e aqueles que requerem longos períodos de CEC, são especialmente suscetíveis aos efeitos sistêmicos do dano celular endotelial (KIRKLIN, 1991; BOYLE et al., 1997). Sendo assim, o entendimento dos mecanismos biológicos envolvidos é fundamental para a descoberta de novas terapias para modular o efeito deletério causado pela CEC (BOYLE et al., 1997).

Há poucos dados na literatura relacionados ao comportamento das moléculas de adesão solúveis após cirurgia cardíaca com uso de CEC em lactentes, bem como às diferenças entre os perfis plasmáticos destas moléculas nos trabalhos identificados. Além disso, o significado da presença de moléculas de adesão endotelial solúveis no plasma ainda não é completamente conhecido (ASIMAKOPOULOS & TAYLOR, 1998), podendo suas variações no período pós CEC estar relacionadas a variáveis pré-operatórias, ao manejo intra-operatório da técnica de CEC e ao período pós-operatório, como já evidenciado em alguns estudos.



(Adams et al. – Br J Anaesth 1996;77:17-31)

Figura 1. A resposta inflamatória e o endotélio



(Adams et al. – Br J Anaesth 1996;77:17-31)

Figura 2. A resposta inflamatória e as moléculas de adesão

HIPÓTESE

Os níveis plasmáticos das moléculas de adesão solúveis ICAM-1 e VCAM-1 são aumentados em lactentes com defeitos cardíacos congênitos e variam após a sua exposição ao circuito de CEC, quando submetidos à cirurgia cardíaca para correção destes defeitos.

OBJETIVOS

1. Mensurar os níveis plasmáticos das moléculas de adesão solúveis ICAM-1 e VCAM-1 em condições basais e após exposição ao circuito de CEC em lactentes submetidos à cirurgia cardíaca para correção de defeitos cardíacos congênitos.
2. Comparar os níveis plasmáticos das moléculas de adesão solúveis ICAM-1 e VCAM-1 em condições basais e após exposição ao circuito de CEC entre lactentes acianóticos e cianóticos submetidos à cirurgia cardíaca para correção de defeitos cardíacos congênitos.
3. Observar os desfechos clínicos dos pacientes incluídos no estudo, relacionando-os com os níveis das moléculas de adesão solúveis ICAM-1 e VCAM-1.

PACIENTES E MÉTODOS

1. População em Estudo

A população recrutada para este estudo incluiu lactentes (com mais de 30 dias de vida e menos de 1 ano de idade) submetidos à cirurgia cardíaca para correção de cardiopatia congênita no Hospital São Francisco do Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, durante o período de junho de 1998 a março de 1999.

Não foi realizado cálculo de tamanho de amostra, pois não há na literatura dados e estudos suficientes para estabelecermos tal quantificação. Além disso, todos os estudos existentes incluíram um número bastante pequeno de pacientes em suas análises.

2. Delineamento – Estudo de coorte contemporânea.

Em relação ao objetivo de comparar a evolução das moléculas de adesão em pacientes acianóticos e cianóticos, o fator em estudo foi o tipo de cardiopatia, tendo sido os valores das moléculas considerados desfechos.

Para a análise da evolução dos pacientes, os níveis plasmáticos das moléculas de adesão são os fatores em estudo e os desfechos considerados foram mortalidade e complicações pós-operatórias.

3. Seleção da Amostra

3.1 Critérios de inclusão

- (A) Cirurgia a céu aberto.
- (B) Uso de circulação extracorpórea.
- (C) Consentimento informado assinado pelos pais ou responsáveis legais dos pacientes.

3.2 Critérios de exclusão

- (A) Óbito transoperatório.
- (B) Reoperação na mesma internação.
- (C) Presença de causas pré-existentes conhecidas de dano vascular, tais como parada cardíaca recente, sepse, história de vasculite e/ou hipotensão severa recente.

4. Manejo Intra-operatório

A anestesia foi induzida com fentanil (10µg/Kg), midazolam (100-200µg/Kg) e pancurônio (0,08mg/kg). A manutenção anestésica foi efetuada com estas mesmas medicações, em infusão contínua intravenosa. Cefazolina foi administrada durante a indução anestésica, na dose de 40mg/kg. Circulação extracorpórea convencional foi utilizada, com um episódio de clampeamento aórtico e uma única dose de cardioplegia. Após administração de heparina (5mg/kg), as crianças foram submetidas à CEC em uma taxa de fluxo de perfusão de 2,4

litros/m²/minuto com hipotermia moderada a profunda (28°C e 18°C, respectivamente). O clampeamento da aorta foi realizado seguido pela infusão de solução cardioplégica sangüínea fria. O equipamento de circulação extracorpórea consistiu de uma bomba *roller* não pulsátil, com um oxigenador de membrana Lucchese 0,25 ou 0,50 e um reservatório de cardiostomia venosa Braile (Braile Biomédica, São Paulo, SP, Brasil). Durante a CEC, o hematócrito do paciente foi mantido em valores entre 19 e 26%. Nitroprussiato de sódio foi infundido durante o período de resfriamento e interrompido no período de reaquecimento, quando a temperatura do paciente estava em 36°C. Durante e após a cirurgia, todos os pacientes receberam concentrado de hemáceas e cristalóides ou soluções colóides para suplementar o volume de sangue circulante. Os pacientes eram retirados do circuito de CEC e prontamente se iniciava uma solução de dopamina em infusão contínua na taxa de 5µg/Kg/minuto.

5. Coleta das Amostras

Amostras sangüíneas (volume=1ml) foram coletadas da via arterial de cada paciente e colocados em frascos contendo etilenodiaminotetraacetato (EDTA) para a dosagem das moléculas de adesão solúveis ICAM-1 e VCAM-1. Imediatamente após a coleta, as amostras foram levadas ao laboratório central do Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre, onde foram centrifugadas por 15 minutos a uma velocidade de 2000 rotações por minuto. O plasma foi pipetado e, logo após, armazenado em duplicata em tubos eppendorf® (volume=0,3ml/eppendorf®) e congelado a 20°C negativos para posterior análise. As amostras foram coletadas nos seguintes momentos:

- Indução anestésica.
- Término da CEC.
- 8 horas após término da CEC.
- 26 horas após término da CEC.

6. Quantificação das Moléculas de Adesão Solúveis

As amostras foram descongeladas simultaneamente. A dosagem plasmática das moléculas de adesão foi realizada através do método de ELISA em conjuntos produzidos para uso em pesquisa e comercializados pela R&D Systems, (Minneapolis, MN, EUA).

Os valores esperados em indivíduos aparentemente hígidos fornecidos pelo fabricante dos conjuntos de dosagem utilizados neste estudo são:

- ICAM-1 solúvel: 211 ng/ml (115 a 306 ng/ml – 2 desvios-padrão).
- VCAM-1 solúvel: 553 ng/ml (395 a 714 ng/ml – 1 desvio-padrão).

O método de ELISA consiste de uma reação imunoenzimática que envolve uma reação simultânea entre uma substância ou mediador presente na amostra ou solução padrão com anticorpos específicos pré-colocados na superfície das valetas das placas, formando uma ligação entre as duas substâncias (conjugado). O material que não se liga na reação é retirado por aspiração e lavagem. A quantidade de substância ligada em cada valeta é detectada através de uma reação com substrato específico por uma enzima, produzindo coloração proporcional à quantidade de conjugado da amostra ou solução padrão. O produto que adquire cor é quantificado por fotometria. A concentração presente em cada

amostra é obtida pela interpolação dos resultados da densidade óptica da amostra em uma equação polinomial, gerada a partir da curva padrão, realizada com diferentes concentrações conhecidas da substância de interesse. A curva padrão e as análises das amostras foram executadas em duplicata para diminuir a variabilidade do método. Os valores plasmáticos das moléculas analisadas representam a média dos valores das duplicatas. A execução dos ensaios de ELISA para ICAM-1 solúvel e VCAM-1 solúvel foi realizada no Laboratório de Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo autor, com a supervisão técnica do Dr. Jarbas Oliveira, sob mascaramento, ou seja, sem conhecimento da identidade das amostras ou de sua origem.

As curvas *standard*, usando moléculas recombinantes purificadas, revelaram sensibilidade consistente e rígida reprodutibilidade das duplicatas, bem como confiabilidade entre os *kits* utilizados para análise de ambas moléculas. Todas as amostras de cada indivíduo foram dosadas no mesmo prato (*wellplate*) de 96 amostras. A sensibilidade da análise para VCAM-1 solúvel é menor que 2,0 ng/ml e para ICAM-1 solúvel é menor que 0,35 ng/ml. Concentrações inferiores ao limite de detecção foram consideradas iguais ao nível mais baixo de detecção.

7. Obtenção dos Dados dos Pacientes

Os dados dos pacientes foram coletados pelo próprio pesquisador. Dados demográficos, história clínica e variáveis objetivas (saturação de oxigênio, exames laboratoriais) foram obtidos pré-operatoriamente. Informações adquiridas no transoperatório incluem manejo da perfusão, tipo de anestésicos, inotrópicos, antibióticos e demais fármacos utilizados, bem

como reparo cirúrgico realizado. Dados pós-operatórios, tais como período de intubação, uso de inotrópicos, medidas hemodinâmicas, evolução clínica e exames laboratoriais, foram obtidos retrospectivamente através da revisão dos prontuários médicos destes pacientes.

Os pacientes foram classificados, de acordo com o uso de medicações inotrópicas em três grupos: 1) Usuários de somente uma droga vasoativa: Dopamina; 2) Usuários de duas drogas vasoativas: Dopamina e Milrinone; e 3) Usuários de três drogas vasoativas: Dopamina, Milrinone e uma terceira droga.

As variáveis hemodinâmicas analisadas foram frequência cardíaca (FC), pressão arterial média (PAM), pressão da artéria pulmonar (PAP), pressão de átrio esquerdo (PAE) e pressão venosa central (PVC).

Os exames laboratoriais avaliados incluíram hematócrito, hemoglobina, plaquetas e níveis séricos de lactato.

As complicações pós-operatórias incluíram presença de infecção, arritmia, uso de marca-passo (MP) transitório, FMO, parada cardiorrespiratória (PCR), insuficiência renal aguda (IRA), crise convulsiva e hipertensão pulmonar (HP). Para o diagnóstico de infecção foram considerados: 1) síndrome séptica/choque séptico: sinais clínicos e laboratoriais e/ou hemoculturas positivas; 2) pneumonia: achados radiológicos; e 3) infecção urinária: urocultura positiva coletada por punção suprapúbica. Para as demais complicações utilizou-se os critérios de definição atualmente aceitos pela literatura mundial.

8. Análise Estatística dos Dados

Todas as informações foram armazenadas em um banco de dados elaborado para este estudo com o auxílio do programa Excel e posteriormente convertido para análise no programa *Statistics Package for Social Science* (SPSS) versão 8.0.

As variáveis foram descritas sob a forma de médias e desvios-padrão para as variáveis contínuas com distribuição normal, ou com medianas e amplitude quando indicado. As variáveis categóricas foram descritas sob a forma de proporções. Foram elaboradas tabelas de frequência para todas as variáveis, com identificação de erros de amplitude ou digitação. Foi elaborada uma nova variável, chamada de delta, a fim de avaliar a diferença entre o último e o primeiro momento da coleta das moléculas de adesão. Para análise da evolução dos níveis séricos das moléculas de adesão nos diferentes momentos foi utilizada a Análise de Friedman para amostras pareadas. Para comparação das médias obtidas no estudo com aqueles valores normais relatados na literatura foi utilizado o teste t para uma amostra. Para comparação das médias entre dois grupos (acianóticos e cianóticos, óbitos e alta, portadores ou não da síndrome de Down) foi utilizado o teste t de Student ou o teste de Mann Whitney. As variáveis categóricas foram analisadas através da utilização dos testes do qui quadrado ou de Fischer. Coeficientes de correlação de Pearson foram calculados para avaliar a associação entre os níveis das moléculas e outras variáveis contínuas (lactato) e de Spearman para os tempos (tempo de internação, de intubação, de circulação extracorpórea e de clampeamento da aorta). Foi elaborada uma curva de sobrevida com o método de Kaplan-Meier para representar a frequência de desfechos em função do tempo de acompanhamento. Para todas as comparações foi considerado um alfa de 0,05.

9. Considerações éticas

O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética e Pesquisa do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e pela Comissão de Ética e Pesquisa do Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre. Os pais ou responsáveis legais pelos pacientes foram informados da finalidade do estudo e, após concordância verbal, assinaram o termo de consentimento informado (ANEXO I).

RESULTADOS

1. Características Clínicas da Amostra

No período de junho de 1998 a março de 1999 foram realizados procedimentos cirúrgicos para correção de cardiopatias congênitas com uso de CEC em 66 pacientes. Destes 66 pacientes, 6 foram excluídos da amostra por estarem sendo submetidos à reoperação na mesma internação, 22 não preencheram os critérios de inclusão e 5 foram perdidos por não ter sido possível estar presente nos momentos de coleta. Foram coletadas amostras de 33 dos 66 pacientes, só tendo sido possível dosagem plasmática das moléculas de adesão em 21 pacientes, em função do número de *kits* disponível.

Foram avaliados 21 lactentes (entre trinta dias de vida e um ano de idade) portadores de cardiopatias congênitas cianóticas e acianóticas. Nenhum paciente apresentou causas conhecidas de dano vascular pré-existentes, como parada cardíaca, sepse, vasculite ou hipotensão severa recentes ou ocorrência de óbito no período transoperatório.

As patologias cardíacas congênitas mais comuns foram DSAV e tetralogia de Fallot (TOF), representando 28,6% e 23,8% da população estudada, respectivamente. A descrição das diferentes cardiopatias e sua frequência estão listadas na tabela 1.

O grupo em estudo foi composto por 11 meninos e 10 meninas, com médias de idade de 6,6 meses e de peso de 5,8 quilos. Nove crianças apresentaram cardiopatia cianótica. Seis

crianças eram portadoras de síndrome de Down, as quais apresentaram cardiopatia acianótica. As características demográficas dos pacientes em estudo são apresentadas na tabela 2.

A maioria dos pacientes foi submetida à cirurgia apresentando uma classificação do estado físico do paciente preconizado pela Sociedade Americana de Anestesiologia (American Society of Anesthesiology – ASA) maior que 3. A mediana do tempo de CEC foi de 87 minutos e a do tempo de clampeamento da aorta foi de 53 minutos. A temperatura média de resfriamento foi de 27°C. Não houve diferenças estatisticamente significativas quanto a estas variáveis ao se comparar pacientes acianóticos e cianóticos. As variáveis intra-operatórias encontram-se especificadas na tabela 3.

Todos os pacientes necessitaram suporte de drogas vasopressivas no período pós-operatório, tendo sido necessária a utilização de três tipos diferentes de inotrópicos na maioria dos casos. A mediana do tempo de intubação total foi de 72 horas e a do período de internação foi de 21 dias. As variáveis pós-operatórias são apresentadas na tabela 4.

2. Variáveis Hemodinâmicas

Os valores da frequência cardíaca (FC), da pressão arterial média (PAM), da pressão da artéria pulmonar (PAP), da pressão do átrio esquerdo (PAE) e da pressão venosa central (PVC), verificados nos diferentes momentos da coleta das moléculas de adesão, são descritos na tabela 5.

3. Variáveis Laboratoriais

Os valores séricos do hematócrito, da hemoglobina, das plaquetas e do lactato coletados durante o estudo encontram-se detalhados na tabela 6.

4. Complicações Pós-operatórias e Evolução Clínica

A complicação pós-operatória mais comum na população em estudo foi infecção, tendo sido sua ocorrência verificada em 71,4% dos pacientes. Falência de múltiplos órgãos ocorreu em 29% dos casos. Dois pacientes tiveram insuficiência renal aguda no pós-operatório, tendo sido necessária utilização de diálise peritoneal em apenas um. Nove pacientes apresentaram distúrbios do ritmo cardíaco (5 pacientes apresentaram bloqueio atrioventricular total, 3 apresentaram bradicardia com ritmo juncional e 1 apresentou taquicardia juncional), sendo utilizado marca-passo transitório em seis. Destes, apenas um necessitou implantação de marca-passo definitivo por apresentar bloqueio atrioventricular total. Três lactentes apresentaram parada cardiorrespiratória, tendo dois deles evoluído para óbito pós-operatório (9,5%). Destes, um era portador de tetralogia de Fallot (TOF) e outro era portador de DSAV e síndrome de Down. As complicações pós-operatórias estão listadas na tabela 7. A evolução clínica está listada na tabela 8. A evolução clínica conforme o tempo de intubação é apresentada na figura 3. A tábua de sobrevivência de Kaplan-Meier encontra-se na figura 4.

5. Níveis Plasmáticos das Moléculas de Adesão

5.1 Molécula de adesão intercelular-1 solúvel

O valor médio de ICAM-1 no momento da indução anestésica foi de 494,3 ng/ml, significativamente maior ($P < 0,0001$) do que aquele considerado normal para pacientes adultos hígidos (211 ng/ml). Em relação aos valores basais, os níveis de ICAM-1 circulante diminuíram significativamente ($P < 0,001$) ao término da CEC, voltando a aumentar significativamente ($P < 0,005$) 8 horas após o término deste período, embora não alcançando os valores basais. Após 26 horas do encerramento da CEC esta molécula continuou apresentando níveis significativamente diminuídos ($P = 0,005$) em relação aos basais. Os níveis séricos da ICAM-1 conforme o período de tempo analisado são apresentados na tabela 9 e nas figuras 5 e 6.

5.2 Molécula de adesão celular-vascular-1 solúvel

O valor médio de VCAM-1 no momento da indução anestésica foi de 1157,2 ng/ml, significativamente maior ($P < 0,0001$) do que aquele considerado normal para pacientes adultos hígidos (553 ng/ml). Em relação aos valores basais, os níveis de VCAM-1 circulante diminuíram significativamente ($P < 0,005$) ao término da CEC. Seus níveis apresentaram um aumento significativo ($P < 0,001$) 8 horas após o término deste período, alcançando valores semelhantes aos encontrados no estado basal. Vinte e seis horas após o encerramento da CEC, esta molécula apresentou diminuição significativa ($P < 0,005$) de sua concentração sérica em relação ao valor identificado 8 horas após tal período, também

significativamente menores ($P < 0,05$) do que aqueles verificados durante a indução anestésica. No entanto, os valores séricos absolutos da molécula 8 horas e 26 horas após CEC encontram-se muito próximos aos valores absolutos basais. Os níveis séricos da VCAM-1 conforme o período de tempo analisado são apresentados na tabela 9 e nas figuras 7 e 8.

6. Perfil dos Dados Referentes a Pacientes Acianóticos e Cianóticos

As características demográficas referentes a pacientes acianóticos e cianóticos encontram-se na tabela 10. Não houve diferença estatisticamente significativa no que se refere a sexo e idade entre os dois grupos. A média de peso de pacientes acianóticos foi significativamente menor ($P = 0,03$) do aquela dos cianóticos. No entanto, ao serem retirados da população acianótica os pacientes portadores de síndrome de Down, o peso passou a ser uma variável sem diferença estatística entre os grupos ($P = 0,09$).

As variáveis intra-operatórias relacionadas a pacientes acianóticos e cianóticos são apresentadas na tabela 11. Houve diferença estatisticamente significativa no que se refere à classificação de ASA, estando os pacientes classificados como mais graves no grupo de cianóticos ($P = 0,04$). Não houve diferença significativa entre tempos de circulação extracorpórea e de clampeamento de aorta, bem como em relação à temperatura de resfriamento quando comparados os grupos.

Os tempos de intubação e internação não foram estatisticamente diferentes entre lactentes acianóticos e cianóticos ($P=0,33$ e $P=0,12$, respectivamente). A tabela 12 descreve as variáveis pós-operatórias.

Setenta e cinco por cento dos pacientes acianóticos e 66,7% dos cianóticos apresentaram infecção durante a internação, sendo esta, a complicação pós-operatória mais comum. As complicações pós-operatórias de lactentes acianóticos e cianóticos são apresentadas na tabela 13. Um paciente de cada grupo evoluiu para óbito durante a internação. Os dados referentes à evolução clínica de ambos grupos encontram-se na tabela 14.

Os valores médios de ICAM-1 e de VCAM-1 em todos os períodos avaliados não foi diferente estatisticamente entre os grupos de acianóticos e cianóticos ($P>0,1$). Os níveis plasmáticos das moléculas de adesão solúveis são apresentados na tabela 15 e nas figuras 9 e 10.

Tabela 1. Diagnóstico das cardiopatias congênitas

DIAGNÓSTICO	PACIENTES (n=21)
DSAV	6 (28,6%)
TOF	5 (23,8%)
TOF + PCA + FOP	1 (4,8%)
TOF + PCA + IT	1 (4,8%)
DSAV + PCA	1 (4,8%)
CIV + PCA	1 (4,8%)
CIV + FOP	1 (4,8%)
CIV + CoAo	1 (4,8%)
CIA	1 (4,8%)
TGV	1 (4,8%)
Truncus Arteriosus	1 (4,8%)
EM + IM	1 (4,8%)

Abreviaturas: n: número de pacientes; DSAV: defeito do septo atrioventricular; TOF: tetralogia de Fallot; PCA: persistência do canal arterial; FOP: forâmen oval patente; IT: insuficiência tricúspide; CIV: comunicação interventricular; CoAo: coartação da aorta; CIA: comunicação interatrial; TGV: transposição dos grandes vasos; EM: estenose mitral; IM: insuficiência mitral.

Tabela 2. Características demográficas dos pacientes

CARACTERÍSTICAS	PACIENTES (n=21)
SEXO (masculino/feminino)	11/10 (52/48%)
IDADE (meses)	6,6 (\pm 3,0)*
PESO (Kg)	5,8 (\pm 2,0)*
CIANÓTICOS/ACIANÓTICOS	9/12 (43/57%)
S. DOWN	6 (29%)

Abreviaturas: n: número de pacientes; S. DOWN: síndrome de Down.

* Média \pm desvio-padrão.

Tabela 3. Variáveis intra-operatórias

VARIÁVEIS	PACIENTES (n = 21)
ASA	
3	8 (38%)
4	12 (57%)
5	1 (5%)
TEMPO DE CEC (min)	87 (27-177)*
TEMPO DE CLAMPEAMENTO DA AORTA (min)	53 (17-90)*
TEMPERATURA DE RESFRIAMENTO (°C)	27 (± 4)**

Abreviaturas: n: número de pacientes; ASA: classificação do estado físico do paciente da sociedade americana de anestesiologia; CEC: circulação extracorpórea; min: minutos.

* Mediana (valor mínimo – valor máximo).

** Média \pm desvio-padrão.

Tabela 4. Variáveis pós-operatórias

VARIÁVEIS	PACIENTES (n=21)
INOTRÓPICOS	
Dopamina	4 (19%)
Dopamina + Milrinone	6 (29%)
Dopamina + Milrinone + Outro	11 (52%)
TEMPO DE INTUBAÇÃO (horas)	72 (1-720)*
TEMPO DE INTERNAÇÃO (dias)	21 (8-70)*

Abreviaturas: n: número de pacientes.

* Mediana (valor mínimo – valor máximo).

Tabela 5. Variáveis hemodinâmicas

TEMPO	FC (bpm)	PAM (mmHg)	PAP (mmHg)	PAE (mmHg)	PVC (cm H2O)
Indução Anestésica	136 (\pm 16) (n = 20)	64 (\pm 17) (n = 21)	-	-	5 (\pm 3) (n = 20)
Término da CEC	152 (\pm 21) (n = 20)	56 (\pm 14) (n = 21)	17 (\pm 6) (n = 7)	10 (\pm 5) (n = 11)	6 (\pm 2) (n = 20)
8 horas após CEC	140 (\pm 21) (n = 20)	67 (\pm 12) (n = 20)	18 (\pm 7) (n = 7)	12 (\pm 4) (n = 11)	11 (\pm 5) (n = 20)
26 horas após CEC	145 (\pm 31) (n = 20)	66 (\pm 19) (n = 20)	23 (\pm 6) (n = 4)	12 (\pm 3) (n = 7)	13 (\pm 5) (n = 18)

Abreviaturas: FC: frequência cardíaca; PAM: pressão arterial média; PAP: pressão da artéria pulmonar; PAE: pressão de átrio esquerdo; PVC: pressão venosa central; n: número de pacientes; CEC: circulação extracorpórea.

Observação: valores expressos como média \pm desvio-padrão.

Tabela 6. Variáveis laboratoriais

TEMPO	HEMATÓCRITO (%)	HEMOGLOBINA (g/dl)	PLAQUETAS ($\times 10^3$ céls/ μ l)	LACTATO (mmol/l)
Indução Anestésica	35,6 (\pm 4,8)	11,4 (\pm 1,7)	304 (\pm 130)	2,1 (\pm 1,2)
8 horas após CEC	37,7 (\pm 7,2)	12,5 (\pm 2,5)	142 (\pm 50)	1,9 (\pm 1,0)
26 horas após CEC	36,7 (\pm 3,6)	11,9 (\pm 1,1)	129 (\pm 52)	1,7 (\pm 1,0)

Abreviaturas: g/dl: gramas/decilitro; céls/ μ l: células/microlitro; mmol/l: milimol/litro; CEC: circulação extracorpórea.

Observação: valores expressos como média \pm desvio-padrão.

Tabela 7. Complicações pós-operatórias

COMPLICAÇÕES	PACIENTES (n=21)
Infecção	15 (71,4%)
Arritmia	9 (42,9%)
MP Transitório	6 (28,6%)
FMO	6 (28,6%)
PCR	3 (14,3%)
IRA	2 (9,5%)
Crise Convulsiva	2 (9,5%)
HP	1 (4,8%)

Abreviaturas: n: número de pacientes; MP: marca-passo; FMO: falência de múltiplos órgãos; PCR: parada cardiorrespiratória; IRA: insuficiência renal aguda; HP: hipertensão pulmonar.

Tabela 8. Evolução clínica

EVOLUÇÃO	PACIENTES (n=21)
Alta	19 (90,5%)
Óbito	2 (9,5%)

Abreviaturas: n: número de pacientes.

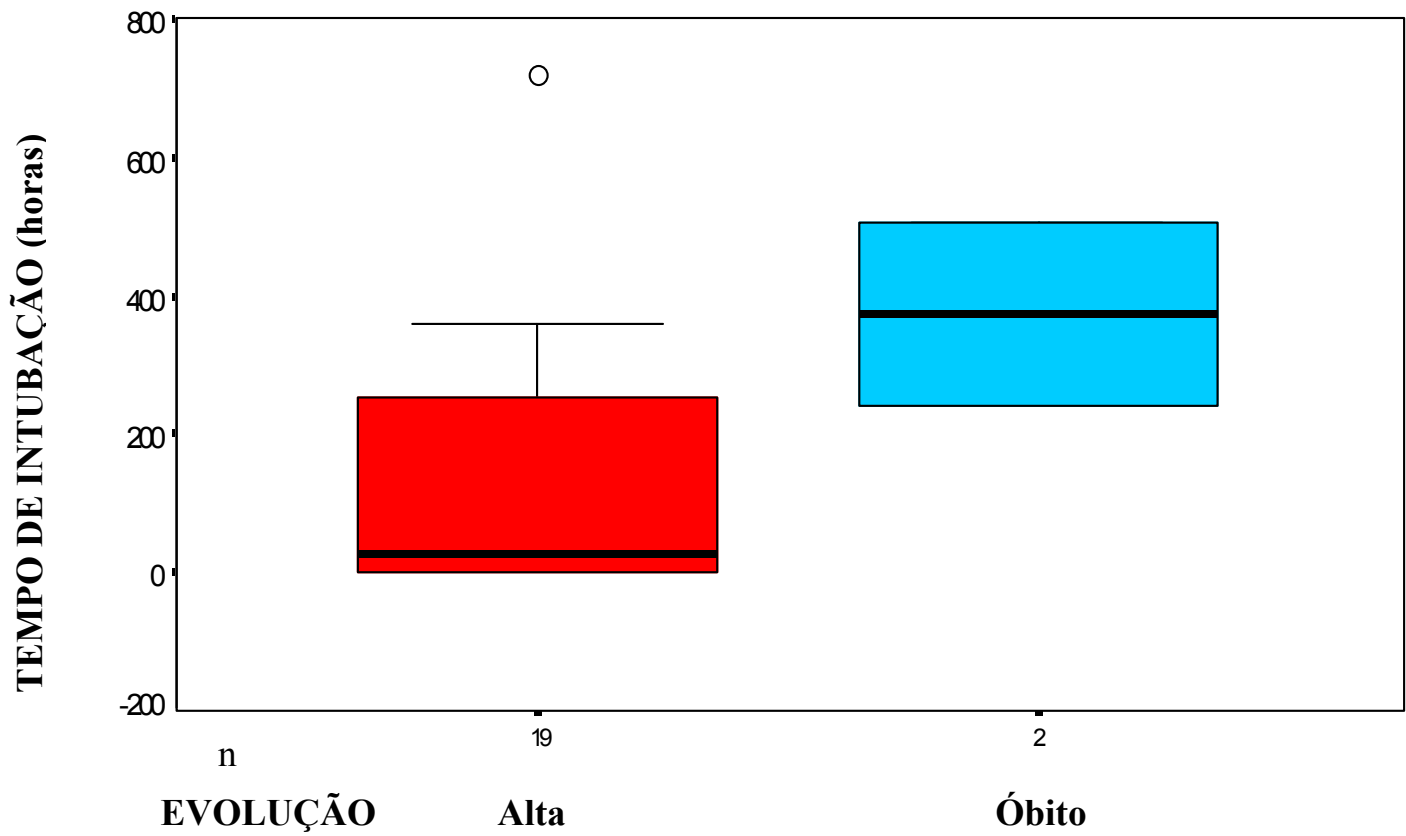


Figura 3. Tempo de intubação x evolução clínica

Abreviaturas: n: número de pacientes

° Valor disperso

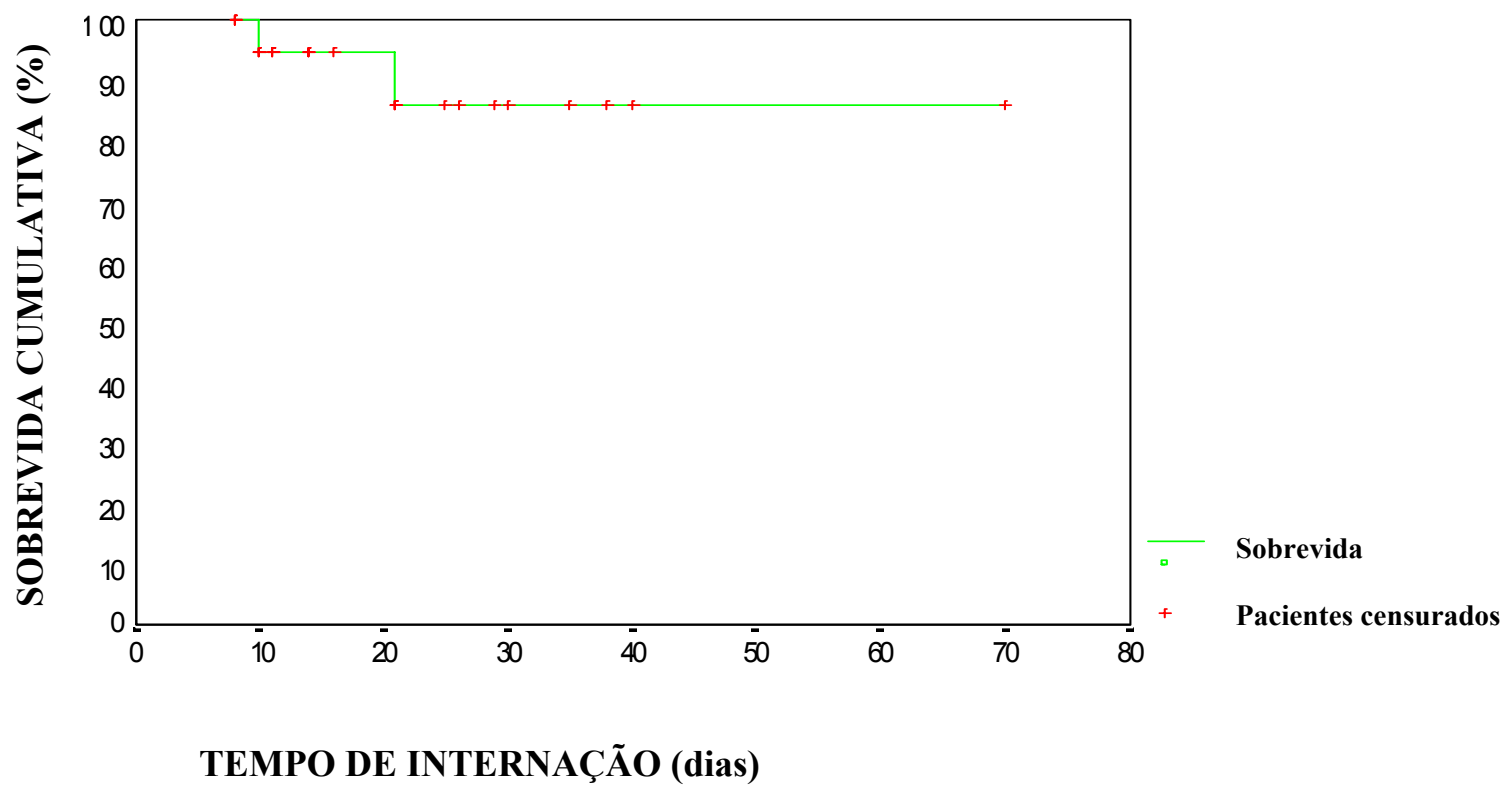


Figura 4. Tábua de sobrevida de Kaplan-Meier

Tabela 9. Níveis plasmáticos das moléculas de adesão solúveis conforme o período de tempo

TEMPO	ICAM-1 (ng/ml)	VCAM-1 (ng/ml)
Indução Anestésica	494,3 (\pm 134,0)	1157,2 (\pm 248,3)
Término da CEC	353,8 (\pm 91,9)	887,3 (\pm 179,5)
8 horas após CEC	427,6 (\pm 96,7)	1139,2 (\pm 216,5)
26 horas após CEC	422,1 (\pm 120,2)	1011,0 (\pm 222,6)

Abreviaturas: ICAM-1: molécula de adesão intercelular-1; VCAM-1: molécula de adesão celular-vascular-1; ng/ml: nanogramas/mililitro; CEC: circulação extracorpórea.

Observação: valores expressos como média \pm desvio-padrão.

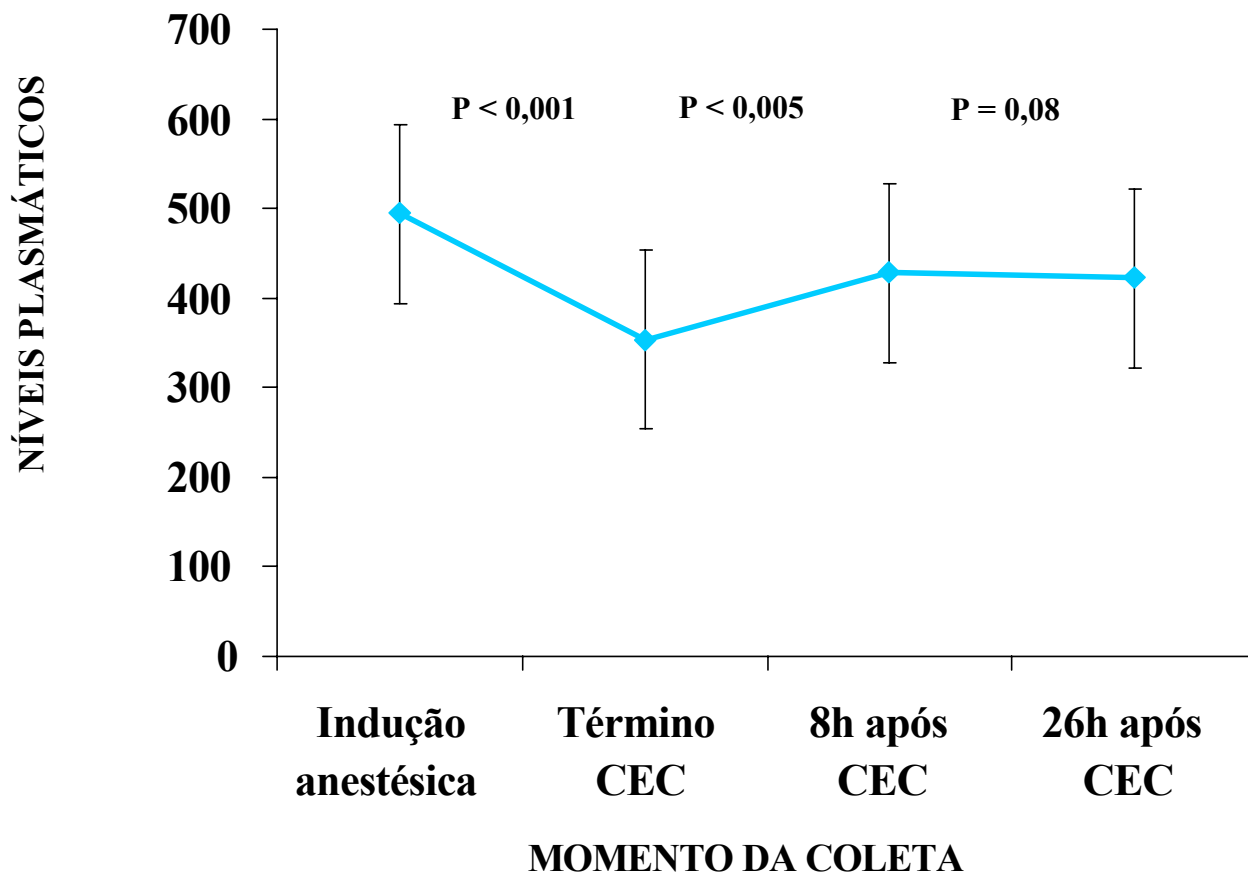


Figura 5. Níveis plasmáticos seqüenciais da ICAM-1

Abreviaturas: CEC: circulação extracorpórea.

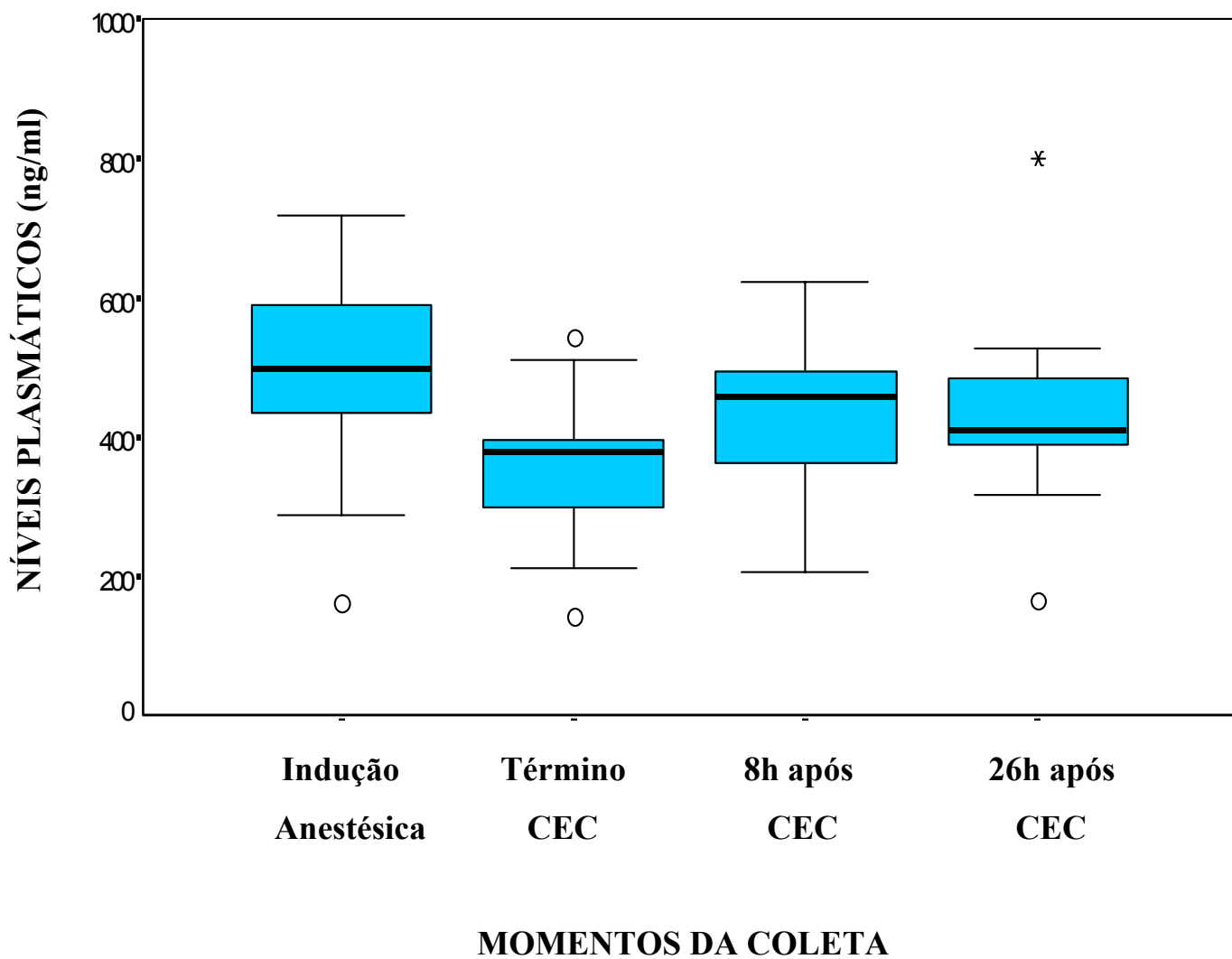


Figura 6. Níveis plasmáticos sequenciais da ICAM-1

Abreviaturas: CEC: circulação extracorpórea.

° Valor disperso

* Valor disperso extremo

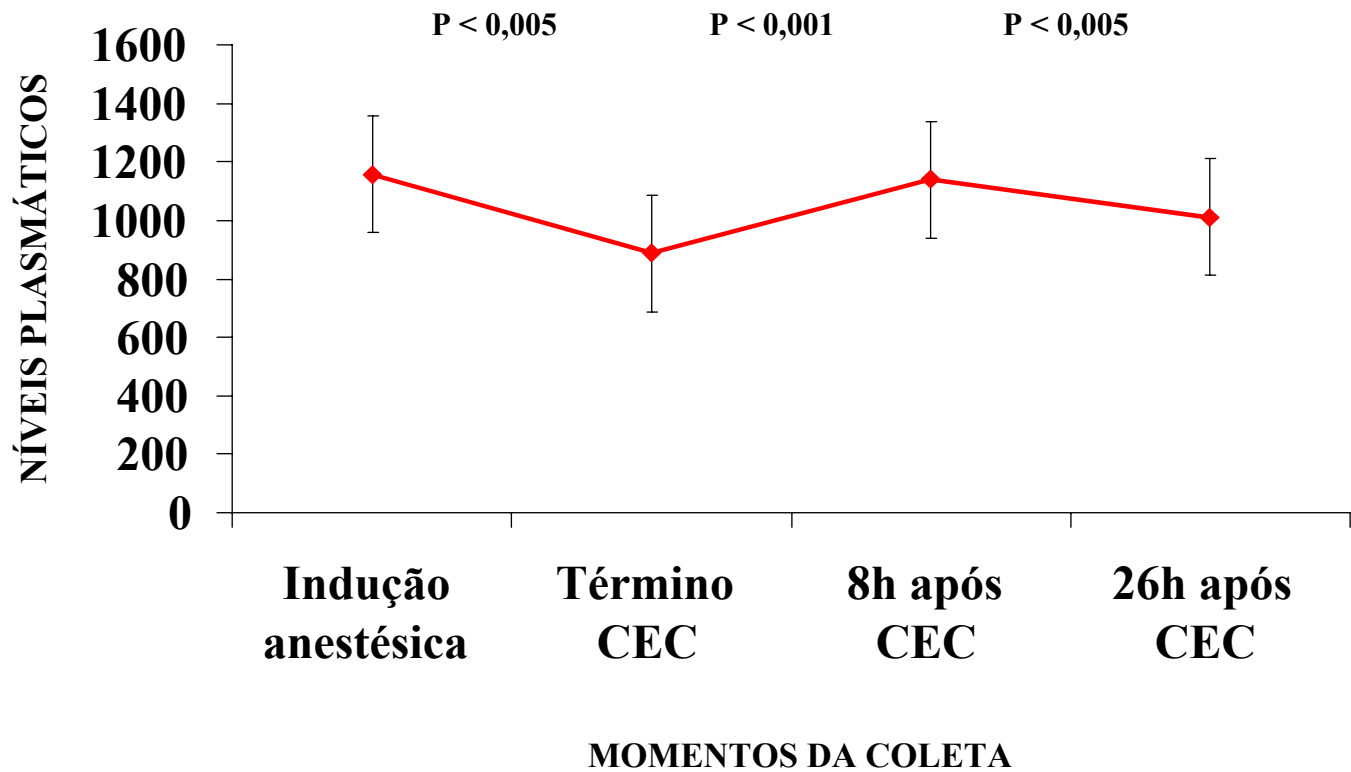


Figura 7. Níveis plasmáticos seqüenciais da VCAM-1

Abreviaturas: CEC: circulação extracorpórea.

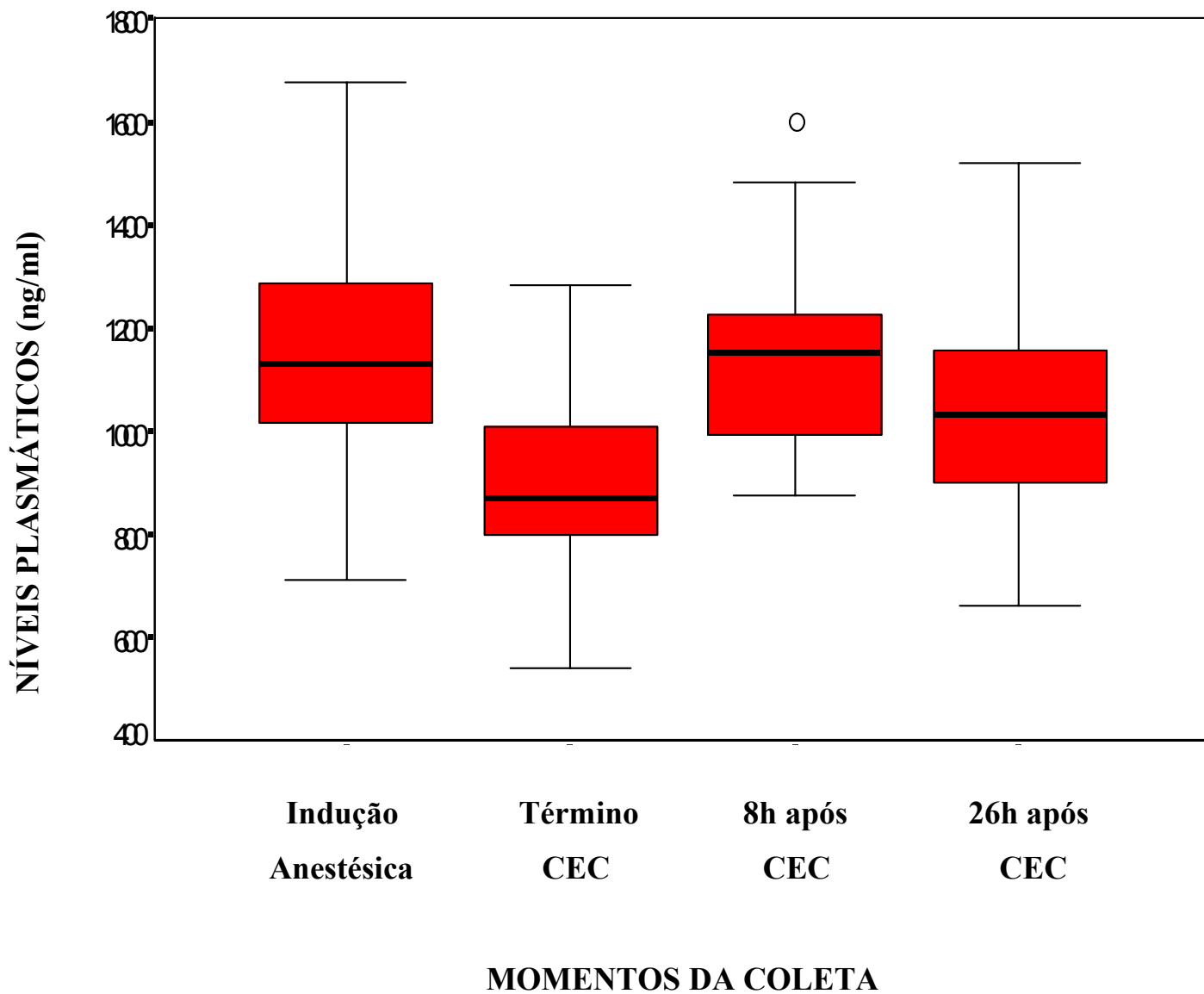


Figura 8. Níveis plasmáticos seqüenciais da VCAM-1

Abreviaturas: CEC: circulação extracorpórea.

° Valor disperso

Tabela 10. Características demográficas dos pacientes acianóticos e cianóticos

CARACTERÍSTICAS	ACIANÓTICOS (n=12)	CIANÓTICOS (n=9)	P
SEXO (masculino/feminino)	7/5 (58/42%)	4/5 (44/56%)	0,67
IDADE (meses)	6,1 (\pm 2,4)*	7,4 (\pm 3,7)*	0,336
PESO (Kg)	4,9 (\pm 1,0)*	7,0 (\pm 2,4)*	0,031
S. DOWN	6 (50,0%)	0	0,018

Abreviaturas: n: número de pacientes; S. DOWN: síndrome de Down.

* Média \pm desvio-padrão.

Tabela 11. Variáveis intra-operatórias dos pacientes acianóticos e cianóticos

VARIÁVEIS	ACIANÓTICOS (n=12)	CIANÓTICOS (n=9)	P
ASA			0,04
3	7 (58,3%)	1 (11,1%)	
4	4 (33,3%)	8 (88,9%)	
5	1 (8,3%)	0	
TEMPO DE CEC (min)	88 (27-121)*	83 (64-177)*	0,25
TEMPO DE CLAMPEAMENTO DA AORTA (min)	50 (0-90)*	47(24-77)*	0,94
TEMPERATURA DE RESFRIAMENTO (°C)	27 (\pm 4)**	26 (\pm 3)**	0,37

Abreviaturas: n: número de pacientes; ASA: classificação do estado físico do paciente da sociedade americana de anesthesiologia; CEC: circulação extracorpórea.

* Mediana (valor mínimo – valor máximo).

** Média \pm desvio-padrão.

Tabela 12. Variáveis pós-operatórias dos pacientes acianóticos e cianóticos

CARACTERÍSTICAS	ACIANÓTICOS (n=12)	CIANÓTICOS (n=9)	P
INOTRÓPICOS			
Dopamina	4 (33,3%)	0	
Dopamina + Milrinone	2 (16,7%)	4 (44,4%)	
Dopamina + Milrinone + Outro	6 (50,0%)	5 (55,5%)	
TEMPO DE INTUBAÇÃO (horas)	156 (1-504)*	24 (1-720)*	0,33
TEMPO DE INTERNAÇÃO (dias)	23 (8-70)*	11 (8-40)*	0,12

Abreviaturas: n: número de pacientes.

* Mediana (valor mínimo - valor máximo).

Tabela 13. Complicações pós-operatórias dos pacientes acianóticos e cianóticos

COMPLICAÇÕES	ACIANÓTICOS (n=12)	CIANÓTICOS (n=9)
Infecção	9 (75,0%)	6 (66,7%)
Arritmia	6 (50,0%)	3 (33,3%)
MP Transitório	4 (33,3%)	2 (22,2%)
FMO	3 (25,0%)	3 (33,3%)
PCR	2 (16,7%)	1 (11,1%)
IRA	1 (8,3%)	1 (11,1%)
Crise Convulsiva	1 (8,3%)	1 (11,1%)
HP	1 (8,3%)	0

Abreviaturas: n: número de pacientes; MP: marca-passo; FMO: falência de múltiplos órgãos; PCR: parada cardiorrespiratória; IRA: insuficiência renal aguda; HP: hipertensão pulmonar.

Tabela 14. Evolução clínica dos pacientes acianóticos e cianóticos

EVOLUÇÃO	ACIANÓTICOS (n=12)	CIANÓTICOS (n=9)
Alta	11 (91,7%)	8 (88,9%)
Óbito	1 (8,3%)	1 (11,1%)

Abreviaturas: n: número de pacientes.

Tabela 15. Níveis plasmáticos das moléculas de adesão solúveis dos pacientes acianóticos e cianóticos conforme o período de tempo

TEMPO	ICAM-1 (ng/ml) Acianóticos (n=12)	ICAM-1 (ng/ml) Cianóticos (n=9)	P	VCAM-1 (ng/ml) Acianóticos (n=12)	VCAM-1 (ng/ml) Cianóticos (n=9)	P
Indução Anestésica	537,4 (± 117,1)	441,6 (± 140,9)	0,114	1236,4 (± 232,3)	1060,3 (± 244,4)	0,117
Término da CEC	382,5 (± 88,5)	318,7 (± 88,0)	0,125	942,8 (± 214,3)	819,5 (± 98,4)	0,129
8 horas após CEC	440,6 (± 100,7)	410,3 (± 94,1)	0,493	1158,9 (± 238,9)	1112,8 (± 193,3)	0,642
26 horas após CEC	440,4 (± 127,5)	394,6 (± 110,7)	0,418	1076,1 (± 237,8)	913,2 (± 165,7)	0,111

Abreviaturas: ICAM-1: molécula de adesão intercelular-1; VCAM-1: molécula de adesão celular-vascular-1; ng/ml: nanogramas/mililitro; CEC: circulação extracorpórea.

Observação: valores expressos como média ± desvio-padrão.

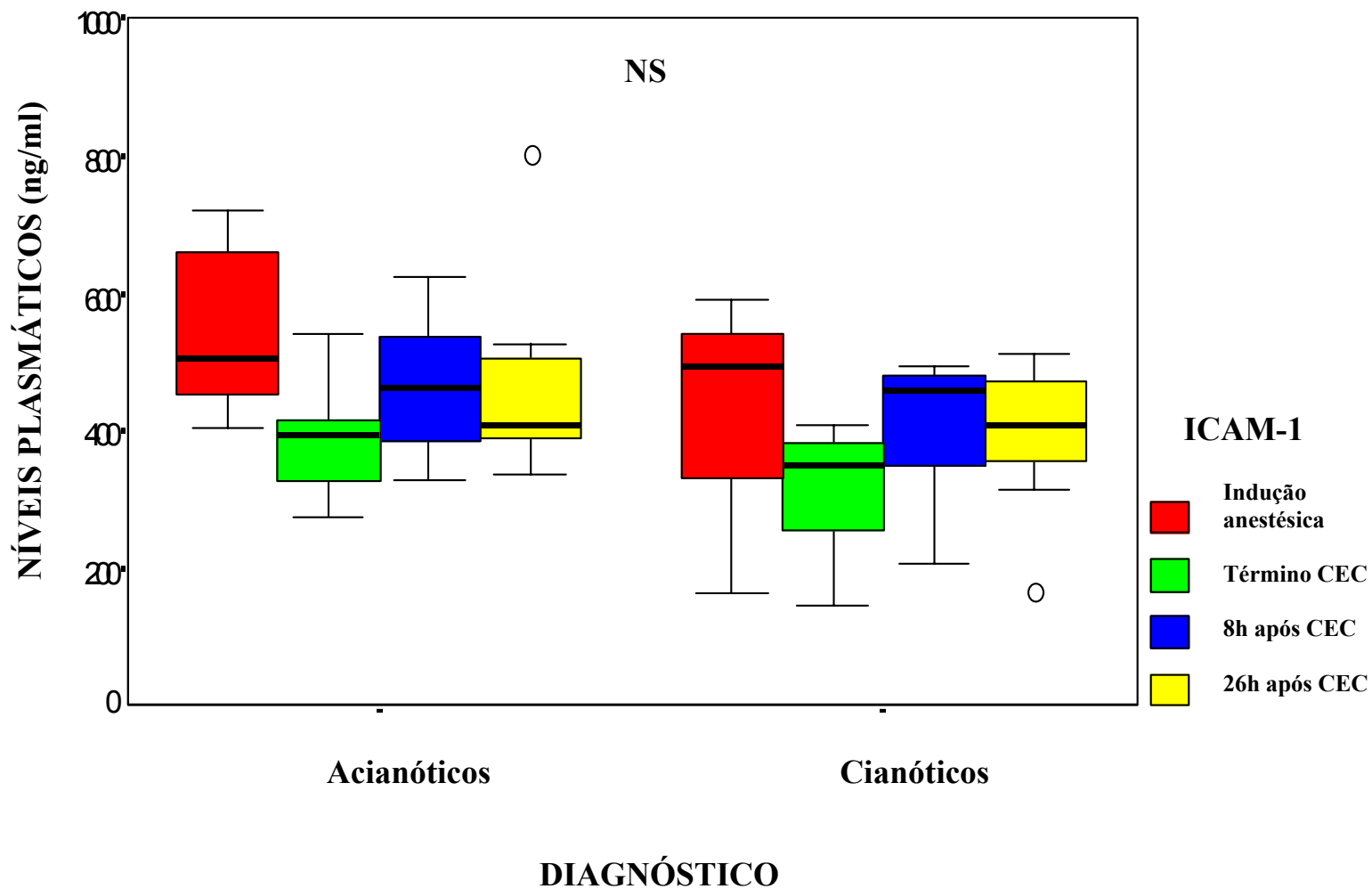


Figura 9. Níveis plasmáticos sequenciais da ICAM-1 x diagnóstico

Abreviaturas: NS: não significativo; ICAM-1: molécula de adesão intercelular-1; CEC: circulação extracorpórea.

° Valor disperso

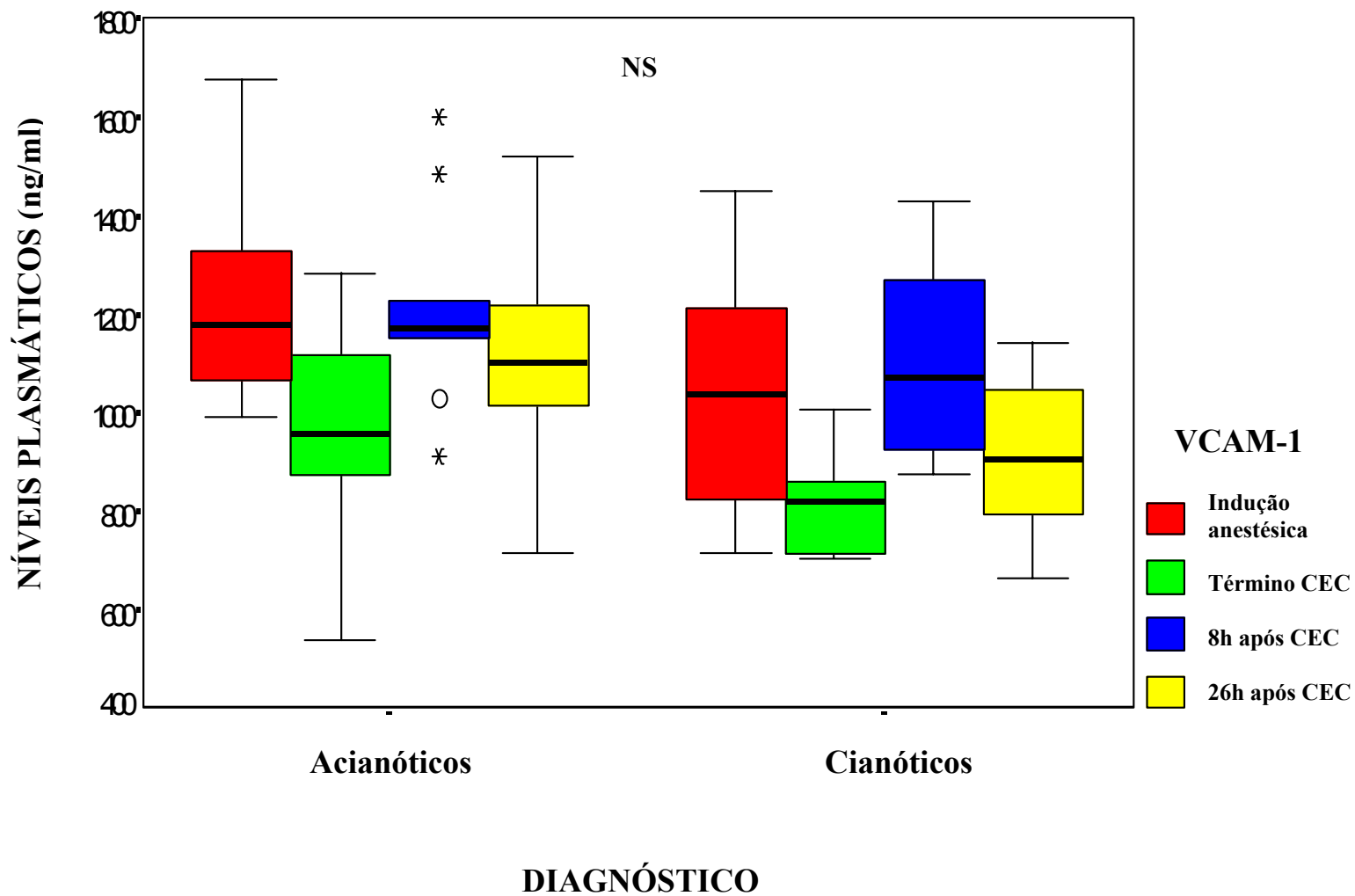


Figura 10. Níveis plasmáticos seqüenciais da VCAM-1 x diagnóstico

Abreviaturas: NS: não significativo; VCAM-1: molécula de adesão celular-vascular-1; CEC: circulação extracorpórea.

o Valor disperso

* Valor disperso extremo

DISCUSSÃO

Durante a última década, tem sido demonstrada a participação ativa do endotélio na homeostasia cardiovascular. Pesquisas extensas têm revelado que o endotélio exerce o papel principal na regulação da permeabilidade, do tônus, da coagulação, da fibrinólise e da inflamação. Esta regulação é alcançada através da expressão de proteínas de superfície derivadas do endotélio ou da secreção de fatores solúveis biologicamente ativos (VERRIER & MORGAN, 1998).

As moléculas de adesão solúveis apresentam um papel estabelecido como mediadores importantes da resposta inflamatória em muitas situações clínicas e cirúrgicas, entre elas a exposição aos circuitos de CEC (GEARING & NEWMAN, 1993; WAN et al., 1997; HALL et al., 1997; KALAWSKI et al., 1998; ASIMAKOPOULOS & TAYLOR, 1998). Os danos vascular e tecidual verificados após o período de CEC envolvem interações entre os leucócitos e o endotélio, mediadas por várias moléculas de adesão (BLUME et al., 1997). Estudos têm demonstrado que estas moléculas sofrem modificações de diferentes proporções em suas concentrações plasmáticas durante e após tal período (ASIMAKOPOULOS & TAYLOR, 1998). No entanto, poucos estudos analisando o perfil plasmático das moléculas de adesão solúveis ICAM-1 e VCAM-1, incluindo lactentes submetidos à cirurgia cardíaca com uso de CEC, existem na literatura. Além disso, ainda não está claro se existe diferença nos perfis plasmáticos destas moléculas entre pacientes acianóticos e cianóticos e se tais valores estão associados a variáveis peri-operatórias.

Através do presente estudo, buscou-se estabelecer os níveis basais das moléculas de adesão solúveis ICAM-1 e VCAM-1 e seu perfil de modificação em lactentes acianóticos e cianóticos, submetidos à cirurgia cardíaca com uso de CEC para correção de defeitos cardíacos congênitos. Além disso, procurou-se estabelecer correlações entre o perfil das moléculas estudadas, as variáveis clínicas e hemodinâmicas e a evolução dos pacientes. Outros estudos descritos na literatura analisaram o perfil das moléculas de adesão solúveis no pós-operatório cardíaco de crianças submetidas à CEC (KILBRIDGE et al., 1994; BOLDT et al., 1995; BLUME et al., 1997; TÁRNOK et al., 1999). No entanto, estes estudos foram realizados com crianças de faixas etárias variadas, não havendo nenhum que tenha incluído exclusivamente lactentes em suas populações.

1. Características Clínicas da População Estudada

Neste estudo foram avaliados 21 lactentes portadores de cardiopatias congênitas, sendo 57% acianóticos e 43% cianóticos. As patologias cardíacas mais comuns foram DSAV e TOF. Do total de pacientes, 11 eram meninos e 10 eram meninas, com médias de idade de 6,6 meses e de peso de 5,8 quilos. TÁRNOK et al. (1999) realizaram um estudo incluindo 18 crianças cardiopatas submetidas à CEC, com média de idade de 6,8 anos, portadoras, na sua maioria, de CIA ou de CIV. BLUME et al. (1997) analisaram 56 pacientes cardiopatas submetidos à cirurgia cardíaca com uso de CEC com média de idade de 1 ano (variação de 2 dias de vida a 19 anos de idade), sendo 41% do sexo masculino. As patologias cardíacas congênitas mais comuns foram CIV e TOF. Trinta e sete por cento dos pacientes apresentaram patologia cardíaca cianótica. No estudo de BOLDT et al. (1995) foram avaliadas 15 crianças submetidas à CEC com médias de idade de 1,8 anos (variação de 1

semana de vida a 5 anos de idade) e de peso de 9 quilos. Sessenta e sete por cento das crianças eram portadoras de cardiopatia congênita cianótica, tendo a maioria apresentado o diagnóstico de TOF. Não há descrição de pacientes portadores de síndrome de Down nos estudos citados.

O presente estudo, embora contendo um número relativamente pequeno de pacientes, tal qual outros estudos descritos na literatura (KILBRIDGE et al., 1994; BOLDT et al., 1995; TÁRNOK et al., 1999), apresentou uma amostra de pacientes mais homogênea, ao incluir somente lactentes em sua seleção. Isto permitiu uma comparação mais adequada entre os pacientes do que aquela apresentada em alguns estudos como o de BLUME et al. (1997), que incluiu 56 pacientes com ampla faixa de variação etária. Este é o único estudo até o momento realizado exclusivamente com lactentes submetidos à CEC, nos quais se mensurou os níveis de ICAM-1 e VCAM-1 solúveis após tal período. Da mesma forma, neonatos foram excluídos em função de inúmeras variáveis particulares a um organismo não completamente maduro. Em relação ao diagnóstico cardiológico, o estudo de TÁRNOK et al. (1999) incluiu pacientes portadores de cardiopatias menos graves, enquanto os demais foram comparáveis quanto a esta variável, apresentando pacientes com cardiopatias de maior complexidade terapêutica.

Verificou-se que todos os pacientes incluídos na amostra do presente estudo apresentaram uma classificação de ASA maior que 3, caracterizando a maior gravidade dos mesmos. As medianas dos tempos de CEC e de clampeamento de aorta foram, respectivamente, 87 minutos e 53 minutos e a temperatura média de resfriamento, 27°C. Todos os lactentes necessitaram uso de drogas inotrópicas no período pós-operatório, tendo sido utilizadas três

drogas diferentes na maioria dos pacientes. A mediana do tempo de intubação foi de 72 horas e a do tempo de internação foi de 21 dias. O estudo de BLUME et al. (1997) encontrou um valor de mediana do tempo de CEC semelhante ao verificado no estudo atual, correspondendo a 91,5 minutos. O valor da mediana do tempo de intubação foi de 21 horas, ou seja, 3,4 vezes menor que aquele identificado no atual estudo. Talvez seja importante considerar que 6 pacientes neste último apresentavam diagnóstico associado de síndrome de Down, o que, potencialmente, pode ter determinado a evolução ventilatória nos pacientes avaliados. TÁRNOK et al. (1999) encontraram valores médios de tempo de CEC e de clampeamento de aorta de 69 minutos e de 37 minutos, respectivamente, e de temperatura de resfriamento de 31°C. Os tempos de CEC e clampeamento da aorta foram menores do que aqueles verificados no presente estudo e no realizado por BLUME et al. (1997). Outro estudo encontrou valores médios de tempo de CEC de 156 minutos e de clampeamento de aorta de 85 minutos, ambos mais elevados que aqueles identificados no estudo atual. Neste mesmo estudo, verificou-se que 66,7% dos pacientes necessitaram uso de drogas inotrópicas e que a maioria dos pacientes foi extubada no primeiro pós-operatório (BOLDT et al., 1995)). Comparando-se o estudo atual com os descritos na literatura, pode-se afirmar que pacientes que apresentaram diagnósticos cardiológicos semelhantes, apresentaram tempos de CEC e de clampeamento de aorta também semelhantes (BLUME et al., 1997) ou mais elevados (BOLDT et al., 1995), fato este diretamente dependente da habilidade cirúrgica específica de cada serviço e da complexidade dos achados morfológicos. Entretanto, aqueles pacientes portadores de CIV e CIA tiveram tempos de CEC e de clampeamento de aorta menores que os encontrados no presente estudo (TÁRNOK, 1999). O fato de a maioria dos pacientes do estudo atual terem necessitado de três drogas inotrópicas no período pós-operatório e de terem sido extubados mais

tardiamente que os pacientes incluídos nos demais estudos sugere a maior gravidade do grupo avaliado neste estudo. O longo período de internação (mediana de 21 dias) corrobora tal inferência.

Em relação às variáveis hemodinâmicas, a correlação ficou prejudicada em função do número pequeno de pacientes nos diferentes momentos avaliados. Isto decorre de uma evolução natural de retirada de cateteres invasivos, uma vez que o paciente estabiliza ao longo das horas de pós-operatório imediato. Nas variáveis laboratoriais, o dado interessante repousa nos níveis séricos de lactato, onde as médias nos diferentes períodos avaliados se mantêm dentro da normalidade. A literatura é bastante prolífica quanto ao valor da monitorização do lactato sérico e sua correlação com prognóstico de pacientes submetidos à cirurgia cardíaca (SIEGEL et al., 1996; CHARPIE et al., 2000; HATHERILL et al., 2000). No entanto, os achados deste estudo, em relação ao lactato, não estão de acordo com a literatura.

2. Complicações Pós-operatórias e Evolução Clínica

A complicação pós-operatória mais comum foi infecção, ocorrendo em 71,4% dos pacientes. Falência de múltiplos órgãos ocorreu em 29% da população. Houve dois óbitos pós-operatórios, conferindo uma taxa de mortalidade na população estudada de 9,5%. TÁRNOK et al. (1999) encontraram uma taxa de infecção igual a 5,5% em seus pacientes, ou seja, 13 vezes menor que aquela identificada no presente estudo. Tal fato correlaciona-se, provavelmente, com a gravidade dos pacientes e com a efetividade das rotinas para o controle da infecção na unidade de terapia intensiva. A amostra populacional de tais autores

incluiu pacientes na sua maioria, como já descrito anteriormente, portadores de CIA e CIV e com uma média de idade mais elevada. Conseqüentemente, estes pacientes provavelmente apresentaram risco menor de infecção quando comparados a lactentes portadores de patologias cardíacas congênitas mais complexas, tais como DSAV e TOF, talvez por terem sido menos manipulados invasivamente no período peri-operatório. Além disso, o número de portadores de síndrome de Down neste estudo possivelmente contribua para a elevação das taxas de infecção, visto terem tais pacientes deficiências imunológicas constitucionais próprias.

Observa-se, também, uma elevada taxa de bloqueio atrioventricular total nesta amostra de pacientes (5 do total de 21), embora somente um tenha necessitado implantação de marcapasso permanente. Novamente, tal observação está diretamente relacionada à terapêutica cirúrgica, incluindo variáveis como habilidade do cirurgião e complexidade das malformações cardíacas.

3. Níveis Plasmáticos das Moléculas de Adesão Solúveis

As moléculas de adesão são expressas nas superfícies celulares dos neutrófilos e das células endoteliais, após estímulos específicos, entre eles a exposição aos circuitos de CEC (BOLDT et al., 1995; KALAWSKI et al., 1998; ASIMAKOPOULOS & TAYLOR, 1998). Isto promove a adesão entre tais células e desencadeia um processo celular intenso que resulta em dano vascular e tecidual (BOLDT et al., 1995). Moléculas de adesão solúveis circulantes foram descritas na literatura e implicadas como marcadores da extensão do dano vascular e da doença inflamatória (GEARING & NEWMAN, 1993; BOLDT et al., 1995;

BLUME et al., 1997), bem como do prognóstico de algumas patologias (GEARING & NEWMAN, 1993; COWLEY et al., 1994). É interessante observar que, neste grupo de pacientes avaliados em relação ao comportamento dos níveis plasmáticos das moléculas de adesão, tanto a ICAM-1, quanto a VCAM-1, encontram-se elevadas no estado basal. A implicância deste achado é a complexidade de fatores que permeiam o organismo de um lactente cardiopata, incluindo a presença constante de uma cascata inflamatória, onde várias funções fisiológicas encontram-se necessariamente afetadas.

3.1 Molécula de adesão intercelular-1 solúvel

A ICAM-1 pertence à superfamília imunoglobulina e é fracamente expressa nos leucócitos e nas células endoteliais em repouso. No entanto, sua expressão aumenta após exposição das células endoteliais à IL-1 β , TNF- α e LPS (KALAWSKI et al., 1998; LAWSON et al., 1999). A interação entre a ICAM-1 e as integrinas tem um papel importante na marginação e extravasamento dos leucócitos aos sítios de inflamação (KALAWSKI et al., 1998). A forma solúvel da ICAM-1 tem sido identificada em várias situações patológicas, estando o aumento de sua concentração relacionado a maior morbimortalidade (SESSLER et al., 1993; SESSLER et al., 1995; ENDO et al., 1995). Níveis elevados desta molécula solúvel têm sido identificados em pacientes com sepse, câncer, FMO, insuficiência cardíaca e após transplantes cardíacos (GEARING et al., 1992; BALLANTYNE et al., 1992; SESSLER et al., 1993; SESSLER et al., 1995; ENDO et al., 1995; TSUTAMOTO et al., 1995; GEORGE et al., 1997). Concentrações variáveis da ICAM-1 têm sido verificadas durante e após CEC, tanto em pacientes adultos, como em pacientes pediátricos submetidos a

cirurgias cardíacas (BOLDT et al., 1995; BLUME et al., 1997; BOLDT et al., 1998; KALAWSKI et al., 1998; TÁRNOK et al., 1999).

O presente estudo identificou um valor médio de ICAM-1 de 494,3 ng/ml durante a indução anestésica, correspondendo ao valor basal. Esta concentração foi significativamente mais elevada que aquela considerada normal para adultos hígidos, fornecida pelo fabricante dos *kits* usados na dosagem desta molécula e para adultos submetidos à cirurgia cardíaca com uso de CEC (BOLDT et al., 1995; CREMER et al., 1996; BOLDT et al., 1998; KALAWSKI et al., 1998; BAUFRETON et al., 1999). O estudo realizado por BOLDT et al. (1998) avaliou os níveis basais de ICAM-1 solúvel em seis crianças com menos de cinco anos que seriam submetidas a cirurgias extensas, embora não-cardíacas, a fim de definir valores normais em crianças. Os níveis identificados variaram de 185 a 295 ng/ml, com média em 245 ng/mL, tendo sido mensurados com *kits* pertencentes à empresa britânica British Bio-technology Products, Abington, UK. Outro estudo utilizando *kits* de dosagem de ICAM-1 da R&D Systems, Oxon, UK identificou níveis basais de ICAM-1 solúveis iguais a 315 ± 71 ng/ml em crianças cardiopatas que seriam submetidas à CEC e iguais a 297 ± 244 ng/ml em crianças cardiopatas que seriam submetidas à cirurgia cardíaca sem uso de CEC. Estes níveis não diferiram estatisticamente entre os grupos e foram menores que os encontrados no presente estudo (TÁRNOK et al., 1999). Este achado é corroborado pelo estudo de BLUME et al. (1997), realizado com pacientes cardiopatas de 2 dias a 19 anos de idade, que apresentaram valores basais de ICAM-1 solúveis praticamente duas vezes menores que os identificados no estudo atual. A diferença entre os valores basais da ICAM-1 solúvel entre o presente estudo e os descritos

previamente provavelmente relacionam-se às diferenças nas faixas etárias dos pacientes destes estudos e, claramente, à gravidade dos mesmos. É bastante tentador inferir que o estado inflamatório em que estes lactentes se encontravam no momento da correção cirúrgica estava diretamente relacionado às alterações de fluxo, pressão, perfusão e oxigenação inerentes ao defeito cardíaco apresentado.

Os níveis médios da ICAM-1 solúvel ao término da CEC foram iguais a 353,8 ng/ml, significativamente menores que os basais, estando de acordo com o que já foi previamente descrito na literatura (BOLDT et al., 1995; BLUME et al., 1997; TÁRNOK et al., 1999), sendo possivelmente resultado da hemodiluição durante o período de CEC (BOLDT et al., 1995; BLUME et al., 1997; BAUFRETON et al., 1999) e do seqüestro das moléculas no próprio circuito de CEC (BLUME et al., 1997). Posteriormente a este período, a molécula de adesão ICAM-1 solúvel apresentou aumento significativo de seus níveis, alcançando valores médios de 427,6 ng/ml 8 horas após CEC, mantendo-se inalterados 26 horas após CEC (422,1 ng/ml), embora não alcançando os valores basais. Este comportamento da ICAM-1 solúvel após cirurgias cardíacas com CEC em crianças foi anteriormente descrito, mantendo-se os níveis desta molécula ainda inferiores ao basais no segundo dia de pós-operatório (BOLDT et al., 1995; TÁRNOK et al., 1999). O estudo de BLUME et al. (1997) mostrou comportamento semelhante, embora entre 6 e 18 horas após CEC tenha ocorrido queda nos níveis da molécula para posterior elevação com 42 horas, não tendo alcançado os valores basais. Sabidamente, a CEC estimula uma série de reações inflamatórias com liberação de mediadores que variam a sua curva de aparecimento na circulação sanguínea e tecidos. Neste cenário, a elevação dos níveis de ICAM-1 pode dever-se a este fato e a um estado ainda não balanceado pós-correção do defeito cardíaco, o que acontece após alguns

dias de evolução. KILBRIDGE et al. (1994) detectaram níveis elevados de RNAm para ICAM-1 e selectina-E em tecido atrial de pacientes submetidos à cirurgia cardíaca com CEC. Interessantemente, tais níveis também foram observados ao ser analisado tecido não cardíaco (músculo esquelético), apoiando a literatura científica que descreve uma reação inflamatória disseminada em todos os tecidos após CEC.

3.2 Molécula de adesão celular-vascular-1 solúvel

A VCAM-1 também pertence à superfamília imunoglobulina, sendo fracamente expressa por células endoteliais não estimuladas (KALAWSKI et al., 1998). No entanto, durante exposição a agentes pró-inflamatórios, como a IL-1 β , o TNF- α e a IL-4, ela torna-se intensamente expressa pelas células endoteliais (KALAWSKI et al., 1998; LAWSON et al., 1999). A forma solúvel da VCAM-1 apresenta níveis elevados em pacientes com câncer e com doenças inflamatórias (GEARING & NEWMAN, 1993) e níveis variáveis após cirurgias cardíacas com uso de CEC em adultos e crianças (BOLDT et al., 1995, 1995; BLUME et al., 1997; KALAWSKI et al., 1998)

No presente estudo verificou-se valores basais médios de VCAM-1 iguais a 1157,2 ng/ml, sendo significativamente maiores que os considerados normais para adultos hígidos, verificados pelo fabricante dos *kits* para dosagem desta molécula, pertencente a R&D Systems e para pacientes adultos que foram submetidos à cirurgia cardíaca com uso de CEC (BOLDT et al., 1995, 1998; KALAWSKI et al., 1998). Um estudo realizado com crianças que seriam submetidas a cirurgias não-cardíacas e medidos com *kits* pertencentes a

British Bio-technology Products, Abington, UK, encontrou níveis bastante inferiores desta molécula (515 ng/ml, com variação de 450 a 605 ng/ml) do que o atual estudo (BOLDT et al., 1995). Os níveis basais de VCAM-1 solúvel descritos na literatura em crianças cardiopatas que foram submetidas à CEC foram menores (564 ng/ml) em um estudo (BOLDT et al., 1995) e semelhantes (1021 ng/ml) aos encontrados no atual estudo na publicação de BLUME et al. (1997). Este último foi realizado com *kits* do mesmo fornecedor (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA) que o estudo atual.

Os níveis de VCAM-1 solúvel foram significativamente menores ao término da CEC, como descrito previamente na literatura (BOLDT et al., 1995; BLUME et al., 1997) e semelhante com o que ocorreu com a ICAM-1 solúvel, provavelmente relacionados à hemodiluição durante o período de CEC (BOLDT et al., 1995; BLUME et al., 1997; BAUFRETON et al., 1999) e ao seqüestro das moléculas no próprio circuito de CEC (BLUME et al., 1997). Oito horas após término da CEC os níveis de VCAM-1 aumentaram significativamente, embora não atingindo os valores basais, fato verificado em outras análises descritas na literatura (BOLDT et al., 1995; BLUME et al., 1997). Vinte e seis horas após término da CEC, os níveis de VCAM-1 solúvel permaneceram elevados, embora estatisticamente menores que aqueles verificados 8 horas após CEC. Uma diminuição dos níveis de VCAM-1 solúvel entre 6 e 18 horas após CEC, com posterior elevação dos mesmos 42 horas após tal período foi verificado por BLUME et al. (1997). O estudo de BOLDT et al. (1995) provavelmente não identificou este momento de queda dos níveis de VCAM-1 por ter utilizado períodos de coleta diferentes (indução anestésica, durante CEC, fim da cirurgia, 1° pós-operatório e 2° pós-operatório).

Assim como observado com a ICAM-1, a VCAM-1 encontra-se expressivamente elevada em condições basais pré-cirúrgicas, demonstrando o grau de inflamação presente em lactentes portadores de defeitos cardíacos com repercussão clínica significativa. Da mesma forma, tais níveis voltam a se elevar próximo à oitava hora de pós-operatório, quando os efeitos inflamatórios causados pela CEC se fazem sentir em diferentes variáveis clínicas.

4. Perfil dos Dados Referentes a Pacientes Acianóticos e Cianóticos

Embora o presente estudo tenha mostrado algumas diferenças estatisticamente significativas entre as variáveis de pacientes acianóticos e cianóticos, tais como peso e classificação de ASA, não houve diferenças entre o comportamento das moléculas de adesão solúveis ICAM-1 e VCAM-1 entre os grupos populacionais. É possível que esta análise tenha sido prejudicada quanto a sua força estatística para detectar diferenças entre os grupos devido ao número limitado de pacientes em cada grupo. Observações diferentes quanto ao perfil destas moléculas no pós-operatório de lactentes submetidos à cirurgia cardíaca com uso de CEC não foram identificadas na literatura.

5. Considerações Finais

As interações entre os leucócitos e o endotélio representam o ponto final do processo inflamatório após CEC (BOYLE et al., 1997; BAUFRETON et al., 1999). O surgimento de moléculas de adesão solúveis no sangue circulante parece ser um marcador do dano microvascular, do dano tecidual e da extensão da resposta inflamatória (SPRINGER, 1990; BOLDT et al., 1995; BAUFRETON et al., 1999). No entanto, o significado da sua presença

no plasma ainda não é completamente conhecido (ASIMAKOPOULOS & TAYLOR, 1998).

O presente estudo descreveu o perfil plasmático das moléculas de adesão solúveis ICAM-1 e VCAM-1 em lactentes após cirurgia cardíaca com uso de CEC, realizada para correção de defeitos cardíacos congênitos. O comportamento destas moléculas esteve basicamente de acordo com aquele apresentado pelos demais estudos realizados em crianças (BOLDT et al., 1995; BLUME et al., 1997; TÁRNOK et al., 1999). Contudo, os valores basais das moléculas de adesão foram mais elevadas no estudo atual, quando comparadas com a maioria dos estudos realizados em crianças e adultos submetidos a cirurgias cardíacas com uso de CEC (BOLDT et al., 1995, 1995, 1998; CREMER et al., 1996; KALAWSKI et al., 1998; BAUFRETON et al., 1999; TÁRNOK et al., 1999). Inferimos, assim, que esta amostra de pacientes incluiu lactentes de maior gravidade e portadores de defeitos cardíacos com repercussão clínica mais expressiva, embora não tenha havido associação entre as variações dos níveis das moléculas de adesão com as variáveis perioperatórias e a evolução clínica dos pacientes, como descrito por BLUME et al. (1997). Finalmente, o comportamento da ICAM-1 e da VCAM-1 solúvel, bem como a evolução clínica após cirurgia cardíaca com CEC em lactentes acianóticos e cianóticos foi semelhante.

A contribuição apresentada com os dados descritos neste estudo repousa no grupo de pacientes onde, pela primeira vez na literatura, descreve-se o comportamento das moléculas de adesão solúveis ICAM-1 e VCAM-1 no primeiro ano de vida em pacientes portadores de defeitos cardíacos congênitos submetidos à correção cirúrgica com CEC. Além disso, evidenciou-se solidamente a presença, com base nos elevados níveis de tais moléculas

previamente à cirurgia, de um constante estado inflamatório nestes lactentes, causado provavelmente pela doença cardíaca e suas conseqüentes alterações nas funções fisiológicas.

6. Limitações do Presente Estudo

Algumas limitações no estudo atual puderam ser verificadas e tentarão ser discutidas em face dos dados disponíveis na literatura.

O pequeno número de pacientes envolvidos no estudo limitou o poder para avaliar a relação entre níveis de moléculas de adesão solúveis e as variáveis peri-operatórias e a evolução clínica dos pacientes. Esta é uma das limitações que afeta quase todos os estudos que investigam a resposta inflamatória à CEC (ASIMAKOPOULOS & TAYLOR, 1998).

Este estudo incluiu pacientes supostamente mais graves que outros estudos descritos na literatura (BOLDT et al., 1995; TÁRNOK et al., 1999). No entanto, os níveis das moléculas de adesão solúveis mensuradas e o curso evolutivo dos pacientes não foi diferente quando relacionados à gravidade do diagnóstico cardiológico dos pacientes.

A diversidade de diagnósticos cardiológicos poderia ser um fator limitante do estudo atual. Entretanto, os níveis das moléculas de adesão e a evolução clínica dos pacientes não apresentaram diferenças significativas em relação ao diagnóstico das patologias cardíacas.

A cinética das moléculas de adesão solúveis é desconhecida. Níveis elevados podem refletir o grau de síntese de molécula de adesão celular e a expressão de superfície destas moléculas, a taxa de quebra da superfície celular ou a eliminação diminuída (BLUME et al., 1997). Não foi possível, através dos dados do atual estudo, inferir qual o mecanismo implicado. Da mesma forma, é difícil estabelecer o grau de relação entre moléculas circulantes e a sua expressão nos tecidos, fato este que determina a sua função de adesão e migração de células inflamatórias para os tecidos.

Os perfis plasmáticos das moléculas de adesão solúveis ICAM-1 e VCAM-1 identificados no presente estudo aplicam-se a um grupo específico de pacientes. Ou seja, são atribuíveis somente a lactentes submetidos à cirurgias cardíacas para correção de defeitos cardíacos congênitos, com uso de CEC.

Finalmente, a ausência de um grupo controle pediátrico utilizando o mesmo *kit* de dosagem das moléculas pode ter sido também um fator limitante do estudo. Infelizmente, pela não disponibilidade de *kits* suficientes para um número maior de pacientes que incluísse lactentes normais, esta análise não foi estabelecida.

7. Implicações Futuras

Estudos futuros poderiam focar a correlação entre níveis circulantes de moléculas de adesão e sua expressão em tecidos, o que efetivamente determina o tráfego de células inflamatórias através do endotélio. Da mesma forma, seria de interesse determinar, com um grupo de pacientes suficiente para conferir força estatística, se existem diferenças entre

pacientes cianóticos e acianóticos. Os pacientes acianóticos apresentaram, neste estudo, um peso significativamente menor, o que pode se relacionar à presença de insuficiência cardíaca com hiperfluxo pulmonar. Um estudo demonstrou uma tendência a níveis maiores de ET-1 em lactentes acianóticos comparados a lactentes cianóticos após cirurgia cardíaca com CEC (DALLE MULLE et al., 2001).

Sendo assim, novos estudos devem ser delineados considerando o constante aumento de informações sobre modulação inflamatória e a sua interação nas diferentes situações clínicas, com o objetivo de compreender adequadamente os seus mecanismos e definir possíveis estratégias futuras com implicações terapêuticas.

TABELA 16. Crianças cardiopatas submetidas a cirurgias cardíacas com uso de CEC

VARIÁVEIS	ESTUDO ATUAL	BOLDT et al.	BLUME et al.	TÁRNOK et al.
NÚMERO DE PACIENTES	21	15	56	18
MÉDIA DE IDADE	6,6 meses (30 dv a 1 ano)	1,8 anos (1 semana dv a 5 anos)	1 ano (2 dv a 19 anos)	6,8 anos
MÉDIA DE PESO	5,8 Kg	9,0 Kg	-	-
PATOLOGIAS CARDÍACAS MAIS COMUNS	DSAV + TOF	TOF	CIV + TOF	CIA + CIV
CIANÓTICOS	57%	67%	37%	-
TEMPO CEC	87 min (mediana)	156 min (média)	91,5 min (mediana)	69 min (média)
TEMPO CLAMPEAMENTO AORTA	53 min (mediana)	85 min (média)	-	37 min (média)
TEMPO INTUBAÇÃO	72 horas (mediana)	Maioria extubada no 1º PO	21 horas (mediana)	-
USO DE INOTRÓPICOS	100%	66,7%	-	-
INFECÇÃO	71,4%	-	-	5,5%

Boldt et al. – Anesth Analg 1995;81:1129-35

Blume et al. – Circulation 1997;96(Suppl.II):II-352-II-7

Tárnok et al. – Pediatr Cardiol 1999;20:113-25

CONCLUSÕES

1. Os níveis plasmáticos basais das moléculas de adesão solúveis ICAM-1 e VCAM-1 são aumentados em lactentes com cardiopatias congênicas acianóticas e cianóticas, no seu estado basal, quando comparados aos valores existentes na literatura em pacientes adultos hígidos.
2. Os níveis plasmáticos das moléculas de adesão solúveis ICAM-1 e VCAM-1 estão diminuídos ao término da CEC e aumentam após exposição a este período, em lactentes submetidos à cirurgia cardíaca para correção de cardiopatias congênicas.
3. Não houve diferenças significativas entre os níveis plasmáticos das moléculas de adesão solúveis ICAM-1 e VCAM-1 entre pacientes acianóticos e cianóticos.
4. Não houve associação entre os níveis plasmáticos das moléculas de adesão solúveis ICAM-1 e VCAM-1 e as variáveis clínicas e hemodinâmicas dos pacientes submetidos ao estudo.
5. Não houve associação entre os níveis plasmáticos das moléculas de adesão solúveis ICAM-1 e VCAM-1 e o desfecho clínico dos pacientes participantes do estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. American College of Chest Physicians / Society of Critical Care Medicine Consensus Conference. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 1992;20:864-8.
2. Adams DH, Nash GB. Disturbance of leucocyte circulation and adhesion to the endothelium as factors in circulatory pathology. *Br J Anaesth* 1996;77:17-31.
3. Ashraf SS, Zacharrias YT, Cowan D, Martin P, Watterson K. Effects of cardiopulmonary bypass on neonatal and paediatric inflammatory profiles. *Eur J Cardiothorac Surg* 1997;12:862-8.
4. Asimakopoulos G, Taylor KM. Effects of cardiopulmonary bypass on leukocyte and endothelial adhesion molecules. *Ann Thorac Surg* 1998;66:2135-44.
5. Ballantyne CE, Mainolfi JB, Young NT. Prognostic value of increased levels of circulating intercellular adhesion molecule-1 after heart transplantation. *Clin Res* 1992;39:285A.
6. Baufreton C, Intrator L, Jansen PGM, Velthuis H, Le Besnerais P, Vonk A, et al. Inflammatory response to cardiopulmonary bypass using roller or centrifugal pumps. *Ann Thorac Surg* 1999;67:972-7.

7. Bevilacqua MP, Nelson RM. Selectins. *J Clin Invest* 1993;91:379-87.
8. Bevilacqua MP, Nelson RM, Mannori G, Cecconi O. Endothelial-leukocyte adhesion molecules in human disease. *Annu Rev Med* 1994;45:361-78.
9. Blume ED, Nelson DP, Gauvreau K, Walsh A, Plumb C, Neefeld EJ, et al. Soluble adhesion molecules in infants and children undergoing cardiopulmonary bypass. *Circulation* 1997;96(Suppl II):II-352-II-7.
10. Boldt J, Knothe C, Zickmann B, Wegw N. Aprotinin in pediatric cardiac operations: platelet function, blood loss, and use of homologous blood. *Ann Thorac Surg* 1993;55:1460-6.
11. Boldt J, Kumle B, Papsdorf M, Hempelmann G. Are circulating adhesion molecules specifically changed in cardiac surgical patients? *Ann Thorac Surg* 1998;65:608-14.
12. Boldt J, Osmer C, Linke LC, Dapper F, Hempelmann G. Circulating adhesion molecules in pediatric cardiac surgery. *Anesth Analg* 1995;81:1129-35.
13. Boldt J, Osmer C, Schindler E, Linke LC, Stertmann WA, Hempelmann G. Circulating adhesion molecules in cardiac operations: influence of high-dose aprotinin. *Ann Thorac Surg* 1995;59:100-5.

14. Boyle EM, Pohlman TH, Cornejo CJ, Verrier ED. Endothelial cell injury in cardiovascular surgery: ischemia-reperfusion. *Ann Thorac Surg* 1996;62:1868-75.
15. Boyle EM, Pohlman TH, Johnson MC, Verrier ED. Endothelial cell injury in cardiovascular surgery: the systemic inflammatory response. *Ann Thorac Surg* 1997;63:277-84.
16. Burns AS, De Guzman BJ, Newburger JW, Mayer JE. P-selectin expression in myocardium of children undergoing cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995;110:924-33.
17. Butler J, Chong GL, Baigrie RJ, Pillai R, Westaby S, Rocker GM. Cytokine responses to cardiopulmonary bypass with membrane and bubble oxygenation. *Ann Thorac Surg* 1992;53:833-8.
18. Butler J, Rocker GM, Westaby S. Inflammatory response to cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1993;55:552-9.
19. Castaneda AR, Mayer JE, Jonas RA, Lock JE, Wessel DL, Hickey PR. The neonate with critical congenital heart disease: repair – a surgical challenge. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1989;98:869-75.
20. Celi A, Lorenzet R, Furie B, Furie BC. Platelet-leukocyte-endothelial cell interaction on the blood vessel wall. *Semin Hematol* 1997;34:327-35.

21. Charpie JR, Dekeon MK, Goldberg CS, Mosca RS, Bove EL, Kulik TJ. Serial blood lactate measurements predict early outcome after neonatal repair or palliation for complex congenital heart disease. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000;120:73-80.
22. Cowley HC, Heney D, Gearing AJH, Hemingway I. Increased circulating adhesion molecule concentrations in patients with the systemic inflammatory response syndrome: a prospective cohort study. *Crit Care Med* 1994;22:651-7.
23. Cremer J, Martin M, Redl H, Bahrami S, Abraham C, Graeter T, et al. Systemic inflammatory response syndrome after cardiac operations. *Ann Thorac Surg* 1996;61:1714-20.
24. Cronstein BN, Weissmann G. The adhesion molecules of inflammation. *Arthritis Rheum* 1993;36(2):147-57.
25. Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, Zhu S, Chen M, Iiyama M, Davis V, et al. A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Invest* 2001;107:1255-62.
26. Dalle Mulle L, Botta A, Nogueira A, Delatorre N, Molossi S. Endothelin-1 levels positively correlates with outcome in infants undergoing open heart surgery. *Cardiol Young* 2001;11:84.

27. Davies CJ, Cooper SG, Fletcher ME, Hatch DJ, Helms PJ, Gordon I, et al. Total respiratory compliance in infants and young children with congenital heart disease. *Pediatr Pulmonol* 1990;8:155-61.
28. Davies MG, Hagen PO. The vascular endothelium. A New Horizon. *Ann Surg* 1993;218:593-609.
29. Dittrich S, Haas NA, Bühner C, Müller C, Dähnert I, Lange PE. Renal impairment in patients with long-standing cyanotic congenital heart disease. *Acta Paediatr* 1998;87:949-54.
30. Draaisma AM, Hazekamp MG, Frank M, Anes N, Schoof PH, Huysmans HÁ. Modified ultrafiltration after cardiopulmonary bypass in pediatric cardiac surgery. *Ann Thorac Surg* 1997;64:521-5.
31. Dupuis J, Stewart DJ, Cernacek P, Gosselin G. Human pulmonary circulation is an important site for both clearance and production of endothelin-1. *Circulation* 1996;94:1578-84.
32. Duval ELIM, Kavelaars A, Veenhuizen L, Vught AJ, Wal HJCM, Heijnen CJ. Pro- and anti-inflammatory cytokine patterns during and after cardiac surgery in young children. *Eur J Pediatr* 1999;158:387-93.

33. Edmunds LH. Inflammatory response to cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1998;66:S12-6.
34. Elgebaly AS, Houser SL, El Kerm AF, Doyle K. Evidence of cardiac inflammation after open heart operations. *Ann Thorac Surg* 1994;57:391-6.
35. Elliott M. Ultrafiltration and modified ultrafiltration in pediatric open heart operations. *Ann Thorac Surg* 1993;56:1518-22.
36. Endo S, Inada K, Kasai T, Takakuwa T, Yamada Y, Koike S, et al. Levels of soluble adhesion molecules and cytokines in patients with septic multiple organ failure. *J Inflamm* 1995;46:212-9.
37. Ernofsson M, Thelin S, Siegbahn A. Monocyte tissue factor expression, cell activation, and thrombin formation during cardiopulmonary bypass: a clinical study. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1997;113:576-84.
38. Finkel MS, Oddis CV, Jacob TD, Watkins SC, Hattler BG, Simmons RL. Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide. *Science* 1992;257:387-9.
39. Finn A, Naik S, Klein N, Levinsky RJ, Strobel S, Elliott M. Interleukin-8 release and neutrophil degranulation after pediatric cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993;105:234-41.

40. Fou AA. John H. Gibbon: the first 20 years of the heart-lung machine. *Tex Heart Inst J* 1997;24:1-8.
41. Gadaleta D, Mihran DJ. Pulmonary failure and the production of leukotrienes. *J Am Coll Surg* 1994;178:309-19.
42. Galea J, Rebeck N, Finn A, Manche A, Moat N. Expression of soluble endothelial adhesion molecules in clinical cardiopulmonary bypass. *Perfusion* 1998;13:314-21.
43. Galinanes M, Watson C, Trivedi U, Chambers DJ, Young CP, Venn GE. Differential patterns of neutrophil adhesion molecules during cardiopulmonary bypass in humans. *Circulation* 1996;94:364-9.
44. Gearing AJ, Hemingway I, Pigott R, Hughes J, Rees AS, Cashman SJ. Soluble forms of vascular adhesion molecules E-selectin, ICAM-1, and VCAM-1: pathological significance. *Ann NY Acad Sci* 1992;667:323-31.
45. Gearing AJH, Newman W. Circulating adhesion molecules in disease. *Immunol Today* 1993;14:506-12.
46. George JF, Kirklin JK, Naftel DC, Bourge RC, White-Williams C, McGiffin DC, et al. Serial measurements of interleukin-6, interleukin-8, tumor necrosis factor-alpha, and soluble vascular cell adhesion molecule-1 in the peripheral blood plasma of human cardiac allograft recipients. *J Heart Lung Transplant* 1997;16:1046-53.

47. Gilliland HE, Armstrong MA, McMurray TJ. The inflammatory response to pediatric cardiac surgery: correlation of granulocyte adhesion molecule expression with postoperative oxygenation. *Anesth Analg* 1999;89:1188-91.
48. Gillinov AM, Bator JM, Zehr KJ, Redmond JM, Burch RM, Ko C, et al. Neutrophil adhesion molecule expression during cardiopulmonary bypass with bubble and membrane oxygenators. *Ann Thorac Surg* 1993;56:847-53.
49. Gillinov AM, Redmond JM, Winkelstein JÁ, Zehr KJ, Herskowitz A, Baumgartner WA, et al. Complement and neutrophil activation during cardiopulmonary bypass: a study in the complement-deficient dog. *Ann Thorac Surg* 1994;57:345-52.
50. Gillinov AM, Redmond JM, Zehr KJ, Wilson IC, Curtis WE, Bator JM, et al. Inhibition of neutrophil adhesion during cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1994;57:126-33.
51. Grünenfelder J, Zünd G, Schoeberlein A, Maly FE, Schurr U, Guntli S, et al. Modified ultrafiltration lowers adhesion molecule and cytokine levels after cardiopulmonary bypass without clinical relevance in adults. *Eur J Cardiothorac Surg* 2000;17:77-83.
52. Grünenfelder J, Zünd G, Schoeberlein A, Schmid ER, Schurr U, Frisullo R, et al. Expression of adhesion molecules and cytokines after coronary artery bypass grafting during normothermic and hypothermic cardiac arrest. *Eur J Cardiothorac Surg* 2000;17:723-8.

53. Hall RI, Smith MS, Rucker G. The systemic inflammatory response to cardiopulmonary bypass: pathophysiological, therapeutic, and pharmacological considerations. *Anesth Analg* 1997;85:766-82.
54. Hatherill M, McIntyre AG, Wattie M, Murdoch IA. Early hyperlactataemia in critically ill children. *Intensive Care Medicine* 2000;26:314-8.
55. Henriques LS, Forte WCN. Alterações imunológicas pós-circulação extracorpórea. *Rev Bras Alerg Immunopatol* 2000;23:143-50.
56. Hill GE. Cardiopulmonary bypass-induced inflammation: is it important? *J Cardiothorac Vasc Anesth* 1998;12:21-5.
57. Hornick P, George A. Blood contact activation: pathophysiological effects and therapeutic approaches. *Perfusion* 1996;11:3-20.
58. Hsu LC. Biocompatibility in cardiopulmonary bypass. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 1997;11:376-82.
59. IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo de 1991. Rio Grande do Sul.
60. IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo de 1996. Rio Grande do Sul.

61. Ichinose F, Uezono S, Muto R, Uchida H, Hatori F, Terui K, et al. Platelet hyporeactivity in young infants during cardiopulmonary bypass. *Anesth Analg* 1999;88:258-62.
62. Ishikawa S, Miyauchi T, Sakai S, Ushinohama H. Elevated levels of plasma endothelin-1 in young patients with pulmonary hypertension caused by congenital heart disease are decreased after successful surgical repair. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995;110:271-3.
63. Jansen NJG, Van Oeveren W, Gu YJ, Van Vliet MH. Endotoxin release and tumor necrosis factor formation during cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1992;54:744-7.
64. Journois D, Pouard P, Greeley WJ, Mauriat P, Vouhé P, Safran D. Hemofiltration during cardiopulmonary bypass in pediatric cardiac surgery. Effects on hemostasis, cytokines, and complement activation. *Anesthesiology* 1994;81:1181-9.
65. Journois D, Povard P, Rolland B, Lagarde M. Ultrafiltration allows to reduce cytokine plasma contributions during pediatric cardiopulmonary bypass. *Contrib Nephrol* 1995;116:86-8.
66. Kalawski R, Bugajski P, Smielecki J, Wysocki H, Olszewski R, More R, et al. Soluble adhesion molecules in reperfusion during coronary bypass grafting. *Eur J Cardiothorac Surg* 1998;14:290-5.

67. Kaplanski G, Marin V, Fabrigoule M, Boulay V, Benoliel AM, Bongrand P, et al. Thrombin-activated human endothelial cells support monocyte adhesion in vitro following expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1; CD54) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1; CD106). *Blood* 1998;92:1259-67.
68. Kidd SA, Lancaster PAL, McCredie RM. The incidence of congenital heart defects in the first year of life. *J Paediatr Child Health* 1993;29:344-9.
69. Kilbridge PM, Mayer JE, Newburger JW, Hickey PR, Walsh AZ, Neufeld EJ. Induction of intercellular adhesion molecule-1 and E-selectin mRNA in heart and skeletal muscle of pediatric patients undergoing cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1994;107:1183-92.
70. Kirklin JK. Prospects for understanding and eliminating the deleterious effects of cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1991;51:529-31.
71. Komai H, Haworth SG. Effect of cardiopulmonary bypass on the circulating level of soluble GMP-140. *Ann Thorac Surg* 1994;58:478-82.
72. Laane KM, Meberg A, Otterstad JE, Froland G, Sorland S, Lindström B, et al. Quality of life in children with congenital heart defects. *Acta Paediatr* 1997;86:975-80.

73. Lanteri CJ, Kano S, Duncan AW, Sly PD. Changes in respiratory mechanics in children undergoing cardiopulmonary bypass. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:1893-900.
74. Lawson C, Ainsworth M, Yacoub M, Rose M. Ligation of ICAM-1 on endothelial cells leads to expression of VCAM-1 via a nuclear factor- κ B-independent mechanism. *J Immunol* 1999;162:2990-6.
75. LeBlanc JG, Russell JL. Pediatric cardiac surgery in the 1990s. *Surg Clin North Am* 1998;78:729-47.
76. Le Deist F, Menasche P, Kucharski C, Bel A, Piwnica A, Bloch G. Hypothermia during cardiopulmonary bypass delays but does not prevent neutrophil-endothelial cell adhesion. A clinical study. *Circulation* 1995;92:354-8.
77. Ley K, Huo Y. VCAM-1 is critical in atherosclerosis. *J Clin Invest* 2001;107:1209-10.
78. Li H, Cybulsky MI, Gimbrone MA, Libby P. Inducible expression of vascular cell adhesion molecule-1 by vascular smooth muscle cells *in vitro* and within rabbit atheroma. *Am J Pathol* 1993;143:1551-9.
79. Li JM, Hajarizadeh H, La Rosa CA, Rohrer MJ, Vander Salm TJ, Cutler BS. Heparin and protamine stimulate the production of nitric oxide. *J Cardiovasc Surg* 1996; 37:445-52.

80. Liebold A, Keyl C, Birnbaum DE. The heart produces but the lungs consume proinflammatory cytokines following cardiopulmonary bypass. *Eur J Cardiothorac Surg* 1999;15:340-5.
81. Lotan D, Prince T, Dagan O, Keller N, Bem-Abraham R, Weinbroum A, et al. Soluble P-selectin and the postoperative course following cardiopulmonary bypass in children. *Paediatr Anaesth* 2001;11:303-8.
82. Markewitz A, Faist E, Lang S, Endres S, Fuchs D, Reichart B. Successful restoration of cell-mediated immune response after cardiopulmonary bypass by immunomodulation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993;105:15-24.
83. Michael JR, Markewitz BA. Endotelins and the lung. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:555-81.
84. Millar AB, Armstrong L, Van Der Linden J, Moat N. Cytokine production and hemofiltration in children undergoing cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1993;56:1499-502.
85. Miller BE, Levy JH. The inflammatory response to cardiopulmonary bypass. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 1997;11:355-66.

86. Miller BE, Mochizuki T, Levy JH, Bailey JM, Tosone SR, Tam VKH, et al. Predicting and treating coagulopathies after cardiopulmonary bypass in children. *Anesth Analg* 1997;85:1196-202.
87. Naik SK, Knight A, Elliott M. A prospective randomized study of a modified technique of ultrafiltration during pediatric open-heart surgery. *Circulation* 1991;84:422-31.
88. Nilsson L, Kulander L, Nystrom SO, Eriksson O. Endotoxins in cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1990;100:777-80.
89. Nolan SP, Zacour R, Dammann JF. Reflections on the evolution of cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1997;64:1540-3.
90. Ohkawa F, Ikeda U, Kanbe T, Kawasaki K, Shimada K. Effects of inflammatory cytokines on vascular tone. *Cardiovasc Res* 1995;30:711-5.
91. Osmer C, Linke LC. Hypothermic versus normothermic cardiopulmonary bypass: influence on circulating adhesion molecules. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 1996;10:342-7.
92. Paret G, Prince T, Keller N, Dagan O, Sasson Y, Barzilai A, et al. Plasma-soluble E-selectin after cardiopulmonary bypass in children: is it a marker of the postoperative course? *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2000;14:433-7.

93. Partrick DA, Moore FA, Moore EE, Biffl WL, Savaia A, Barnett CC. The inflammatory profile of interleukin-6, interleukin-8, and soluble intercellular adhesion molecule-1 in postinjury multiple organ failure. *Am J Surg* 1996;172:425-31.
94. Pesonen EJ, Korpela R, Peltola K, Leijala M. Regional generation of free oxygen radicals during cardiopulmonary bypass in children. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995;110:768-73.
95. Petaejae J, Lundstroem U, Leijala M, Peltola K. Bleeding and use of blood products after heart operations in infants. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995;109:524-9.
96. Peynet J, Carreno MP, Chaumaray T, Dilisse V, Faris B, Bloch G, et al. Influence of temperature on neutrophil trafficking during clinical cardiopulmonary bypass. *Circulation* 1995;92:334-40.
97. Pober JS, Cotran RS. The role of endothelial cells in inflammation. *Transplantation* 1990;50:537-44.
98. Riddington DW, Venkatesh B, Boivin CM, Bonser RS, Elliott TSJ, Marshall T, et al. Intestinal permeability, gastric intramucosal pH, and systemic endotoxemia in patients undergoing cardiopulmonary bypass. *JAMA* 1996;275:1007-12.
99. Rinder CS, Bonan JL, Rinder HM, Mathew J, Hines R, Smith BR. Cardiopulmonary bypass induces leukocyte-platelet adhesion. *Blood* 1992;79:1201-5.

100. Rinder CS, Gaal D, Student LA, Smith BR. Platelet-leukocyte activation and modulation of adhesion receptors in pediatric patients with congenital heart disease undergoing cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1994;107:280-8.
101. Rocke DA, Gaffin SL, Wells MT, Koen Y, Brock-Utine JG. Endotoxemia associated with cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1987;93:832-7.
102. Rothlein R, Mainolfi EA, Czajkowski M, Marlin SD. A form of circulating ICAM-1 in human serum. *J Immunol* 1991;147:3788-93.
103. Royston D. The inflammatory response and extracorporeal circulation. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 1997;11:341-54.
104. Ruvolo G, Greco E, Speziale G, Tritapepe L. Nitric oxide formation during cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1994;57:1055-6.
105. Samango-Sprouse C, Suddaby EC. Developmental concerns in children with congenital heart disease. *Curr Opin Cardiol* 1997;12:91-8.
106. Sawa Y, Shimazaki Y, Kadoba K, Masai T, Fukuda H, Ohata T, et al. Attenuation of cardiopulmonary bypass-derived inflammatory reactions reduces myocardial reperfusion injury in cardiac operations. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996;111:29-35.

107. Seghaye MC, Duchateau J, Bruniaux J, Demontoux S, Bosson C, Serraf A, et al. Interleukin-10 release related to cardiopulmonary bypass in infants undergoing cardiac operations. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996;111:545-53.
108. Seghaye MC, Duchateau J, Grabitz RG, Faymonville ML, Messmer BJ, Buro-Rathsmann K, et al. Complement activation during cardiopulmonary bypass in infants and children. Relation to postoperative multiple system organ failure. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993;106:978-87.
109. Seghaye MC, Duchateau J, Grabitz RG, Nitsch G. Complement, leukocytes, and leukocyte elastase in full-term neonates undergoing cardiac operation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1994;108:29-36.
110. Sessler CN, Windsor AC, Schwartz M, Watson L, Fisher BJ, Sugerman HJ, et al. Circulating ICAM-1 is increased in septic shock. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151:1420-7.
111. Sessler CN, Windsor AC, Watson L, Schwartz M, Fowler AA. Soluble ICAM-1 receptor levels are increased in human septic shock. *Chest* 1993;104:11S.
112. Seth R, Raymond FD, Makgoba MW. Circulating ICAM-1 isoforms: diagnostic prospects for inflammatory and immune disorders. *Lancet* 1991;338:83-4.

113. Shimizu Y, Newman W, Tanaka Y, Shaw S. Lymphocyte interactions with endothelial cells. *Immunol Today* 1992;13:106-12.
114. Siegel LB, Dalton HJ, Hertzog JH, Hopkins RA, Hannan RL, Hauser GJ. Initial postoperative serum lactate levels predict survival in children after open heart surgery. *Int Care Med* 1996;22:1418-23.
115. Singh HP, Coleman ET, Hargrove M, Barrow SE, Murphy MB, Aherne T. Prostacyclin and thromboxane levels in pleural space fluid during cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1995;59:647-50.
116. Smeeton NC, Rona RJ, Sharland G, Botting BJ, Barnett A, Dundas R. Estimating the prevalence of malformation of the heart in the first year of life using capture-recapture methods. *Am J Epidemiol* 1999;150:778-85.
117. Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 1990;346:425-34.
118. Srivastava D. Developmental and genetic aspects of congenital heart disease. *Curr Opin Cardiol* 1999;14:263-8.
119. 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.

120. Stewart M, Thiel M, Hogg N. Leukocyte integrins. *Curr Opin Cell Biol* 1995;7:690-6.
121. Suffredini AF, Fromm RE, Parker MM, Brenner M, Kovacs JÁ, Wesley RA, et al. The cardiovascular response of normal humans to the administration of endotoxin. *N Engl J Med* 1989;321:280-7.
122. Tárnok A, Hambsch J, Emmrich F, Sack U, Son J, Bellinghausen W, et al. Complement activation, cytokines, and adhesion molecules in children undergoing cardiac surgery with or without cardiopulmonary bypass. *Pediatr Cardiol* 1999;20:113-25.
123. Taylor PM, Rose ML, Yacoub MH, Pigott R. Induction of vascular adhesion molecules during rejection of human cardiac allografts. *Transplantation* 1992;54:451-7.
124. Tonz M, Mihaljevic T, von Segesser LK, Fehr J, Schmid ER, Turina MI. Acute lung injury during cardiopulmonary bypass: are the neutrophils responsible? *Chest* 1995;108:1551-6.
125. Tsutamoto T, Hisanaga T, Fukai D, Wada A, Maeda Y, Maeda K, et al. Prognostic value of plasma soluble intercellular adhesion molecule-1 and endothelin-1 concentration in patients with chronic congestive heart failure. *Am J Cardiol* 1995;15:803-8.

126. Verrier ED, Morgan EN. Endothelial response to cardiopulmonary bypass surgery. *Ann Thorac Surg* 1998;66:S17-9.
127. Walsh AZ, Mayer JE, Newburger JW, Burns AS, Xiao M, Neufeld EJ. Induction of interleukin-8 messenger RNA in heart and skeletal muscle during pediatric cardiopulmonary bypass. *Circulation* 1995;92:315-21.
128. Wan S, LeClerc JL, Vincent JL. Cytokine responses to cardiopulmonary bypass: lessons learned from cardiac transplantation. *Ann Thorac Surg* 1997;63:269-76.
129. Wan S, LeClerc JL, Vincent JL. Inflammatory response to cardiopulmonary bypass. Mechanisms involved and possible therapeutic strategies. *Chest* 1997;112:676-92.
130. Wang MJ, Chiu IS, Hsu CM, Wang CM, Lin PL, Chang CI, et al. Efficacy of ultrafiltration in removing inflammatory mediators during pediatric cardiac operations. *Ann Thorac Surg* 1996;61:651-6.
131. Watanabe T, Sakai Y, Mayumi T, Shimomura T, Song MH, Tajima K, et al. Effect of ultrafiltration during cardiopulmonary bypass for pediatric cardiac surgery. *Artif Organs* 1998;22:1052-5.
132. Yagel S, Weissman A, Rotstein Z, Manor M, Hegesh J, Anteby E, et al. Congenital heart defects. Natural course and in utero development. *Circulation* 1997;96:550-5.

133. Yau KI, Fang LJ, Wu MH. Lung mechanics in infants with left-to-right shunt congenital heart disease. *Pediatr Pulmonol* 1996;21:42-7.

134. Youker KA, Hawkins HK, Kukielka GL, Perrard JL, Michael LH, Ballantyne CM, et al. Molecular evidence for induction of intracellular adhesion molecule-1 in the viable border zone associated with ischemia-reperfusion injury of the dog heart. *Circulation* 1994;89:2736-46.

135. Zehr KJ, Poston RS, Lee PC, Uthoff K, Kumar P, Cho PW, et al. Platelet activating factor inhibition reduces lung injury after cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1995;59:328-35.

ANEXO 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

A criança que nasce com defeitos no coração muitas vezes necessita logo de cirurgia, a fim de que ela possa crescer e se desenvolver adequadamente. Alguns dos problemas que ocorrem após a cirurgia cardíaca derivam do uso de uma máquina que funciona como coração e pulmões da criança durante a cirurgia (circulação extracorpórea).

O objetivo desta pesquisa é definir o papel de certas substâncias liberadas no sangue durante a circulação extracorpórea (chamadas de ICAM-1 e VCAM-1) e suas influências sobre os acontecimentos no período pós-operatório. Para que isto seja feito é necessário coletar um volume de sangue adicional junto com as coletas de rotina (2,0 ml). Este volume de sangue é pequeno e não causa risco de vida à criança. Será mantido sigilo das informações coletadas e os dados serão apresentados em conjunto com os dos demais pacientes. Se ocorrer desistência da participação no estudo, não haverá de forma alguma restrições ao tratamento do paciente.

Eu,, responsável pelo paciente....., fui informado dos objetivos especificados acima e da justificativa desta pesquisa, de forma clara e detalhada. Recebi informações específicas sobre o procedimento no qual meu filho ou tutelado estará envolvido e os desconfortos ou riscos previstos, tanto quanto sobre os benefícios esperados. Todas as minhas dúvidas foram esclarecidas e sei que poderei solicitar novas informações a qualquer momento.

Declaro, para todos os fins, que autorizo a inclusão de meu filho ou tutelado no estudo realizado pela Dra. Angela Hunsche.

Porto Alegre,de.....de 199.... .

Assinatura do responsável:.....

Assinatura da investigadora - Dra Angela Hunsche:.....

Assinatura da orientadora - Dra Silvana Molossi:.....