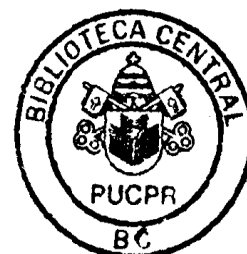


**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
CCBS – CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE MESTRADO EM CLÍNICA CIRÚRGICA**

FLORA ELI MELEK

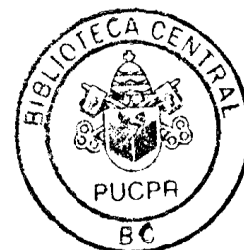


**AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO E DA REAÇÃO INFLAMATÓRIA EM
PACIENTES SUBMETIDOS À CIRURGIA DE REVASCULARIZAÇÃO
MIOCÁRDICA COM CIRCULAÇÃO EXTRACORPÓREA**

CURITIBA

2009

FLORA ELI MELEK



**AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO E DA REAÇÃO INFLAMATÓRIA EM
PACIENTES SUBMETIDOS À CIRURGIA DE REVASCULARIZAÇÃO MIOCÁRDICA
COM CIRCULAÇÃO EXTRACORPÓREA CURITIBA 2009**

**Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do grau de Mestre, ao Programa
de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica, da
Pontifícia Universidade Católica do Paraná.**

Orientador: Prof. Dr. Dalton B. Précoma

CURITIBA

2009

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central

M519a
2009

Melek, Flora Eli

Avaliação do estresse oxidativo na circulação extracorpórea em pacientes submetidos à cirurgia de revascularização miocárdica / Flora Eli Melek ; orientador, Dalton B. Précoma. -- 2009.
64 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2009
Bibliografia: f. 49-54

1. Coração – Cirurgia. 2. Stress oxidativo. 3. Circulação extracorpórea. 4. Revascularização miocárdica. 5. Óxido nítrico. I. Précoma, Dalton Bertolin. II. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica. III. Título.

CDD 20. ed. – 617.412

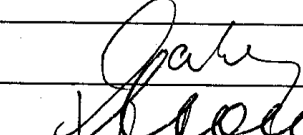
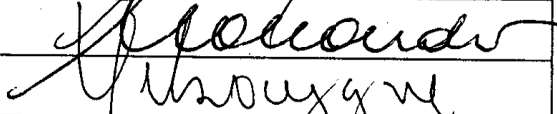
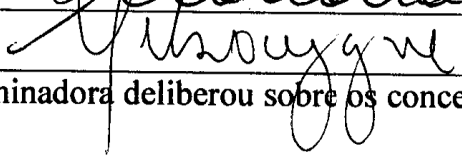


ATA DA SESSÃO DE EXAME DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA AO NÍVEL DE MESTRADO DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

ATA DE DISSERTAÇÃO Nº 44

Aos vinte dias do mês de agosto de 2009, realizou-se a sessão de defesa de dissertação “**AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES SUBMETIDOS À CIRURGIA DE REVASCULARIZAÇÃO MIOCÁRDICA SOB CIRCULAÇÃO EXTRACORPÓREA**” Área de Concentração: Aplicação de Recursos Tecnológicos em Cirurgia, apresentada por **Flora Eli Melek** sob orientação do **Prof. Dr. Dalton Bertolim Précoma**, para obtenção do título de mestre.

A Banca Examinadora foi composta pelos seguintes professores:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Prof. Dr. Carlos Alberto Engelhorn	
Prof. Dr. Leonardo Andrade Mulinari	
Prof. Dr. Nelson Itiro Miyague	

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Prof. Dr. Carlos Alberto Engelhorn

Avaliação: Aprovada

Prof. Dr. Leonardo Andrade Mulinari

Avaliação: Aprovada

Prof. Dr. Nelson Itiro Miyague

Avaliação: Aprovada

Parecer Final: APROVADA

Observações da Banca Examinadora:

O título será conferido após a publicação do artigo em revista indexada.

Prof. Dr. Luiz Carlos Von Bahten

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia

*Dedico à minha família que sempre acreditou no
"primeiro passo" e em especial ao meu esposo,
amor de todas as horas, que caminha ao meu lado.*

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Dalton Bertolin Précoma, meu orientador, colega e amigo que sempre me incentivou e acreditou na realização desta dissertação.

Ao Professor Doutor João Carlos Repka, que colaborou na execução da pesquisa e foi fundamental na realização das dosagens realizadas.

Ao Hospital e Maternidade Angelina Caron, que proporcionou, com seu centro de pesquisa, o local para a realização deste trabalho.

À equipe de cirurgia cardíaca do Dr. Celso Soares do Nascimento, que gentilmente realizou as coletas de material necessário, bem como aos anestesiólogistas, intensivistas, enfermagem e perfusionistas.

À Pontifícia Universidade Católica Do Paraná, portal para tantos conhecimentos.

Um agradecimento especial aos pacientes que colaboraram sem restrições e favoreceram a realização desta pesquisa.

*Suba o primeiro degrau com fé.
Não é necessário que você veja toda escada.
Apenas dê o primeiro passo.*

Martin Luther King Júnior
(1929-1968)

RESUMO

Introdução: a cirurgia cardíaca necessita, freqüentemente, da circulação extracorpórea (CEC) para sua realização. Quando se faz a combinação de CEC e estresse cirúrgico tem-se o início de resposta inflamatória sistêmica. Desta forma, ativa tanto a cascata humoral como a celular, as quais se somam períodos de isquemia-reperfusão ocasionados pela CEC, gerando assim, condição favorável para a formação de radicais livres, também conhecidos como substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), bem como a liberação de proteínas de fase aguda como a proteína C reativa (PCR). Estes radicais livres induzem situações de desequilíbrio descritas como estresse oxidativo. **Objetivo:** avaliar os níveis de TBARS e PCR circulantes em pacientes submetidos às cirurgias de revascularização miocárdica com CEC. **Casuística e Método:** foram pré-selecionados 276 pacientes portadores de doença arterial coronariana grave comprovada por cineangiocoronariografia, com plano de cirurgia de revascularização miocárdica com CEC. Foram aplicados critérios de inclusão e exclusão e a amostra final foi constituída de 25 pacientes com idade média de $61,16 \pm 9,73$ anos e predomínio do sexo masculino (65%). Foram coletadas amostras de sangue e separou-se o soro para as dosagens de TBARS e PCR em três momentos: T_0 antes da CEC, T_{10} no décimo minuto da CEC e T_{30} no trigésimo minuto. Foram aplicados os métodos estatísticos de análise de variância com medidas repetidas e o teste de t-Student. Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística. **Resultado:** houve aumento nas dosagens de TBARS após a CEC ($p = 0,001$), com valores médios em $T_0 = 1,503 \pm 0,074$, em $T_{10} = 5,538 \pm 0,353$ e $T_{30} = 3,358 \pm 0,289$ mmoles/mg de proteína sérica. As dosagens de PCR nas amostras iniciais (T_0) foram negativas em todas as amostras, em T_{10} apresentaram média de $0,956 \pm 0,67$ mg/dl e em T_{30} média de $0,999 \pm 0,76$ mg/dl. Não houve diferença significativa entre as dosagens em T_{10} e T_{30} ($p = 0,8301$). **Conclusão:** os níveis de TBARS e PCR apresentaram elevação progressiva nos dois tempos da CEC, com valor máximo no trigésimo minuto.

Palavras-chave: Estresse oxidativo. Cascata inflamatória. Circulação extracorpórea. Óxido nítrico. Revascularização miocárdica .

ABSTRACT

Introduction: Frequently, heart surgery requires extracorporeal circulation (ECC). The combination of ECC and surgical stress starts a systemic inflammatory response. As a consequence, it activates both the humoral and cellular cascades, and in addition it happens periods of ischemia-reperfusion caused by the ECC thus creating an environment favorable to free radical formation, also known as thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), and to the liberation of acute phase protein such as the C-reactive protein (CRP). Those free radicals induce unbalanced situations described as oxidizing stresses. **Objective:** Assessing the circulating TBARS and CRP levels in patients subjected to myocardium revascularization surgery with ECC. **Casuistry and Method:** Analysis of 276 patients with severe coronary disease diagnosed through cineangiocardiology and planned to have a myocardium revascularization surgery with ECC. Inclusion-exclusion criteria determined a final sample of 25 patients. There was a predominance of male patients (65%) over female patients and the average age was $61,16 \pm 9,73$ years. After collecting blood samples, serum was separated from blood to prepare the dosages of the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in three different moments: T_0 before ECC; T_1 in the ECC tenth minute and T_2 in the ECC thirtieth minute. The study used statistic variance analysis with repeated measurements, and the t-Student test. The $p < 0,05$ values indicated statistical significance. **Results:** The TBARS dosages increased after ECC ($p = 0.001$), with average values in $T_0 = 1.503 \pm 0.074$, in $T_{10} = 5.538 \pm 0.353$ and $T_{30} = 3.358 \pm 0,289$ mmoles/mg of serum protein. The PCR dosages in the initial samples (T_0) were negative in all samples, in T_{10} average was 0.956 ± 0.67 mg/dl and in T_{30} with an average of 0.999 ± 0.76 mg/dl. There was no significant differences between the dosages in T_{10} and T_{30} ($p = 0,8301$). **Conclusion:** the TBARS and CRP levels showed progressive increase in the ECC two moments, with maximum value in the thirtieth minute.

Key-words: Oxidizing stress; inflammatory cascade; extracorporeal circulation; nitric acid; myocardium revascularization .

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema representativo do circuito básico da circulação extracorpórea com oxigenador de membranas	18
Figura 2 - Diagrama demonstrativo das possíveis alterações sistêmicas ocasionadas pela CEC.....	21
Figura 3 - Estrutura química do TBA	27
Figura 4 - Máquina de CEC modelo ECOBEC-Braile Biomédica, código 35824.	31
Gráfico 1 - Médias e desvios-padrão das dosagens de TBARS (mmoles/mg de proteína sérica) nas 25 amostras de sangue coletadas em T0, T10 e T30	37
Gráfico 2 - Médias e desvios-padrão das dosagens de PCR (mg/dl) nas 25 amostras de sangue coletadas em T0, T10 e T30	38
Gráfico 3 - Demonstrativo simultâneo entre as médias e desvios padrões das dosagens de MDA e PCR em T0, T10 e T30	39

LISTA DE SÍMBOLOS E SIGLAS

ACTH	- Hormônio adrenocorticotrófico
ANOVA	- One-Way Analysis of Variance
CCS	- Canadian Cardiology Society
CEC	- Circulação extracorpórea
CHP	- Crise hipertensiva pulmonar
DAC	- Doença arterial coronariana
EROS	- Espécies reativas de oxigênio
ETT	- Ecocardiografia transtorácica
GH	- Hormônio do crescimento
H ² O ²	- Peróxido de hidrogênio
HO	- Hipótese nula
HOCl	- Ácido hipocloroso
IAM	- Infarto agudo do miocárdio
IFCC	- Federação Internacional de Química Clínica
IL	- Interleucinas
iNOS	- Óxido nítrico sintase
LPO	- Lipoperoxidação oxidativa
MDA	- Malondialdeído
NAC	- N-acetilcisteína
NaCl	- Cloreto de sódio
NO	- Óxido nítrico
NOi	- Óxido nítrico inalatório
NYHA	- New York Heart Association
O ²⁻	- Superóxido
OH ⁻	- Hidroxila
PCR	- Proteína C reativa
PEG	- Polietilenoglicol
ppm	- Pressões por minuto
PVC	- Policloreto de vinila
RM	- Revascularização miocárdica

- SIRS - Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
- TBARS - Substâncias redutoras do ácido tiobarbitúrico
- TC - Transplante cardíaco
- TNF - Fator de necrose tumoral
- UTI - Unidade de Terapia Intensiva

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	15
3	REVISÃO DA LITERATURA	16
3.1	HISTÓRICO DA CIRURGIA CARDÍACA	16
3.2	A CIRCULAÇÃO EXTRACORPÓREA	17
3.3	A SÍNDROME PÓS-PERFUSÃO	19
3.4	ISQUEMIA-REPERFUSÃO, ESTRESSE OXIDATIVO E CEC	24
3.5	O TBARS	27
3.6	PROTEÍNA C REATIVA	28
3.7	ALTERAÇÕES ENDÓCRINAS OCASIONADAS PELA CEC	29
4	CASUÍSTICA E MÉTODO	30
4.1	DELINEAMENTO DO ESTUDO	30
4.2	PRÉ-OPERATÓRIO	30
4.3	INTRA-OPERATÓRIO	31
4.4	ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS DE SANGUE	32
4.5	MÉTODO DA DOSAGEM DE SUBSTÂNCIAS REDUTORAS DO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)	32
4.5.1	Reagentes	33
4.5.2	Procedimentos	33
4.6	MÉTODO DE DOSAGEM DA PROTEÍNA C REATIVA	33
4.6.1	Reagentes	34
4.6.2	Procedimentos	34
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
5	RESULTADOS	36
5.1	A POPULAÇÃO AVALIADA	36
5.2	DOSAGENS DE TBARS	36
5.3	AVALIAÇÃO DAS DOSAGENS DE PCR	37
5.4	ANÁLISE SIMULTÂNEA ENTRE AS DOSAGENS DE PCR E TBARS	38
6	DISCUSSÃO	40
6.1	A PADRONIZAÇÃO DA AMOSTRA E PROCEDIMENTOS	40

6.2	AS DOSAGENS DE TBARS.....	41
6.3	AS DOSAGENS DE PROTEÍNA C REATIVA.....	43
6.4	O TEMPO DE CEC.....	45
7	CONCLUSÕES.....	48
	REFERÊNCIAS.....	49
	ANEXO A - PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS DO HOSPITAL ANGELINA CARON	55
	ANEXO B - RELAÇÃO DE PACIENTES INCLUÍDOS	57
	ANEXO C - QUADRO DOS RESULTADOS DAS DOSAGENS EM TRIPLICATA DE TBARS(MDA) EM NANOMOLES/MG DE PROTEÍNA, MÉDIAS, DESVIOS PADRÕES E AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA PELO TESTE DE ANOVA (1, 2, E 3)	58
	ANEXO D - QUADRO DOS RESULTADOS DAS DOSAGENS DE PROTEÍNA C REATIVA (PCR) EM mg/dl, MÉDIAS, DESVIOS PADRÕES E AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA PELO TESTE DE T- STUDENT	62

1 INTRODUÇÃO

A cirurgia cardíaca é uma especialidade que evoluiu por meio de conhecimentos acumulados desde meados do século XX, aliados aos progressos tecnológicos incorporados à prática médica, contribuindo para significativa redução nos índices de morbidade e mortalidade¹.

A moderna era da cirurgia cardíaca teve seu início quando a técnica para circulação extracorpórea (CEC) foi introduzida nos primórdios da década de 1950. Foi o emprego da CEC o grande responsável pelo alcance de significativa redução na mortalidade, uma vez que com ela, as cirurgias cardíacas tornaram-se mais seguras e cardiopatias mais complexas puderam ser abordadas, com grande proteção cardíaca e cerebral com técnicas cirúrgicas *per se* aliadas aos cuidados peri e pós-operatórios^{2, 3, 4}.

O emprego da técnica cirúrgica com CEC, trouxe conceitos novos como a "síndrome pós-perfusão", que é uma complicação decorrente de vários fatores. Entre eles, os principais são⁵:

- a) Contato do sangue com a superfície não endotelizada do circuito de CEC;
- b) Reações leucocitárias pulmonares após o clampeamento da aorta;
- c) Translocação de endotoxinas bacterianas para a área cardíaca isquêmica em consequência da reperfusão;
- d) Ativação da coagulação, fibrinólise, caliceínas e sistema de complemento.

Mesmo com os avanços alcançados, o eventual insucesso de uma cirurgia cardíaca é decorrente da grande complexidade desta e também por haver uma gama de cardiopatias encontradas. Havendo distintos mecanismos fisiopatológicos podem ocorrer falhas no reconhecimento rápido da falta de perfusão miocárdica. As manifestações clínicas na síndrome pós-perfusão são resultantes do sinergismo de alterações, como os distúrbios de coagulação, as alterações neurológicas e em casos extremos, a falência de múltiplos órgãos. Acredita-se que o controle da síndrome pós-perfusão possa interferir na redução da mortalidade pós-operatória⁵.

Entre as causas das alterações orgânicas associadas à síndrome pós-perfusão podemos ter reações induzidas por espécies reativas de oxigênio (EROS), produzidas após o processo de isquemia e reperfusão tecidual. Há ainda o bloqueio de mecanismos bioquímicos para a eliminação dos EROS, induzindo assim o estresse oxidativo⁶.

Lorrain-Smith em 1899, citado por Lima et al., já havia mencionado os possíveis efeitos tóxicos do oxigênio sobre componentes celulares. Atualmente, sabe-se que estes efeitos são resultantes das reações de oxidação causadas por EROS, conhecidas genericamente como radicais livres, com os ácidos graxos poliinsaturados presentes em compartimentos celulares^{6, 7}.

A formação de EROS ocorre naturalmente durante a respiração celular através redução do oxigênio. Na normalidade são neutralizadas pelos antioxidantes, porém em algumas situações, pode ocorrer desequilíbrio entre formas oxidantes e antioxidantes. O estresse oxidativo pode afetar todos os componentes celulares, porém a membrana é um dos mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica, que acarreta alterações na sua estrutura e permeabilidade^{7, 8}.

Entre os produtos da peroxidação lipídica, figuram as substâncias reativas do ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), que são utilizados como indicadores da ação dos radicais livres no organismo^{9,10}. A sua quantificação é um parâmetro importante para avaliação do estresse oxidativo celular¹¹. O TBARS tem ação citotóxica e genotóxica, encontrando-se em níveis elevados em algumas doenças associadas ao estresse oxidativo, com destaque aos quadros inflamatórias^{12,13,14}.

As reações inflamatórias são respostas do organismo aos diferentes tipos de agressões teciduais, como as infecções virais, bacterianas, parasitárias ou fúngicas, e às agressões físicas, imunológicas e químicas. Um dos marcadores séricos da resposta inflamatória é a proteína C reativa (PCR) e sua presença é um sinal significativo de processo patológico. Trata-se de uma proteína imunologicamente anômala, caracterizada pela capacidade de precipitar-se frente ao polissacarídeo C somático isolado do pneumococo. Diante da reação inflamatória, os monócitos secretam substâncias como interleucinas 1 (IL-1), interleucinas 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral (TNF), que levam o hepatócito à informação da necessidade de síntese das denominadas proteínas de fase aguda. A determinação da concentração plasmática dessas proteínas auxilia a avaliação clínica da presença, da extensão e da atividade do processo inflamatório e também a monitorar a evolução e a resposta terapêutica^{15, 16}.

2 OBJETIVOS

Avaliação do estresse oxidativo e da reação inflamatória em pacientes submetidos a cirurgia de revascularização miocárdica com o auxílio de CEC, pelas dosagens de TBARS e PCR.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 HISTÓRICO DA CIRURGIA CARDÍACA

Os estudos a respeito do coração são encontrados ainda no Antigo Egito onde manuscritos de Medicina já descreviam a anatomia e fisiologia deste órgão. Entre vários povos o coração também foi utilizado para sacrifícios em rituais pagãos o que demonstra o misticismo que envolve este órgão. Na Idade Média, também conhecida como Idade das Trevas, houve escassa evolução na medicina, impedindo maiores conhecimentos¹.

Com o Renascimento, tratados anatômicos foram editados a partir da invenção da imprensa e cientistas contribuíram de forma significativa para a evolução da Medicina¹.

A história da cirurgia cardíaca remonta ao ano de 1810 com Romero, na Espanha, que foi quem realizou uma drenagem cirúrgica do pericárdio. Em 1896, Rehn procedeu, com sucesso, sutura em uma laceração cardíaca. Paget et al., em 1896, rejeitaram os relatos descritos de cirurgias cardíacas e afirmaram ainda, contrapondo-se a esses, que os procedimentos deveriam ser realizados apenas em animais, reforçando assim o mito na abordagem do coração².

No decorrer da década de 1930, buscavam-se abordagens cirúrgicas para a correção do canal arterial persistente, mas não havia segurança no procedimento, pois os estudos disponíveis embasavam-se apenas em achados de necrópsias².

O marco inicial da era moderna da cirurgia cardíaca deu-se em 1939, em Boston, com Gross et al., que realizaram a ligadura do canal arterial em uma criança. O segundo grande evento da cirurgia cardíaca ocorreu em 1944 com Blalock et al., que iniciaram o tratamento cirúrgico para os casos de Tetralogia de Fallot^{2, 3}.

O número de óbitos observado em cirurgias cardíacas era elevado, o que fez com que Dr. George Geckeler manifestar-se de forma incisiva "[...] É meu dever de Cristão não permitir mais que estas operações homicidas sejam realizadas [...]". Contudo, não impediu que Bailey realizasse, em junho de 1948, a primeira comissurotomia mitral, com sucesso. Foi este um momento histórico para a cirurgia cardíaca e muitos seguiram seus passos em vários centros de referência do mundo para que se pudesse chegar aos dias atuais com cirurgias complexas e seguras³.

Juntamente com as evoluções das técnicas cirúrgicas, avançaram os métodos diagnósticos, as técnicas de hipotermia e de CEC³.

Gibbon et al., em 1953, foram os primeiros a realizar, com sucesso, o fechamento de defeito de septo interatrial com o emprego de CEC. Suas pesquisas em busca de um oxigenador já ocorriam desde 1937. Após o início do uso da CEC e com a progressão das cirurgias para correção de cardiopatias congênitas, passou-se a pensar em próteses para os problemas valvares^{2,3,4}.

Em maio de 1967, sob a orientação de Favaloro et al., ocorreu a primeira cirurgia para tratamento das obstruções coronarianas sob CEC e assim, deu-se início à utilização das pontes de safena².

3.2 A CIRCULAÇÃO EXTRACORPÓREA

A CEC é um conjunto de equipamentos composto por circuitos, bombas propulsoras, oxigenadores de membrana e outros elementos os quais substituem temporariamente, durante o ato cirúrgico, as funções do coração e dos pulmões, enquanto esses órgãos ficam excluídos da circulação⁴.

Através da CEC, o bombeamento cardíaco é desempenhado por uma bomba mecânica e as trocas gasosas no sangue é feita por um equipamento capaz de realizar a função pulmonar (figura 1)^{3,4}.

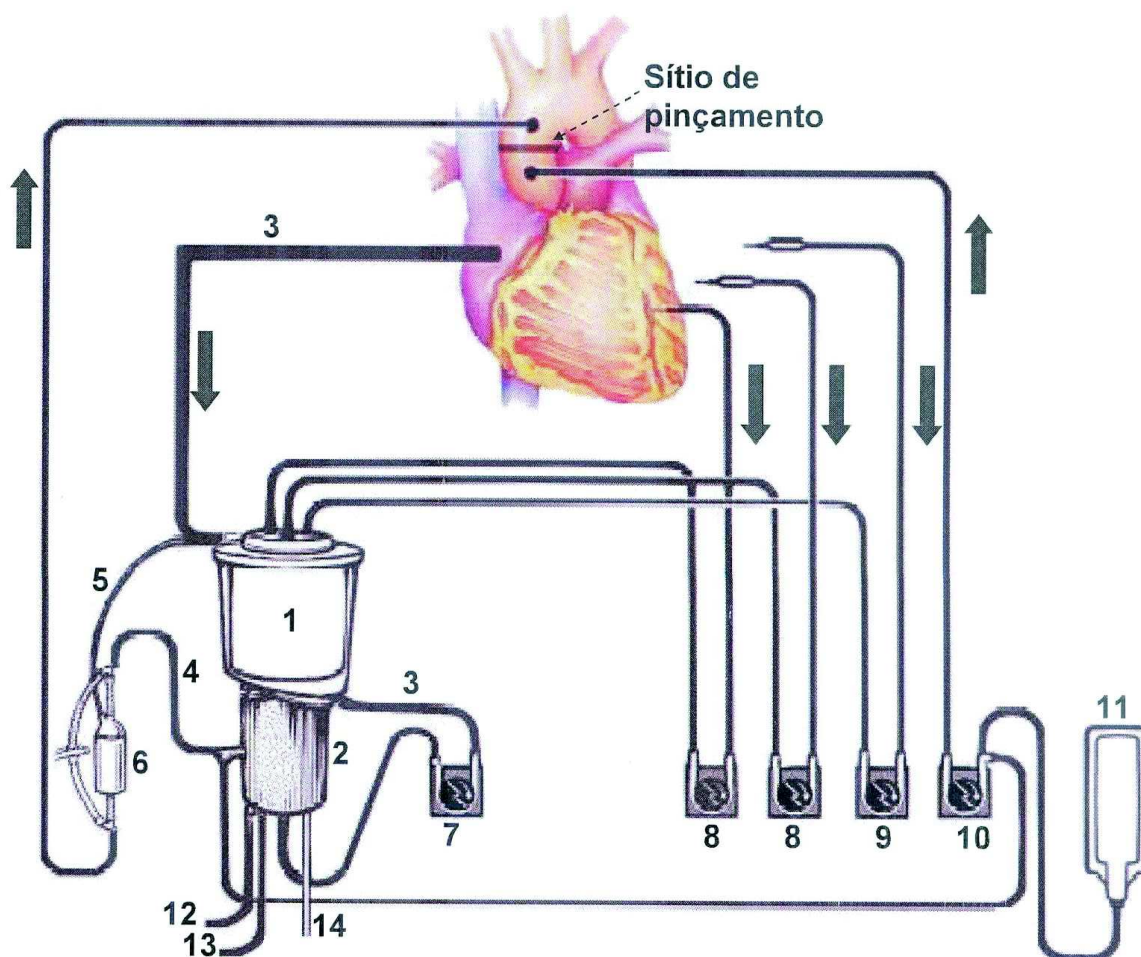


Figura 1 - Esquema representativo do circuito básico da circulação extracorpórea com oxigenador de membranas

Nota: 1) reservatório de cardiectomia integral; 2) compartimento das membranas; 3) linha venosa; 4) linha arterial; 5) expurgo do filtro da linha arterial; 6) filtro arterial; 7) bomba arterial; 8) bombas aspiradoras; 9) bomba de descompressão ventricular; 10) bomba de cardioplegia; 11) cardioplegia; 12) linha de entrada de água; 13) linha de saída de água; 14) linha de gás.

A evolução da CEC, ocorreu a partir do trabalho de Gibbon na década de 1950, de forma gradual, até chegar aos dias atuais com um sistema seguro, rotineiro, dotado de minúcias e acessibilidade para todos os centros de cirurgia cardíaca, mas ainda pesquisa-se o material ideal para execução deste aparelho. MacQuiston et al., contribuíram, na mesma década, com pesquisas sobre a hipotermia para a redução da taxa metabólica. A hipotermia é capaz de reduzir em até três vezes a velocidade das reações químicas do organismo, porém, também traz danos celulares aos quais o organismo tenta defender-se^{2, 3, 4}.

A escolha dos materiais utilizados para a CEC deve seguir parâmetros de segurança quanto à biocompatibilidade e causar o menor índice de agressão tecidual. Atualmente existem dois tipos de oxigenadores: o de bolhas e o de membrana, sendo o de membrana o mais usado por causar menor traumatismo às células do sangue. O mesmo desenvolvimento ocorreu com as bombas propulsoras, sendo atualmente utilizadas as de roletes e as centrífugas. A bomba centrífuga tem, no seu princípio de

ação, um meio mais benéfico e é a mais frequentemente empregada. São também usados filtros de linha arterial, filtros bacterianos e filtros para lavagem, na tentativa de reduzir complicações durante o procedimento cirúrgico com CEC. Atualmente o circuito da CEC é feito de material biocompatível, atóxico, flexível, transparente, elástico, repelente a água, com dureza e rigidez aceitáveis. Para tanto os tubos de PVC, silicone e circuitos heparinizados são os mais biocompatíveis e reduzem a resposta inflamatória do organismo^{2, 4, 7}.

As grandes expectativas que vieram com a CEC foram logo associadas também a complicações decorrentes da mesma. Surgiu, então, o conceito da "síndrome de pós-perfusão".

3.3 A SÍNDROME PÓS-PERFUSÃO

Está comprovado que a CEC pode desencadear Síndrome de Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS) sendo denominada, nesta situação, de Síndrome Pós-Perfusão. Nos pacientes que foram submetidos a cirurgias com CEC observou-se maior incidência de leucocitose, aumento da permeabilidade vascular levando ao acúmulo de líquido intersticial, associada a lesões orgânicas, principalmente no coração e pulmões, contribuindo com o aumento da morbidade pós-operatória^{5, 6, 7}.

Westaby et al. definiram que o desencadeamento da síndrome pós-reperfusão inclui as ativações dos sistemas complemento, calicreína, coagulação e fibrinólise pelo circuito de CEC, a adesão de leucócitos nos pulmões e a liberação de radicais livres do metabolismo do oxigênio. Posteriormente este mesmo autor em 1987 sugeriu o edema intersticial generalizado, a febre e a leucocitose secundários à CEC se assemelhava à resposta inflamatória aguda por lesão local. A pirexia observada em alguns pós-operatórios com dois a três dias de duração era uma ocorrência comum após a cirurgia com CEC, não sendo observada nenhuma evidência de que o processo fosse de natureza infecciosa. Desta forma criou-se o conceito de resposta inflamatória generalizada em função dos materiais dos circuitos da CEC e também, pela primeira vez foi sugerido que seria a ativação, mais que a

desnaturação de vários sistemas humorais com geração de alterações celulares, os desencadeadores daqueles quadros clínicos⁸.

Considerando os efeitos adversos da CEC, já documentados na literatura, particularmente sobre os sistemas neurológico, respiratório e renal alguns autores compararam cirurgias cardíacas com e sem o uso da CEC. Um estudo comparativo e retrospectivo de 303 pacientes sendo 122 sem CEC e 181 com CEC concluiu que a proteção miocárdica, morbidade e mortalidade obtidas com as duas técnicas de revascularização estudadas foram semelhantes⁹.

A análise de 2.495 pacientes operados sem CEC, demonstrou que a revascularização do miocárdio nestas condições é uma alternativa segura de tratamento da insuficiência coronária com baixa mortalidade hospitalar e menor incidência de complicações pós-operatórias¹⁰.

A real fisiopatologia da Síndrome Pós-Perfusão permanece obscura e pouco compreendida, podendo ser delineada uma seqüência de acontecimentos: estímulo pró-inflamatório e/ou inflamatório, com ativação do sistema de complemento, liberação de citocinas (ILs, TNF e fator de ativação plaquetária, etc.), ativação da forma induzível da óxido nítrico-sintase (iNOS), produção de óxido nítrico (NO), ativação da guanilato-ciclase com aumento do GMP cíclico, que leva à vasoplegia refratária mesmo ao uso de altas doses de aminas adrenérgicas. Observa-se, também, tendência a sangramento difuso pelas atividades antiplaquetárias do NO^{6, 11}.

Entretanto, os mecanismos responsáveis pela produção da síndrome completa ou de alguns de seus componentes são de difícil análise porque a resposta de cada organismo é variável e poucos pacientes apresentam respostas clinicamente identificadas. Além da sua ampla abrangência sistêmica, o grau de comprometimento depende da debilidade do próprio indivíduo quanto a doenças associadas, do tempo de clampeamento da aorta, do controle anestésico, de cuidados com a utilização da heparina e vários outros fatores ainda não identificados⁶. Há que se considerar ainda como outro fator que traz dificuldades para fazer-se a identificação clínica da síndrome, o fato de não haver testes diagnósticos específicos. A representação esquemática desta resposta inflamatória pode ser observada na figura 2.

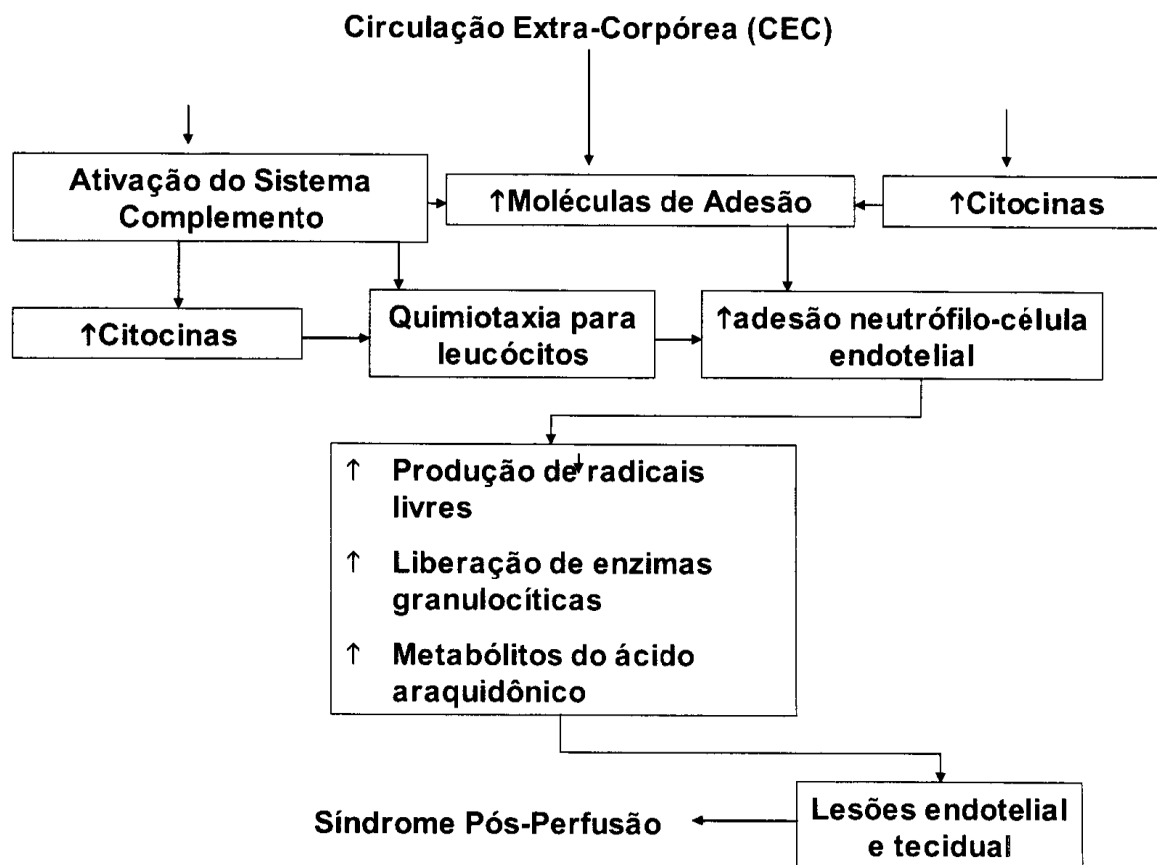


Figura 2 - Diagrama demonstrativo das possíveis alterações sistêmicas ocasionadas pela CEC

Em relação à participação do NO, Mejia et al., relataram a experiência no manuseio da crise hipertensiva pulmonar (CHP) refratária, com o uso do óxido nítrico inalatório (NOi) no pós-operatório imediato do transplante cardíaco (TC) ortotópico. Após o período de CEC foram utilizadas dobutamina, dopamina e milrinona, entretanto, frente à ausência de resposta adequada e CHP, administrou-se NOi em doses crescentes de 20 a 40ppm. Foram utilizados registros das pressões através de cateter no átrio esquerdo e no tronco pulmonar, gasometria arterial seriada e ecocardiograma transtorácico (ETT). Concluíram que o tempo de CEC superior a 120 minutos e tempo de ME do doador superior a 20 horas sugerem fatores de risco para CHP no período pós-operatório imediato do TC. E também que o NOi é ferramenta útil no manuseio desta complicação, refratária ao tratamento convencional no POI de pacientes submetidos ao TC ¹².

Brasil et al., em estudo clínico, avaliaram o efeito da metilprednisolona em pacientes submetidos à revascularização do miocárdio com CEC. Nos pacientes tratados com a metilprednisolona observaram que os efeitos sistêmicos adversos decorrentes da reação inflamatória pós-CEC foram atenuados pois o TNF alfa não foi detectado e

a IL-6 variou de 8,6 a 101,8 pg/ml, havendo pressão arterial média mais elevada e menor necessidade de drogas vasoativas. Evoluíram com menos taquicardia, temperatura menos elevada, menor sangramento pós-operatório, menor tempo de intubação orotraqueal e leucocitose menos acentuada. No grupo não tratado pelo corticóide o TNFalfa foi detectado em 13 pacientes, com níveis entre 5,4 e 231,0 pg/ml. A IL-6 neste grupo foi detectada nos 15 pacientes, sendo seus níveis mais elevados, variando entre 5,5 e 2.569 pg/ml. Concluíram que a metilprednisolona inibiu significativamente a liberação de citocinas pró-inflamatórias principalmente o TNF alfa. Os efeitos sistêmicos adversos decorrentes da reação inflamatória pós-CEC foram atenuados com o uso do corticóide¹³.

Clinicamente essa síndrome se caracteriza pelo comprometimento das funções pulmonares, renais, cerebrais, cardíacas, presença de febre, taquicardia, hipotensão arterial, leucocitose, coagulopatia, suscetibilidade às infecções, alteração da permeabilidade vascular levando ao acúmulo de líquido intersticial, vasoplegia e hemólise^{11, 13}.

Deve-se lembrar que a cirurgia cardíaca, embora necessária para alguns pacientes, é também um agressão para o organismo e, como tal, gera toda uma resposta inflamatória por parte do paciente, cuja etiologia não está necessariamente ligada à infecção e sim a um desequilíbrio fisiológico. Geralmente, a combinação do estresse cirúrgico e da CEC gera a resposta sistêmica inflamatória multifatorial, na qual há ativação das cascatas inflamatórias humoral e celular. Quando ocorre desequilíbrio nestas respostas, o organismo hiperativa células imunocompetentes, complemento e sistema de coagulação, altera também a produção de citocinas e interfere no endotélio. As hemorragias desencadeadas pela CEC ocorrem porque há diluição nos fatores de coagulação e diminuição nas concentrações do fator V e fator VIII, também ocorre inadequada neutralização da heparina e microêmbolos podem formar-se^{6, 11, 13}.

Também é descrito o seqüestro de leucócitos por adesão dos mesmos ao circuito da CEC e destruição de parte dos glóbulos brancos com liberação de substâncias indesejáveis no plasma. Ocorre ainda inibição das propriedades fagocitárias gerando redução nas defesas do paciente. A população leucocitária varia no pós-operatório decorrente das alterações mencionadas acima. A gravidade maior ocorre com falência pulmonar e renal, aumentando a morbidade e mortalidade¹⁴.

A resposta inflamatória da CEC resulta da complexa interação entre imunidade humoral e celular. O início do processo decorre pelo contato do sangue com superfícies não endoteliais e, mais tarde, a resposta à reperfusão. Os vários mecanismos desencadeados pela CEC estão diretamente ligados as cininas, calicreínas, produção de radicais derivados do ânion superóxido, enzimas granulocíticas e metabólicos do ácido aracdônico, além do aumento de cininas, fator ativador de plaquetas e NO^{15, 16}.

Associadas ao uso da CEC, são observadas também as reações desencadeadas pela anestesia, que ocorrem principalmente pela liberação de ILs, sendo esta uma área vasta para pesquisas e com muito para evoluir¹⁷.

As ILs são classificadas em dois grandes grupos, sendo ditas inflamatórias e não inflamatórias, havendo ação diferente das mesmas em cada parte do organismo desencadeando também diferentes reações na cascata inflamatória¹⁷.

É importante ressaltar no *distress* respiratório do adulto a IL-8, já em situações que envolvam isquemia/reperfusão este processo é mediado pela IL-8 e IL-13 respectivamente e na isquemia intestinal há reações ligadas a IL-6 e IL-1. O TNF também está envolvido nesta cadeia de reações e tem papel importante quando as pesquisas voltam-se para endotélio microvascular, podendo o TNF gerar uma reação que modifica os cardiomiócitos. Nesse campo de pesquisas uma revisão importante foi feita por Moura et al. onde foram levantados mais de 50 trabalhos e demonstraram que em um tempo curto de CEC já existem várias reações imunológicas desencadeadas, estando ligadas aos fatores acima referidos, dando maior destaque para o papel das ILs^{17, 18}.

Não existem no momento terapias satisfatórias na abordagem das complicações advindas da CEC, mas investigações animadoras com o uso de indometacina, esteróides, intervenções com mediadores da inflamação e descontaminação digestiva deverão proporcionar resultados promissores no tratamento destes pacientes, como tenta provar Dhalla et al. com suas pesquisas voltadas para o uso de antioxidantes nos pacientes sob injúria-reperfusão. Houve progresso quanto ao uso de N-acetilcisteína que aumenta os mecanismos antioxidantes para cardioproteção mas ainda é necessário estabelecer quais são as doses efetivas para a prescrição clínica rotineira¹⁹.

O uso de alopurinol também está sendo explorado com boas expectativas como antioxidante em cirurgias com o uso de CEC, como foi demonstrado por Belbou et al. em trinta e quatro pacientes submetidos a cirurgia de RM. Neste estudo o TBARS teve aumento significativo após trinta minutos de CEC, e sofreu novo

aumento após o clampeamento da aorta. A síndrome pós-perfusão foi menos evidente no quando se utilizou o alopurinol para combater os radicais livres²⁰.

Equilibrar defesa e agressão é uma tarefa difícil e isso torna-se mais complexo quando se somam patologias em um mesmo paciente, havendo maiores chances de complicações no per e pós-operatório.

3.4 ISQUEMIA-REPERFUSÃO, ESTRESSE OXIDATIVO E CEC

Somada à resposta inflamatória, a CEC gera períodos de isquemia-reperfusão durante o pinçamento aórtico e posterior remoção da pinça, o que promove condições que são favoráveis à formação de radicais livres. Ocorre, em consequência, um situação de desequilíbrio, denominada de estresse oxidativo. Várias doenças reumáticas, colites e diabetes, entre outras, induzem cronicamente desequilíbrio na produção de radicais livres com consequente dano constante ao organismo^{7, 14, 16}.

Há um grau de tolerância por parte das células em relação ao estresse oxidativo de baixa a moderada intensidade, porém, quando não se consegue reestabelecer o equilíbrio, iniciam-se alterações no metabolismo celular que podem levar à morte celular^{11, 16}.

Há formação de radicais livres durante a isquemia tecidual, mas a formação mais intensa destes radicais dá-se durante a reperfusão tecidual. Estes radicais são espécies químicas instáveis e muito reativas, sem um alvo específico, reagindo sem discriminação com o sarcolema, com o retículo sarcoplasmático, proteínas e membrana lipídica¹⁹.

Quando o oxigênio entra no tecido isquêmico cardíaco, induz a lesão de reperfusão. Passa então a existir uma reação entre os radicais livres e os ácidos gordurosos poliinsaturados da membrana celular, iniciando-se uma cadeia de peroxidação lipídica. Com isso há alterações na permeabilidade da membrana, lesão da membrana celular e pode ocorrer até a ruptura celular. Tudo isso contribui para o prejuízo funcional orgânico da CEC^{7, 11, 14}.

Os principais radicais livres são o superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e o radical hidroxila ($OH^{\cdot}$), mas há também os ditos não-radicais que são o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o ácido hipocloroso ($HOCl$)⁹. Ferrari et al, demonstrou alterações antes e após o

clampeamento da aorta, em 20 pacientes. Procederam o estudo nos tempos de um, cinco, dez e vinte minutos após a remoção do clampeamento e em dez e vinte minutos após a revascularização²¹.

Observa-se na literatura divergências entre os autores, não se chegando a um total esclarecimento sobre alterações oxidativas, capacidade antioxidante total e NO.

Novos elementos surgiram na década de oitenta, quando se passou a melhor investigar o NO, interessando-se por suas funções biológicas e não apenas o considerando uma família de poluentes ambientais indesejáveis e carcinógenos potenciais^{7, 14}.

O NO constitui uma das menores moléculas biossintetizadas, sendo o mesmo um radical livre, gasoso, incolor, inorgânico e que possui sete elétrons do nitrogênio e oito do oxigênio, além de um elétron desemparelhado^{11, 19}.

Existiam, naquela ocasião, três linhas de pesquisa independentes que culminaram com importantes descobertas científicas e colocaram o NO como um grande mediador de processos intracelulares. Atualmente, várias linhas de pesquisa tentam elucidar as correlações existentes entre o NO, macrófagos, linfócitos T, miócitos, hepatócitos, condrócitos, neutrófilos, plaquetas e morte celular^{10, 11, 19}.

Sabe-se que o efeito do tempo de isquemia sobre as alterações oxidativas, a capacidade antioxidante total e o NO, no músculo, no rim e no plasma são relevantes e influenciam expressivamente na morte celular. O NO exerce função dúbia, dependendo do processo ao qual a célula está exposta. Sua ação benéfica pode ser confirmada pelo relaxamento vascular, por sua mediação em reações imunológicas e capacidade de destruir patógenos. No entanto, sua ação contrária também deve ser referida quando se torna tóxico nas reações de estresse oxidativo, como nas situações de disfunção endotelial que se caracterizam pela marcada redução na liberação de NO após a reperfusão, que é seguida pelo aumento da aderência de leucócitos ao endotélio perfundido, tornando-se significativa 20 minutos após a reperfusão^{10, 11, 19, 22, 23}.

Francisco Neto et al. avaliaram o efeito do tempo de isquemia sobre as alterações oxidativas, a capacidade antioxidante total e o óxido nítrico, no músculo, posteriores. Relataram alterações estatisticamente significantes do malondialdeído no rim. A capacidade antioxidante total apresentou alterações significantes no rim, no músculo e no plasma enquanto que, o óxido nítrico, alterou apenas no plasma. Concluíram que a variação do tempo de isquemia provocou alterações significantes do malondialdeído, da capacidade antioxidante total e do NO²⁴.

Milei et al. afirmaram que a investigação de estresse oxidativo em cirurgia cardíaca oferece oportunidade de conseguir observações em condições clínicas relevantes, que até o momento são obtidas em modelos experimentais. Enalteceram ainda que aquelas observações teriam implicações terapêuticas importantes, porque prevenir o fenômeno do estresse oxidativo poderia melhorar a proteção miocárdica e o pós-operatório. Em seu estudo, correlacionaram a liberação de glutathione que é a etapa inicial de estresse oxidativo, com marcadores de progressão de lesões oxidativas, como peroxidação de lípidos de membrana e o desenvolvimento de alterações ultra-estruturais. Avaliaram 24 pacientes submetidos a cirurgia de ponte aortocoronária com CEC e investigaram o comportamento de vários marcadores de estresse oxidativo e lesão tissular durante a reperfusão pós-isquêmica. Os autores avaliaram amostras de sangue e biópsias cardíacas, antes e após a reperfusão. Observaram que a liberação basal de glutathione foi insignificante, mas aumentou aos quinze minutos da reperfusão e diminuíram os níveis tissulares de ubiquinol. Apesar destes dados documentarem e caracterizarem o estresse oxidativo cardíaco, não ocorreram alterações bioquímicas indicativas de lesão tissular. Estes autores concluíram que mesmo tendo sido registrado o estresse oxidativo em pacientes submetidos à cirurgia cardíaca com CEC, não ocorreram lesões progressivas das membranas celulares e nem lesões celulares irreversíveis²⁵.

Quando a produção fisiológica de radical livre aumenta em excesso, o organismo se defende com enzimas específicas na tentativa de diminuir sua concentração neste local. São estas enzimas (*scavengers*) que reagem com o intermediário na redução do oxigênio. Elas agem principalmente evitando a formação de O^2 (de H_2O_2 para que estes não formem o radical OH), cuja inativação enzimática é impossível. As principais enzimas que têm esta função são: superóxido-dismutase (SOD), catalase e glutathione-peroxidase^{7,11, 14, 19, 26}.

A superóxido-dismutase catalisa a reação de dois ânions superóxidos com a formação de peróxido, que é menos reativo e pode ser degradado por outra enzima. A SOD pode ser encontrada no citoplasma, na matriz mitocondrial, no líquido extracelular e nas bactérias^{7, 14, 26}.

A enzima glutathione-peroxidase tem uma ação mais geral, catalisando a redução de muitos peróxidos. Está presente no citoplasma e na mitocôndria das células^{7, 14,}

3.5 O TBARS

Reações na cadeia respiratória celular pode gerar EROS que são neutralizados por antioxidantes, porém, quando há um desequilíbrio neste processo passamos a ter o estresse oxidativo. Os EROS lesam os componentes celulares, mas, de forma mais evidente, a agressão ocorre na membrana celular por peroxidação lipídica, acarretando alterações na estrutura e permeabilidade celular^{8, 14}.

O TBARS é produto da peroxidação lipídica e pode ser utilizado como indicador da ação de radicais livres no organismo, por ser detectado em amostras biológicas. É um dialdeído formado como produto secundário durante a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados por cisão beta dos AGPI peroxidados, principalmente o ácido araquidônico (figura 3). É volátil, possui peso molecular de 72,07, tem uma cadeia curta 1,3-dicarbonil e é um ácido moderadamente fraco com $pK_a=4,46$ ^{8, 14}.

Produz ação citotóxica e genotóxica, encontrando-se em níveis elevados em algumas doenças associadas ao estresse oxidativo. A sua quantificação é um parâmetro importante para avaliação do estresse oxidativo celular^{8,27, 28}.

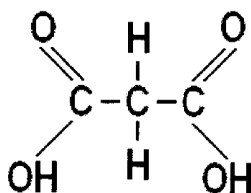


Figura 3 - Estrutura química do TBA

O TBARS pode ser avaliado por vários métodos como espectrofotometria, cromatografia líquida de alta eficiência com a detecção de diodos, por sua detecção na urina e por espectrometria de massas, porém, um dos métodos de menor custo, é a reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA), sendo o produto detectado através de leitura espectrofotométrica na região visível. É um método amplamente utilizado porém não é específico para todos os produtos da peroxidação lipídica, pois quantifica a soma das diferentes substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, denominadas TBARS²⁹.

3.6 PROTEÍNA C REATIVA

As proteínas de fase aguda são produzidas na sua grande maioria pelos hepatócitos e possuem um mecanismo de regulação positiva ligada a ativação transcrisional. Nesta ativação estão envolvidas as citocinas como TNF, IL-1 e a IL-6³⁰.

A PCR é nos mamíferos o principal reagente de fase aguda e tem como valor normal 1 micrograma por mililitro e pode aumentar até o nível de 1 miligrama por mililitro durante a resposta da fase aguda. Em sinergismo com outras proteínas, ela atua na depuração do material nuclear liberado por microorganismos mortos e também em células mortas do hospedeiro durante a inflamação, através de sua ligação ao DNA, à cromatina e às histonas. Atua também na ativação da via clássica do complemento³⁰.

A PCR pode ser detectada pelo método da precipitação em tubo capilar ou, mais comumente, pela técnica da aglutinação com látex PCR. Esta última utiliza partículas de látex poliestireno sensibilizadas com globulinas purificadas anti-PCR e é realizada em lâmina. O método qualitativo indica a presença ou ausência de PCR pela presença ou ausência de aglutinação, que pode ser graduada em cruces. Os casos positivos podem ser submetidos ao método semi-quantitativo pela diluição progressiva do soro. O título obtido pode ser transformado em mg/dL. No adulto, um valor de 0,3 mg/dL já pode ser considerado anormal. Entretanto, apenas métodos ultra-sensíveis são capazes de detectar esses valores. A dosagem da proteína C reativa é uma forma importante de avaliar o risco para doenças cardiovascular, bem como acompanhar a evolução da doença. Porém, ainda é pouco utilizada na clínica devido a necessidade de técnicas ultra-sensíveis³⁰.

É usada rotineiramente para monitorar a resposta de fase aguda, sendo considerada uma das mais sensíveis, por apresentar algumas características, como meia-vida curta (entre 8 a 12 horas) e valores normais muito baixos (<0,5 mg/dL), que, em resposta a estímulos inflamatórios, podem atingir valores até 100 vezes o normal em menos de 24 horas. Além de elevar-se rapidamente após o estímulo inflamatório (4 a 6 horas), na ausência de estímulo crônico, normaliza-se em 3 a 4 dias³⁰.

3.7 ALTERAÇÕES ENDÓCRINAS OCASIONADAS PELA CEC

As alterações endócrinas decorrentes da CEC se devem, principalmente, ao fluxo não pulsátil que ela ocasiona. O que se observa durante a CEC é uma manutenção do débito cardíaco por uma bomba propulsora de sangue, que produz um fluxo arterial contínuo ou linear, não pulsátil, sem ondas de pressão. Todas estas alterações geram respostas hormonais importantes como a estimulação do sistema nervoso autônomo (SNA) e liberação de vasopressina, baixa viscosidade sangüínea produzida por hemodiluição e distribuição alterada do fluxo nos diversos órgãos⁷.

Há uma alteração significativa do fluxo sangüíneo tanto no período de normotermia quanto na hipotermia, podendo haver um desequilíbrio entre oferta e consumo, que gera uma resposta inflamatória com liberação de citocinas e alterações hormonais referentes à vasopressina, hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), hormônio do crescimento (GH), insulina, aldosterona, catecolaminas⁵. A vasopressina, nos primeiros 30 minutos de CEC, pode ter aumento de até 20 vezes no valor do ADH, o que ocasiona retenção de sódio e água, aumento da resistência periférica, vasoconstrição renal e, com isso, diminuição do débito urinário^{7, 14}.

O ADH, por alterações decorrentes da hemodiluição nas taxas deste hormônio, têm-se estímulos à supra renal para produzir cortisol, o que afeta o metabolismo das gorduras, proteínas e carboidratos. Também acarreta alterações no sistema imune¹⁹.

Nas taxas de GH pode ocorrer aumento significativo nos seus níveis assim, que se inicia a cirurgia, o que tem como conseqüência a diminuição no catabolismo e também alterações na síntese protéica. A insulina pode ter a produção alterada durante a CEC e está ligada à hipotermia e ao fluxo pulsátil. Seus danos são variáveis e piores no paciente sabidamente diabético. Quanto à aldosterona, esta é responsável pela indução de alterações nos íons sódio e potássio, dificultando o controle destes no per e pós-operatório^{7,19}.

As catecolaminas apresentam elevação significativa durante a CEC, o que pode gerar alterações pressóricas, renais e também no trabalho cardíaco.

4 CASUÍSTICA E MÉTODO

4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Este estudo foi realizado no Hospital e Maternidade Angelina Caron em Campina Grande do Sul, Paraná. Foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) do referido hospital, conforme Protocolo n.º 02/2006 em conjunto com o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo A) dos pacientes para realização do mesmo, conforme a resolução 196/96, artigo IV da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CONEP).

Dos 276 pacientes coronariopatas, submetidos à cirurgias cardíacas no período de setembro de 2006 a setembro de 2007, 25 preencheram os critérios de inclusão do protocolo proposto para o estudo, considerados:

- Coronariopatia comprovada por cineangiocoronariografia;
- Indicação de cirurgia de revascularização com uso de CEC;
- Ausência de Diabetes melito;
- Ausência de infarto do miocárdio nos últimos seis meses;
- Fração de ejeção maior que 50%;
- Creatinina sérica menor que 1,2 mg/dl;
- Não tabagistas.

4.2 PRÉ-OPERATÓRIO

Os dados de história e exame físico foram registrados no prontuário de internação de cada paciente, conforme o que vigente no hospital onde foi executado o presente estudo. Após, era realizado um cadastro específico de cada paciente que poderiam ser relacionados para o estudo, por preencherem os critérios de inclusão.

4.3 INTRA-OPERATÓRIO

A cirurgia de revascularização do miocárdio foi realizada mediante esternotomia mediana, havendo, em alguns casos, o uso de enxerto de artéria torácica interna esquerda e pontes adicionais de veia de safena.

A técnica anestésica seguiu a rotina do serviço de anestesiologia e todos os pacientes receberam ventilação mecânica com FIO_2 de 100%. A instalação da circulação extracorpórea foi feita com introdução na aorta ascendente e drenagem venosa através da cava única atrial, com heparinização sistêmica. Foi utilizado o equipamento ECOBEC® Braile Biomédica, código 35.824, composto por uma bomba de cabeça arterial, três aspiradores, um trocador de calor de água, tais como termômetros e cronômetros.



Figura 4 - Máquina de CEC modelo ECOBEC-Braile Biomédica, código 35824.

As coletas de sangue de cada paciente ocorreram em três momentos. A coleta do tempo zero (T0) ocorreu imediatamente após a indução anestésica e antes do ato operatório. A segunda amostra (T10) ocorreu a dez minutos após a instalação da CEC e terceira amostra com trinta minutos da instalação da CEC (T30). Após a cirurgia,

todos os pacientes foram encaminhados para a unidade de terapia intensiva (UTI) cardíaca. Na UTI, seguiu-se a rotina pós-operatória do serviço.

4.4 ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS DE SANGUE

As amostras de sangue foram coletadas em tubos de ensaio de silicone esterilizados, heparinizados e identificados. Durante o período de coleta eram mantidos em caixa térmica com gelo. A seguir eram submetidos à centrifugação e separação do plasma em três alíquotas, em frascos de vidro com tampas de silicone esterilizados armazenados à temperatura de -70°C até a oportunidade do processamento destas amostras. Uma das alíquotas de cada amostra será armazenada por cinco anos, como é requerido em qualquer material de pesquisa e, passado este período, serão encaminhadas para incineração, sendo isso responsabilidade do pesquisador.

4.5 MÉTODO DA DOSAGEM DE SUBSTÂNCIAS REDUTORAS DO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)

As amostras de soro dos pacientes foram submetidas à dosagem de proteínas totais pelo método colorimétrico. Este procedimento foi utilizado para referir os níveis de TBARS circulantes em mmoles/mg de proteína sérica.

Após serem obtidos os resultados das dosagens de proteínas totais, as amostras foram submetidas à dosagem de TBARS, conforme metodologia proposta por Buege e Aust segundo a qual a lipoperoxidação ou peroxidação lipídica é indicada pela formação de radicais livres, que reagem com o ácido tiobarbitúrico, sendo seu valor expresso em nanomoles por miligrama de proteína no soro avaliado (nmol/mg de proteína)²⁹. Estas dosagens foram feitas em triplicatas, em dias diferentes e os valores finais foram dados pela média das três dosagens (amostras A1, A2 e A3 para T0; amostras B1, B2 e B3 para T10 e amostras C1, C2 e C3 para T30 – Anexo C).

4.5.1 Reagentes

- Solução de Cloreto de Potássio (REAGEN[®]) a 1,15%;
- Solução de Ácido Tiobarbitúrico (SIGMA[®]) a 0,6%;
- Solução de Ácido Fosfórico (REAGEN[®]) a 1%;
- N-butanol (REAGEN[®]).

4.5.2 Procedimentos

- Incubados 0,5 ml de soro (amostras 1, 2 e 3 de cada paciente) com 1 ml de ácido tiobarbitúrico e 3 ml de ácido fosfórico entre 95 e 100 graus Celsius durante 45 minutos;
- Adicionados 4 ml de N-butanol e agitados por 2 minutos em agitador automático;
- Centrifugado por 10 minutos a 3.000 rpm;
- Feita leitura de um pigmento rosa em espectrofotômetro a 535 nm;
- A concentração de TBARS foi calculada através do coeficiente de extinção molar de $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

4.6 MÉTODO DE DOSAGEM DA PROTEÍNA C REATIVA

Para as dosagens quantitativas de PCR nas amostras de plasma humano utilizaram-se os reativos comerciais da marca Bioclin[®], Proteína C Reativa Ultrasensível K079. Esta dosagem fundamenta-se na quantificação imunoturbidimétrica da reação antígeno-anticorpo pelo método do ponto final. Utilizou-se também soro padrão calibrado pela Federação Internacional de Química Clínica (IFCC), a qual determina como valores normais para PCR de 0 a 1mg/dl. A execução dos testes foi feita em equipamento automatizado da marca Selectra[®].

4.6.1 Reagentes

- Solução Tampão HEPES 10 mmol/L pH 7.2, polietilenoglicol (PEG), NaCl, azida sódica 15,38 mmol/L, detergentes e estabilizantes.
- Antisoro em solução tampão borato 3,2 mmol/L, anticorpos monoclonais e policlonais anti-PCR humano ligados a partículas de poliestireno, polietilenoglicol (PEG), NaCl, azida sódica 15,38 mmol/L, detergentes e estabilizantes.

4.6.2 Procedimentos

- Marcar 3 tubos de ensaio como C (Calibrador), A (Amostra), B (Branco), e proceder como a seguir:

REAGENTES	CALIBRADOR	AMOSTRA	BRANCO
Reagente de trabalho	500 μ l	500 μ l	500 μ l
Amostra	---	25 μ l	---
Calibrador	25 μ l	---	---

- Homogeneizar e incubar por 5 minutos, a 37°C. Ler a 505 nm imediatamente.
- A reação é linear até 20 mg/dL. Para amostras com valores superiores a este, ou absorbância maior que 0,8, recomenda-se diluir a amostra com solução de NaCl 9,0 g/dL, repetir a dosagem e multiplicar o resultado obtido pelo fator de diluição após o tempo recomendado, contra o branco.
- Resultados: Valores inferiores a 1mg/dl são considerados negativos.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a descrição dos resultados, foram calculadas médias aritméticas e os respectivos desvios padrões, sendo que os resultados individuais estão disponíveis nos anexos.

As comparações dos resultados obtidos nas dosagens entre os momentos de coletas (T0, T10 e T30) em triplicatas (A, B e C) foram feitas pelo programa GraphPad InStat, através do teste de ANOVA (One-way Analysis of Variance) e pelo teste T de Student.

O nível de significância utilizado para rejeitar a hipótese nula (H_0), de que não houvesse diferença entre as dosagens nos três momentos foi de 5%, isto é, para um nível de significância menor que 0,05, considerou-se que ocorreram diferenças estatísticas entre as dosagens de TBARS e PCR antes da instalação da CEC e nos dez e trinta minutos após a instalação.

5 RESULTADOS

5.1 A POPULAÇÃO AVALIADA

Entre os 276 pacientes submetidos à cirurgias cardíacas no período de setembro de 2006 a setembro de 2007, 25 preencheram os critérios de inclusão do protocolo proposto para o estudo, correspondentes a 9,025% da amostra avaliada. Conforme descrição no anexo 2, entre os pacientes selecionados nove eram do sexo feminino e dezesseis do sexo masculino.

A idade média foi de $61,16 \pm 9,73$ anos, a fração de ejeção média foi de $62,32 \pm 7,32\%$, as dosagens de creatinina foram de $1,07 \pm 0,11$ mg/dl e o tempo médio de CEC foi de $63,88 \pm 20,75$ minutos, variando entre 20 a 95 minutos, sendo que 13 tiveram tempo de CEC menores que 70 minutos e 12 pacientes acima de 70 minutos.

O tempo médio de pinçamento foi de $47,64 \pm 20,07$ minutos e o número médio de enxertos vasculares foi de $3 \pm 0,82$ pontes. Em nenhum dos pacientes incluídos ocorreu complicações como sangramento significativo, reintervenções cirúrgicas, SARA ou óbitos.

Todos os pacientes incluídos apresentavam doença arterial coronariana comprovada por cineangiocoronariografia, com indicação de cirurgia de revascularização miocárdica com uso de CEC, glicemias entre os parâmetros normais, não ocorrência de infarto do miocárdio nos últimos seis meses e não eram tabagistas.

5.2 DOSAGENS DE TBARS

As dosagens de TBARS nos três momentos de avaliação T0, T10 e T30 estão individualmente descritas no anexo C. Diferiram significativamente ($p < 0,0001$) e estão demonstrados no gráfico 1. Observou-se aumento destas dosagens após a CEC, tendo como valores médios em T0= $1,503 \pm 0,074$, em T10= $5,538 \pm 0,353$ e T30= $3,058 \pm 0,289$ mmoles/mg de proteína sérica.

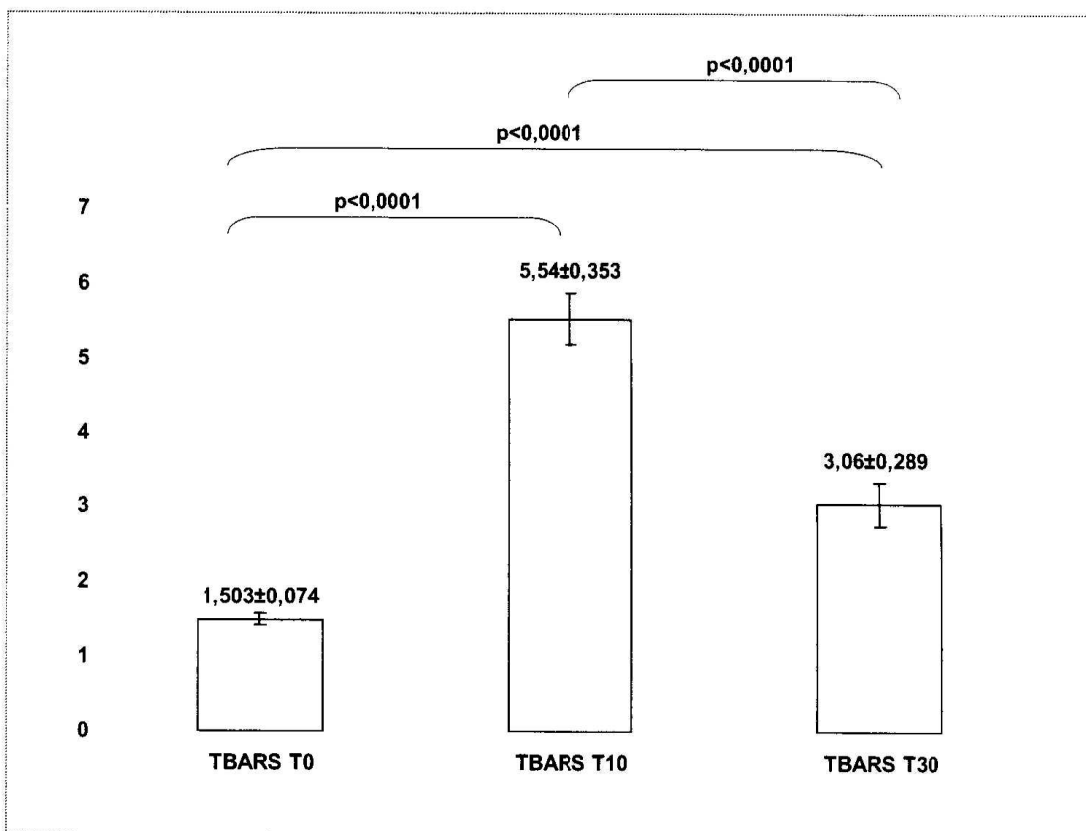


Gráfico 1 - Médias e desvios-padrão das dosagens de TBARS (mmoles/mg de proteína sérica) nas 25 amostras de sangue coletadas em T0, T10 e T30

5.3 AVALIAÇÃO DAS DOSAGENS DE PCR

As dosagens de PCR estão demonstradas no gráfico 2, nas amostras iniciais (T0) foram negativas para todos os pacientes. Aos dez minutos após o início da CEC, houve aumento destas dosagens e apresentaram média de $0,956 \pm 0,67$ mg/dl (T10) e após trinta minutos média de $0,999 \pm 0,76$ mg/dl (T30). Não houve diferença significativa entre as dosagens em T10 e T30 com $p=0,8301$. Os resultados destas avaliações estão disponíveis no anexo 4.

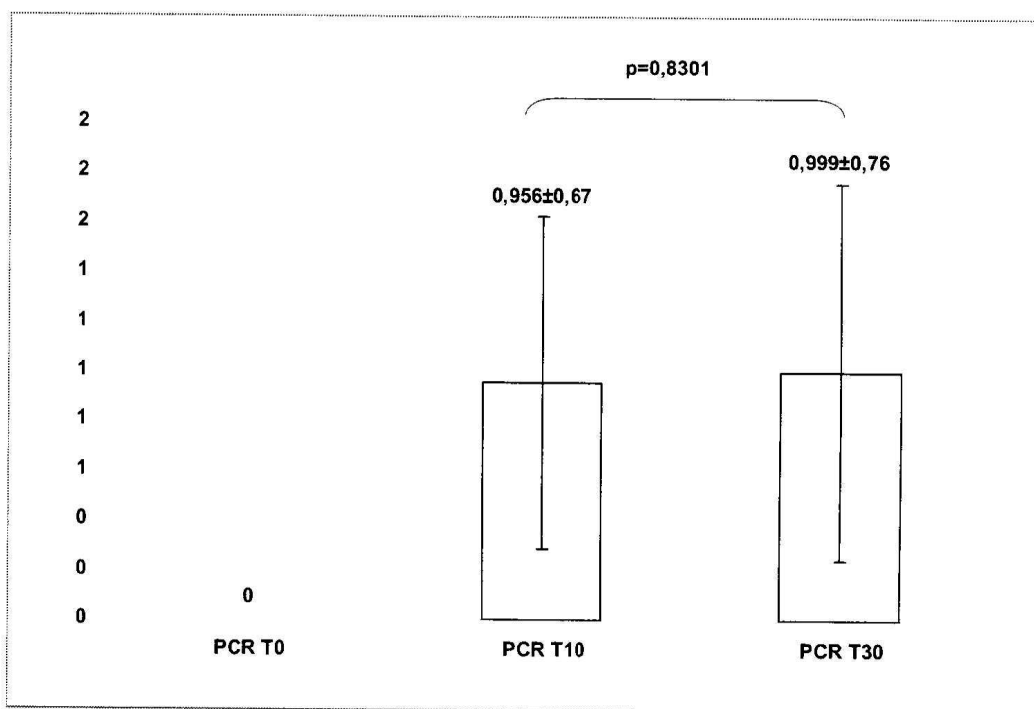


Gráfico 2 - Médias e desvios-padrão das dosagens de PCR (mg/dl) nas 25 amostras de sangue coletadas em T0, T10 e T30

5.4 ANÁLISE SIMULTÂNEA ENTRE AS DOSAGENS DE PCR E TBARS

Conforme demonstrado no gráfico 3, as médias das dosagens de TBARS e PCR apresentaram tendência crescente quando comparados o T0 e o T10. Quando analisadas as médias entre T10 e T30, para o TBARS houve diminuição significativa ($p < 0,0001$) contudo, ainda manteve-se maior que em T0 ($p < 0,0001$). Para as médias de PCR entre T10 e T30 não houve diferença significativa, porém, ao serem confrontadas as médias entre T0 e T30 observou-se que em T30 foram maiores que em T0.

Em ambas as dosagens, houve aumento entre T0, T10 e T30, como demonstradas pelas linhas de tendência no gráfico 3.

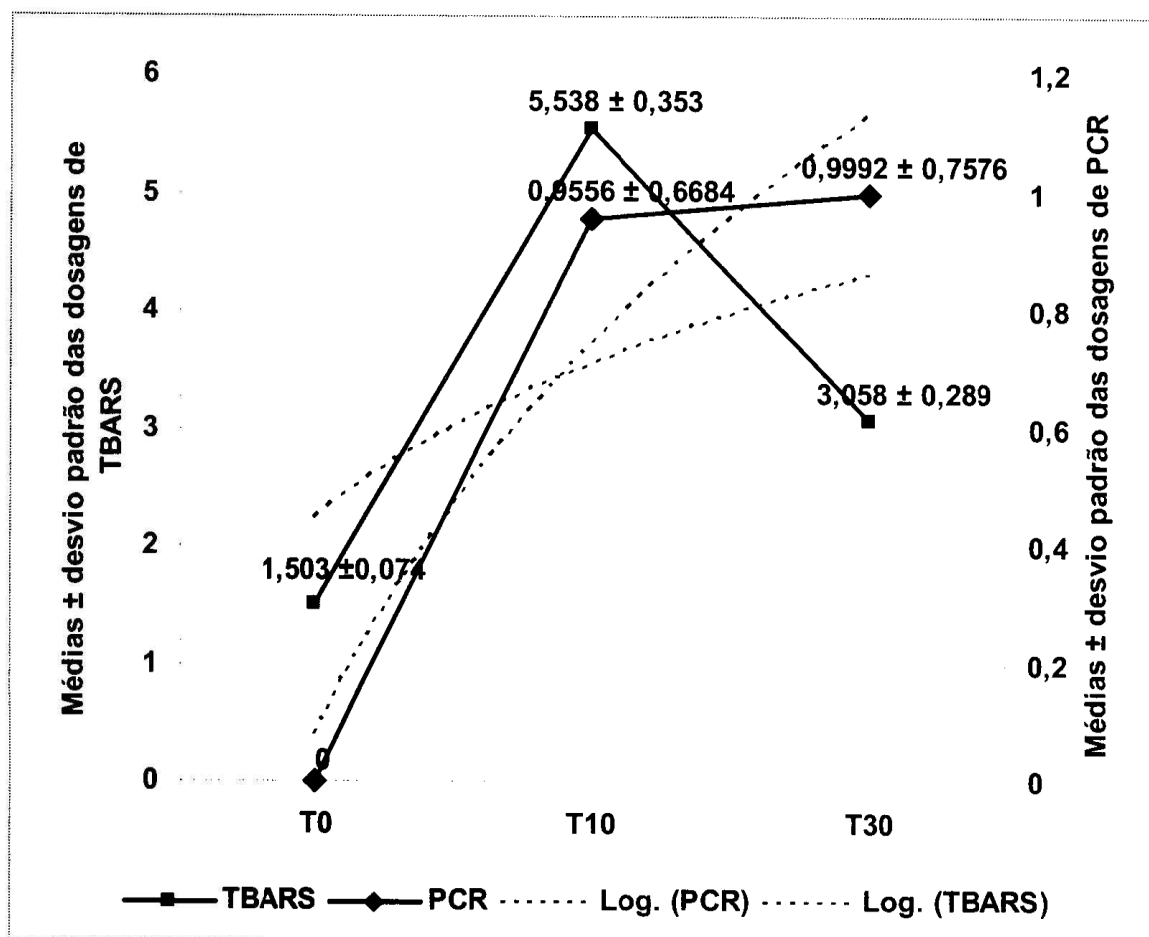


Gráfico 3 - Demonstrativo simultâneo entre as médias e desvios padrões das dosagens de MDA e PCR em T0, T10 e T30

6 DISCUSSÃO

6.1 A PADRONIZAÇÃO DA AMOSTRA E PROCEDIMENTOS

No presente estudo foram pré-selecionados 276 pacientes a serem submetidos à cirurgias de revascularizações miocárdicas, no período de setembro de 2006 a setembro de 2007. A fonte de recrutamento dos pacientes foi o acesso direto destes ao hospital onde foram submetidos a cirurgia de RM. Foram selecionados para inclusão no estudo 25 pacientes, representando 9,05% do total de pacientes, mediante os critérios de inclusão do protocolo proposto.

Os pacientes após serem avaliados, considerando-se as indicações propriamente ditas do procedimento cirúrgico cardíaco, sendo desta forma incluídos pacientes com doença arterial coronariana comprovada por cineangiocoronariografia, indicação de cirurgia de RM com CEC, com fração de ejeção maior que 50%, não portadores de DM, não tabagistas e com níveis de creatinina até 1,2mg/dl.

Em relação ao procedimento cirúrgico e as condutas pré e pós-operatórias, as variáveis foram minimizadas pelo fato dos 25 pacientes passarem pela RM sob uma mesma equipe cirúrgica, com procedimentos padronizados, inclusive para a coleta das amostras.

Referindo-se aos pacientes não incluídos na amostra, que somaram 251 pacientes, ressaltamos a não inclusão dos infartados, dos diabéticos e dos tabagistas uma vez que vários estudos demonstram níveis séricos de TBARS e PCR elevados de forma constante e por longo tempo nestes pacientes^{30, 31, 32, 33, 34, 35}.

A não inclusão de pacientes diabéticos é sedimentada por vários estudos mas devemos ressaltar o de Kakkar et al. que demonstra haver várias complicações que afetam distintos órgãos e EROS podem estar envolvidos na patogênese dessa endocrinopatia³⁶.

Matsubara et al., ao analisarem o estresse oxidativo em pacientes idosos portadores de Diabetes melito tipo II descreveram maior nível GSH e maior atividade de GSHd e GSH-Px, em relação ao grupo controle, composto por idosos saudáveis³⁷.

No presente estudo o valor de corte para os níveis de creatinina foi de 1,2 mg/dl. Neste contexto observa-se que pacientes com insuficiência renal apresentam peroxidação lipídica elevada. Lucchi et al. observaram que pacientes com reduzida depuração de creatinina apresentaram maiores níveis de dienos conjugados no plasma e tecido adiposo, mostrando que há aumento do estresse oxidativo com a progressão da doença³⁸.

A adoção destes critérios de inclusão promoveu a limitação da amostra, porém, com isso evitou-se que pacientes possivelmente portadores de níveis séricos de TBARS por outras causas que não a CEC pudessem trazer dados incorretos nestas dosagens.

6.2 AS DOSAGENS DE TBARS

As determinações laboratoriais seguiram metodologia já consagrada na literatura e aplicadas em diversos estudos clínicos e experimentais. Segundo Buege e Aust (1978), a detecção direta das "espécies reativas do metabolismo do oxigênio" em amostras biológicas é dificultada por suas concentrações extremamente baixas, na ordem de 10^{-11} M e por suas elevadas reatividades, chegando ao ponto de as taxas de produção serem iguais às taxas de reação com biomoléculas²⁹.

Os métodos mais utilizados para aferição indireta das "espécies reativas do metabolismo do oxigênio" e, conseqüentemente, das lesões oxidativas são os espectrofotométricos e cromatométricos, que medem a atividade enzimática (SOD, catalase, GSH-Px e GSH-gd) e/ou a concentração de tripeptídeos (GSH, GSHSS) e aldeídos (TBARS). Estas medidas podem ser realizadas em tecidos, sangue e outros fluidos²⁹.

No presente estudo, para as dosagens de TBARS adotou-se a metodologia proposta por Buege e Aust., descrita em 1978, a qual apresenta reprodutibilidade e sensibilidade. As dosagens foram feitas em triplicatas e em diferentes momentos. A seguir foram calculadas as médias de cada grupo de dosagens e verificado estatisticamente se ocorreram diferenças. Como não ocorreram diferenças significantes entre as dosagens em triplicatas, foram então calculadas as médias das três dosagens para a representação do resultado final²⁹.

Antunes et al., destacaram a ampla variabilidade de valores de referência relatados na literatura quanto ao TBARS em amostras biológicas. Inferiram que as diferenças nos índices basais de TBARS podem ser justificadas pelas diferenças étnicas e culturais das populações estudadas, incluindo hábitos alimentares dos indivíduos. Entretanto, aqueles autores mencionam a necessidade de estudos interlaboratoriais, com as mesmas amostras, como forma de identificar possíveis erros sistemáticos nas diferentes técnicas utilizadas e conseqüentemente obter consenso quanto aos níveis basais do malondialdeído (MDA) em indivíduos adultos saudáveis. No presente estudo os valores basais de MDA (T0) foram de $1,503 \pm 0,074$ mmoles/mg de proteína sérica³⁹.

Lima et al., em um estudo que revisou os principais mecanismos indutores de peroxidação lipídica, assim como as principais metodologias utilizadas para sua mensuração em sistemas biológicos, afirmaram que um método considerado ideal na mensuração da lipoperoxidação lipídica (LPO) deve cumprir os seguintes aspectos: 1) identificar e quantificar produtos derivados especificamente do processo de peroxidação; 2) ter um baixo coeficiente de variação, quando analisadas amostras diferentes de um mesmo indivíduo; 3) não estar sujeito a interferências de outras biomoléculas; 4) não sofrer interferência direta da dieta e 5) ter sensibilidade para mensurar níveis basais dos produtos⁴⁰.

A metodologia para a dosagem de TBARS no presente estudo cumpriu o primeiro aspecto mencionado por Lima et al., pois tem como fundamento o fato de que a lipoperoxidação ou peroxidação lipídica é indicada pela formação de radicais livres, que reagem com o ácido tiobarbitúrico em condições apropriadas de incubação (meio ácido e aquecimento), reagindo eficientemente para a produção de um cromógeno com alta absorvidade molar no espectro visível. O método ora empregado também cumpriu o segundo aspecto anteriormente mencionado, pois não apresentou variação significativa, quando analisadas amostras diferentes de um mesmo indivíduo⁴⁰.

Quanto aos demais aspectos citados por Lima et al., de não estar sujeito a interferências de outras biomoléculas, o método ora utilizado em meio ácido e alta temperatura, permite elevada seletividade molecular. Os autores mencionam ainda que não deve sofrer interferência direta da dieta, por este motivo optou-se a coleta em T0 em jejum mínimo de dez horas e as demais ocorreram em trans-operatório. Recomendaram também que o método deve apresentar sensibilidade para mensurar níveis basais, como foi procedido em T0⁴⁰.

Quanto às médias das dosagens de TBARS nos três momentos deste estudo, apresentaram diferença significativa com $p < 0,001$. Observou-se aumento significativo entre o basal (T0) com $1,503 \pm 0,074$, em T10 com $5,538 \pm 0,353$ e em T30= $3,058 \pm 0,289$ mmoles/mg de proteína sérica (gráfico 2 e Anexo C).

Para explicar o aumento de TBARS entre T0 e T10, pode-se mencionar as aferições de Zanoni et al., em 2008, ao demonstrarem que durante a cirurgia cardíaca com CEC ocorre uma série de alterações imunológicas e inflamatórias desencadeando estresse oxidativo. Nas condições não-fisiológicas durante a CEC e em razão de alterações relacionadas a isquemia-reperfusão, forma-se uma grande quantidade de radicais livres. São responsáveis pela inflamação sistêmica e considerável lesão celular estrutural e funcional⁴¹.

A diminuição dos níveis de TBARS observada entre T10 e T30 pode ser justificada pela liberação de antioxidantes endógenos frente ao estímulo ocorrido em T10. Esta possível justificativa tem embasamento nas afirmações de Barreiros et al., que o excesso de radicais livres no organismo é combatido por antioxidantes produzidos pelo corpo ou absorvidos da dieta. Pode-se acrescentar também a citação de Halliwell et al. de que "antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo". Os antioxidantes produzidos pelo corpo agem enzimaticamente, a exemplo da GPx, CAT e SOD2 ou, não enzimaticamente a exemplo de GSH, peptídeos de histidina, proteínas ligadas ao ferro (transferrina e ferritina), ácido diidrolipóico e CoQH2. Além dos antioxidantes produzidos pelo corpo, o organismo utiliza aqueles provenientes da dieta como a vitamina E, β -caroteno, vitamina-C e compostos fenólicos onde se destacam os flavonóides e poliflavonóides³⁵.

6.3 AS DOSAGENS DE PROTEÍNA C REATIVA

Quanto à utilização da PCR, como marcador de processo inflamatório agudo, as amostras iniciais (T0) foram negativas, o que demonstra ser a amostra avaliada no presente estudo, isenta de fatores indutores de processo inflamatório.

A PCR é o protótipo das proteínas de resposta de fase aguda e foi a primeira a ser descrita, tem estrutura pentamérica pertencente à família das pentraxinas, composta. É produzida pelo hepatócito, sob estímulo e controle de citocinas pró-inflamatórias, especialmente a IL-6, que é a principal indutora do gene da PCR e também da IL1, o TNF alfa e os produtos da ativação do complemento. Sua variabilidade na população é grande, refletindo mais sensivelmente variações no estado inflamatório, mesmo que este seja transitório. Entre as várias funções da PCR citam-se o reconhecimento de patógenos e células danificadas do hospedeiro, incluindo antígenos celulares, lipoproteínas e células apoptóticas, bem como a mediação de sua eliminação por recrutamento do sistema complemento e células fagocíticas^{30, 36, 41}.

No que se refere às determinações laboratoriais da PCR, estas podem ser realizadas por soroaglutinação em partículas de látex em lâmina, sendo o resultado expresso semiquantitativamente em cruzes, a partir de uma interpretação subjetiva.

Atualmente tornou-se possível a determinação quantitativa da concentração sérica da PCR através de imunonefelometria, expressando-se os resultados em mg/dL. No presente estudo empregou-se a imunonefelometria hipersensível, também denominada de alta sensibilidade ou ultra-sensível, que é o método de escolha para determinação de baixas concentrações séricas da PCR e a interpretação do resultado requer cuidadosa correlação com a história clínica e exame físico do paciente, uma vez que processos inflamatórios elevam os níveis basais de PCR⁴².

Tendo-se com base os estudos de Pepys et al. e de Volanakis et al., pode-se melhor compreender a elevação dos valores de PCR em T10 no presente estudo e também a sua manutenção até T30, pois estes autores comprovaram que após um estímulo inflamatório, a PCR se eleva rapidamente em no máximo 6 a 12 horas e intensamente (100 a 1000 vezes), e sua meia vida é de 19 horas o que possibilita afirmar que uma vez desencadeado o processo inflamatório ele se mantém ativo no paciente sob CEC^{43,44}.

Houve concordância entre os maiores e menores valores de PCR em relação aos maiores e menores tempos de CEC, demonstrando assim que quanto maior o tempo de CEC maior é o estresse oxidativo gerado, o que pode favorecer um desequilíbrio no controle das respostas orgânicas à inflamação.

6.4 O TEMPO DE CEC

A circulação extracorpórea foi o suporte para o desenvolvimento das cirurgias intracardiacas e para a realização de procedimentos de maior complexidade, nos quais se necessita de um campo exangue e estático. Desta forma, a CEC foi o instrumento que permitiu os maiores avanços na cirurgia cardiovascular. Porém, sua inocuidade é questionada devido aos problemas relacionados ao seu uso, principalmente quando se refere a um tempo de perfusão prolongado ⁴.

Contudo a CEC desencadeia importante resposta inflamatória em cirurgia cardíaca, sendo observado que é significativamente menor quando o tempo de CEC é inferior a 70 minutos⁵. No presente estudo o tempo médio de CEC foi de $60,3 \pm 22,13$ minutos, sendo que entre os 25 pacientes avaliados, treze tiveram tempo de CEC menores que 70 minutos e doze pacientes acima de 70 minutos com tempo máximo de 95 minutos e não ocorreram intercorrências per e pós-operatórias em nenhum dos pacientes.

Quando os resultados das dosagens de TBARS e PCR, analisadas em dois grupos conforme o tempo de CEC (abaixo e acima de 70 minutos), não foram observadas diferenças significantes entre as médias nos três momentos de coletas de amostras.

O tempo de perfusão está relacionado com ativação de uma resposta inflamatória sistêmica que leva a alterações em níveis celular e humoral, como ativação do sistema complemento e da cascata da coagulação, causando alterações de permeabilidade e reatividade vascular. Disfunções neurológicas estão relacionadas ao uso da CEC na RM, especialmente em tempo prolongado ^{5, 15}.

As complicações trombóticas nas cirurgias de RM se apresentam como as principais causas de mortalidade nessa população. Dentre elas, destaca-se o infarto do miocárdio (IAM) em razão de sua elevada incidência, que varia de 5% a 15%, conforme dados da literatura. As conseqüências do IAM perioperatório podem transitar desde pequenas elevações enzimáticas sem relevância clínica até quadros de baixo débito cardíaco ou taquiarritmias malignas, seguidos de óbito ou com redução de sobrevida em longo prazo, o que explica os esforços realizados na tentativa de evitar tal complicação ^{14, 19}.

nos pacientes diabéticos, o que justificava nosso critério de exclusão dos pacientes com esta doença de base³¹.

Quando foram iniciadas as dosagens do TBARS em três momentos da CEC observamos uma diferença entre as amostras, sendo que em T10, que representa os dez primeiros minutos de CEC, houve uma elevação significativa em relação aos valores basais e vai de encontro com a literatura que demonstra haver nos primeiros minutos de CEC o início do estresse oxidativo.

Ao se correlacionar TBARS com PCR em T10 há uma regressão linear, que não se mantém no T30, demonstrando assim que o TBARS não pode ser correlacionado diretamente com o PCR ou funcionar como um substituto do mesmo.

Por haver uma elevação significativa do PCR nos pacientes sob CEC podemos afirmar que há um processo inflamatório desencadeado, porém, como ele se mantém elevado durante toda a CEC, há uma dificuldade para usá-lo como marcador isolado em pós-operatório. Marcadores como a procalcitonina podem favorecer o diagnóstico de complicações no pós-operatório e já são muito utilizados nas cirurgias cardíacas pediátricas, porém, seu alto custo impossibilita a utilização em centros menores. A procalcitonina é alvo de vários estudos e demonstra maior especificidade em comparação a PCR no diagnóstico de infecção pós-operatória e também no acompanhamento do tratamento instituído⁴³.

Marty et al. afirmam que o material utilizado para a realização da CEC ativa vários níveis de resposta inflamatória sistêmica, este processo ocorre tanto no per quanto no pós-operatório. Em contrapartida defensores da cirurgia cardíaca sem CEC demonstram haver uma evolução mais favorável do paciente com menos complicações⁴⁵.

Também há a possibilidade de se utilizar N-acetilcisteína (NAC) como um protetor nos pacientes submetidos a CEC mas as amostras deveriam ser maiores para que se passe a usar rotineiramente nos pacientes cirúrgicos⁴⁶.

Há ainda pesquisadores que buscam novas formas de anestesia para os pacientes submetidos a RM sob CEC e isso pode ser mais uma forma de amenizar os danos ocasionados pelo procedimento⁴⁷.

Devemos lembrar que todas estas dosagens sanguíneas honeram os procedimentos realizados e devemos buscar marcadores seguros e de baixo custo para tornarmos acessíveis em todos os centros de cirurgia cardíaca⁴⁸.

7 CONCLUSÕES

Os níveis de TBARS e PCR apresentaram elevação progressiva nos dois tempos de CEC, com valor máximo no trigésimo minuto, demonstrando que esta diferença sugere haver uma resposta de estresse oxidativo e resposta inflamatória na evolução da CEC.

REFERÊNCIAS

1. Daiichi-Sankyo. História do Coração. 2009;1:10-28
2. Prates PR. Pequena história da cirurgia cardíaca: e tudo aconteceu diante de nossos olhos. Rev Bras Cir. 1999;14(3):177-84.
3. Braile DM, Godoy MF. História da cirurgia cardíaca. Arq Bras Cardiol. 1996;66(1):329-37.
4. Gomes WJ, Saba JC, Buffolo E. 50 anos de circulação extracorpórea no Brasil. Rev Bras Cir Cardiovasc. 2005;20(4):1-6.
5. Henriques LS, Forte WCN. Alterações imunológicas pós circulação extracorpórea. Rev Bras de Alerg e Imunopat. 2000;23(4):143-150.
6. Lima ES, Abdalla DSP. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação de amostras biológicas. J Pharmacol Sci. 2001;37(3):291-304.
7. Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. Rev Assoc Méd Bras. 1997;43(1):61-68.
8. Westaby S. Organ dysfunction after cardiopulmonary bypass. A systemic inflammatory reaction by the extracorporeal circuit. Intensive Care Med. 1987;13:89-95.
9. Barbosa RAG, Carmona MJ. Avaliação da função pulmonar em pacientes submetidos à cirurgia cardíaca com circulação extracorpórea. Ver Bras Anesthesiol. 2002 dez.;52(6):689-699.
10. Buffolo E. Revascularização miocárdica sem circulação extracorpórea. Arq Bras Cardiol. 2005 out.;85(4):287-288.
11. Gorla Jr JA, Fagundes DJ, Parra OM, Zaia CTBV, Bandeira COP. Fatores hepatotróficos e renervação hepática. Acta Cir Bras. 2001;16(4):261-266.

12. Mejia JAC, Souza NJD, Carvalho JRW, Pinto JRV, Mesquita FA, Brasil HB .Uso de óxido nítrico inalatório no tratamento da crise hipertensiva pulmonar no pós-operatório de transplante cardíaco. Ver Bras Cir Cardiovasc.
13. Brasil LA, Gomes WJ, Salomão R, Fonseca JHP, Branco JN, Buffolo E. Uso de corticóide como inibidor da resposta inflamatória sistêmica induzida pela circulação extracorpórea. Rev Bras Cir Cardiovasc. 1999 ;14(3):254-268.
14. Maack C, Kartes T, Kilter H, Schafers Hj, Nickenig G, Bohm M. Oxygen free Radical Release in Human Failing Myocardium in Associated with Increased Activity of Rac1-GTPase and Represents a Target for Statin Treatment. Circulation 2003;108:1567-1574.
15. Maulik N, Yoshida T. Oxidative Stress Developed During open Heart Surgery Induces Apoptosis:reduction of Apoptotic cell Death by Ebselen, a Glutathione Peroxidase Mimic. J Cardiovasc Pharmacol. 2003;36:950;601-608.
16. Brasil LA, Gomes WJ, Salomão R, Fonseca JHP, Branco JN, Buffolo E.Uso de corticóide como inibidor da resposta inflamatória sistêmica induzida pela circulação extracorpórea.Rev Bras Cir Cardiovasc. 1999 jul./set.;14(3):254-268.
17. Suleiman M-S, Zacharowski K, Angelini GD. Inflammatory response and cardioprotection during open-heart surgery;the importance of anaesthetics.British Journal of Pharmacology.2008;153:21-33.
18. Moura HV, Pomerantzeff P, Gomes WJ. Síndrome da resposta inflamatória sistêmica na circulação extracorpórea:papel das interleucinas. Ver Bras Cir Cardiovasc. 2001;16(4):376-87.
19. Dhalla NS, Fagundes DJ, Parra OM, Zaia CTBV, Bandeira COP.Fatores hepatotróficos e regeneração hepática. Acta Cir Bras. 1997;43(1):61-68.
20. Belboul A, Roberts D, Borjesson R, Johnsson J. Oxygen free radical generation in healthy blood donors and cardiac patients:the protective effect of allopurinol.Perfusion .2000;16:59-65.
21. Ferrari R, Alfieri O, Curello S, Ceconi C, Cargnoni A, Marzollo P. Occurrence of Oxidative stress During Reperfusion of the Human Heart.Circulation.1990;81(1):201-211.

22. Guizilini S, Gomes WJ, Faresin MS, Bolzan DW, Alves AF, Catani R. Avaliação da função pulmonar em pacientes submetidos à cirurgia de revascularização do miocárdio com e sem circulação extracorpórea. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2005;20(30):310-316.
23. Milani R, Brofman P, Varela A, Moutinho JÁ, Guimarães M, Pantarolli R. Revascularização total do miocárdio sem circulação extracorpórea: cinco anos de experiência. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2005;20(1):52-57.
24. Neto AF, Silva JCCB. Estudo das alterações oxidativas, da capacidade antioxidante total e do óxido nítrico em ratos submetidos à isquemia e reperfusão de membros posteriores. *Acta Cir Bras.* 2005;20(20):134-139.
25. Milei J, Forcada P, Fraga CG, Grana DR, Tritto I, Jannelli G. Lipoperoxidacion de Membranas y dano ultraestructural por estrés oxidativo em isquemia-reperfusion miocárdica. *Ver Argent Cardiol.* 2006;74:12-18.
26. Curello S, Ceconi C, Giuli F, Panzali AF, Milanesi B, Calarco M. Oxidative stress during reperfusion of human heart: potential sources of oxygen free radicals. *Cardiovascular Research.* 1995;29:118-125.
27. Andrade JR, Souza RB, Santos AS, Andrade DR. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. *J Bras Pneumol.* 2005;31(1):60-68.
28. Bagis S, Tamer L, Bilgin GSR, Guler H, Ergodan BEC,. Free radicals and antioxidants in primary fibromyalgia: an oxidative stress disorder? *Rheumatol Int.* 2005;25(3):188-190.
29. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Meth enzymol.* 1978;52:302-309.
30. Ridker PM, Rifai N. C-Reactive Protein and Cardiovascular Disease. ST-Laurent, Canada: MediEdition; 2006; cap. 1-3: 1-51.
31. Raja Shahzad G, Berg GA. Impact of Off-Pump Coronary Artery Bypass Surgery on Systemic Inflammation: Current Best Available Evidence. *J C Surg.* 2007; 22:445-455.
32. Jaeger Cp, Kalil R, Guaragna JCC, Petraco JB. Fatores preditores de infarto do miocárdio no período perioperatório de cirurgia de revascularização miocárdica. *Braz J Cardiovasc Surg.* 2005;20(3):291-295.

33. De Vroege R, Van Oeveren W, Klarenbosch J, Stooker W, Hack CE. The impact of hepari-coated cardiopulmonary Bypass circuitas on pulmonary function and the release of Inflammatory mediators. *Anesth Analg*. 2004;98(6):1586-94.
34. Thommasen HV. The reole of the polymorphonuclear leucocyte in the pathogenesis of the adult respiratory distress syndrome. *Clin Invest Med*. 1985;8:185-94.
35. Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods enzymol*. 1990;186:1-85.
36. Kakkar R, Kalra J, Mantha SV, Prasad K. Lipid peroxidation and activity of antioxidant enzymes in diabetic rats. *Molecular and celular Biochemistry*. 1995;151:13-119.
37. Matsubara LS, Ferreira ALA, Tornero MTT, Machado PEA. Influence of diabetes mellitus on the glutation redox system of human red blood cells. *Braz J Med Biol Res*. 1992;25:331-5.
38. Lucchi L, Ligabue G, Marietta M, Delnevo A, Malagoli M, Perrone S, Stipo L, Grandi F, Albertazzi A. aActivation of coagulation during hemoalysis: effect of blood lines alone and whole and whole extracorporeal circuit. *Artif Organs*. 2006Fev;30(2):106-110.
39. Antunes MV, Lazzaretti C, Gamaro GD, Linden R. Estudo pré-analítico e de validação para determinação de malondialdeído em plasma humano por cromatografia líquida de alta efeciência, após derivação 2,4-dinitrofenilhidrazina. *Ver Bras C Farm*. 2008;44(2):279-287.
40. Lima Es, Abdalla DSP. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Rev Bras Cien Farm*. 2001 abr./jun.;44(2)293-303.
41. Zanoni LZ, Melnikov P, Consolo LC, Poppi NR. Zinc children undergoin cardiac surgery with cardiopulmonary bypass. *Arq Bras cardiol*. 2008;90(6):49-51.
42. Matsubara LS, Ferreira ALA, Tornero MTT, Machado PEA. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Assoc Méd Bras*. 1997;43(1):61-8.

43. Pepys MB, Baltz ML. Acute phase proteins with special reference to C-reactive protein and related proteins and serum amyloid A protein. *Adv Immunol.*1983;34:141-212.
44. Volanakis JE. Human C-reactive protein: expression, structure, and function. *Mol Immunol.*2001;38(2-3):189-97.
45. Marty JC, Bendhadra S, Amoureux S, Guillard JC, Rochette L, Girard C. Oxidative stress is exacerbated in patients during cardiopulmonary bypass. *Ann Cardiol Angeiol.* 2008 Jun;57(3):155-160.
46. Köksal H, Rahman, Burma O, Halifeoglu I, Bayar MK. The effects of low dose N-acetylcysteine (NAC) as an adjunct to cardioplegia in coronary artery bypass surgery. *Anadolu Kariypl Derg.*2008 Dec;8(6):437-443.
47. Yildirim V, Doganci S, Aydin A, Bolcal C, Demirkilic U, Cosar A. Cardioprotective effects of sevoflurane, isoflurane, and propofol in coronary surgery patients: a randomized controlled study. *Heart Surg Forum.*2009 Jan ;129(1)E1-9.
48. Lima ES, Abdalla DSP. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Rev Bras Cien Farm.* 2001 abr./jun.;44(2):293-303.

ANEXOS

ANEXO A
PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA EM
SERES HUMANOS DO HOSPITAL ANGELINA CARON

HOSPITAL ANGELINA CARON
COMITE DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS

PARECER CONSUBSTANCIADO N.º 02/2006
(CONEP 196/96 – VII.13.b)

Protocolo número	Projeto	Pesquisador Principal	
001/06 20/01/06	“AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO NA CIRCULAÇÃO EXTRACORPÓREA EM PACIENTES SUBMETIDOS À CIRURGIAS DE REVASCULARIZAÇÕES MIOCÁRDICAS”	Dr. ^a Flora E. Melek Serviço de Cardiologia	
Comentários: 1. O referido projeto não prevê a aplicação de métodos invasivos ou terapêuticos, sendo apenas voltado à coleta de amostras de sangue de pacientes, nas oportunidades das coletas de sangue previstas para os exames rotineiros de pós-operatório cardíaco. 2. Projeto de pesquisa – adequado com revisão de literatura, objetivos, metodologia e cronograma 3. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) – adequado com terminologia clara e acessível aos pacientes (em anexo). 4. Foi apresentado orçamento detalhado do projeto de pesquisa (recursos, fontes e destino) e evidenciou-se que não ocorrerá nenhuma forma de remuneração dos pesquisadores envolvidos.			
Parecer Final			
(X) aprovado	() aprovado com recomendação Quesitos a serem atendidos não impedem sua realização	() pendente Não significa aprovado, devem ser atendidas as pendências	() não aprovado Pode ser reapresentado com adequações metodológicas e éticas
Quesitos a serem atendidos: <u>Não se aplica</u>			

Campina Grande do Sul, 23 de janeiro de 2006



Dr. Pedro Ernesto Caron
Presidente

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____, RG _____, abaixo qualificado, DECLARO para fins de participação em pesquisa, na condição de sujeito da pesquisa, que fui devidamente esclarecido do projeto de pesquisa intitulado **“AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO NA CIRCULAÇÃO EXTRACORPÓREA EM PACIENTES SUBMETIDOS À CIRURGIAS DE REVASCULARIZAÇÕES MIOCÁRDICAS”** desenvolvido pela Dr^a Flora E. Melek do Serviço de Cardiologia, quanto aos seguintes aspectos:

1. Justificativa, objetivos e procedimentos que serão utilizados na pesquisa;
2. Desconfortos e riscos possíveis e os benefícios esperados;
3. Liberdade de se recusar a participar ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado;
4. Garantia de sigilo quanto aos dados confidenciais envolvidos na pesquisa, assegurando-me absoluta privacidade;
5. Formas de indenização diante dos eventuais danos decorrentes da pesquisa;
6. Formas de ressarcimento das despesas decorrentes da participação na pesquisa.

DECLARO, outrossim, que após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me (nos) foi explicado, consinto voluntariamente desta pesquisa.

Campina Grande do Sul, de de 200__

DECLARAÇÃO DO PESQUISADOR

DECLARO, para fins de realização de pesquisa, ter elaborado este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), cumprindo todas as exigências contidas nas alíneas acima elencadas e que obtive, de forma apropriada e voluntária, o consentimento livre e esclarecido do declarante acima qualificado para a realização desta pesquisa.

Aracaju, de de 200__

Assinatura do Pesquisador

ANEXO B

RELAÇÃO DE PACIENTES INCLUÍDOS

Critérios de Inclusão

N.º	Idade	Sexo	Fração de Ejeção (%)	Creatinina (mg/dl)	Tempo de CEC (minutos)	Tempo de Pinçamento (minutos)	Número de Pontes
1	71	M	56	1,17	20	17	1
2	60	M	64	1,06	35	25	3
3	63	M	59	1,06	73	64	3
4	56	M	55	1,17	77	72	3
5	55	M	74	1,15	55	32	2
6	63	M	63	1,10	44	20	3
7	56	M	77	1,17	82	75	4
8	82	M	69	1,04	95	84	4
9	49	M	50	1,17	52	50	4
10	58	F	60	0,95	76	68	3
11	57	M	62	1,08	86	73	4
12	48	M	68	1,12	88	54	3
13	54	M	65	0,92	82	30	4
14	62	F	61	1,12	76	40	2
15	64	F	61	1,12	70	64	4
16	72	M	64	1,16	62	45	3
17	67	F	79	0,82	82	40	2
18	59	F	65	0,98	45	40	3
19	68	F	60	0,88	38	18	2
20	44	M	56	1,15	26	24	3
21	47	F	60	1,19	56	55	3
22	74	F	56	0,90	56	51	3
23	74	F	71	1,12	56	34	3
24	53	M	50	1,14	83	74	4
25	73	M	53	1,10	82	42	2
Mx	61,16	---	62,32	1,07	63,88	47,64	3
Dp	9,73	---	7,63	0,11	20,75	20,07	0,82

Nota: Mx - Média aritmética; DP - Desvio padrão.

ANEXO C

QUADRO DOS RESULTADOS DAS DOSAGENS EM TRIPLICATA DE TBARS(MDA) EM NANOMOLESMG DE PROTEÍNA, MÉDIAS, DESVIOS PADRÕES E AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA PELO TESTE DE ANOVA (1, 2, E 3)

N.º	T0					T10					T30				
	A1	A2	A3	Mx	DP	B1	B2	B3	Mx	DP	C1	C2	C3	Mx	DP
1	1,52	1,45	1,59	1,52	0,070	6,12	6,83	6,62	6,52	0,365	4,62	4,75	5,61	4,99	0,538
2	1,25	1,32	1,38	1,32	0,065	4,54	4,55	4,44	4,51	0,061	2,28	2,32	1,58	2,06	0,416
3	1,44	1,39	1,44	1,42	0,029	5,17	5,11	6,25	5,51	0,642	2,14	2,25	2,45	2,28	0,157
4	1,11	1,15	1,21	1,16	0,050	2,48	3,02	3,71	3,07	0,617	2,41	2,44	2,15	2,33	0,159
5	1,35	1,41	1,32	1,36	0,046	6,35	6,51	6,42	6,43	0,080	1,52	1,96	2,22	1,90	0,354
6	1,28	1,25	1,33	1,29	0,040	2,11	1,47	2,66	2,08	0,596	2,75	2,48	2,52	2,58	0,146
7	1,14	1,18	1,26	1,19	0,061	4,62	4,33	4,35	4,43	0,162	3,46	4,55	3,66	3,89	0,580
8	1,53	1,49	1,45	1,49	0,040	5,69	5,48	5,52	5,56	0,112	2,12	1,96	2,34	2,14	0,191
9	1,22	1,19	1,22	1,21	0,017	8,57	8,89	8,13	8,53	0,382	1,21	1,33	1,22	1,25	0,067
10	1,32	1,29	1,21	1,27	0,057	6,98	7,32	7,26	7,19	0,181	1,54	1,69	0,56	1,26	0,614
11	1,11	1,09	1,18	1,13	0,047	2,25	2,56	3,59	2,80	0,701	2,37	3,02	3,78	3,06	0,706
12	1,05	1,12	1,24	1,14	0,096	6,67	6,01	6,84	6,51	0,438	2,68	2,86	2,89	2,81	0,114
13	2,12	2,09	2,12	2,11	0,017	6,12	5,96	5,14	5,74	0,526	2,59	2,22	2,92	2,58	0,350
14	1,03	1,41	1,31	1,25	0,197	6,84	7,48	7,27	7,20	0,326	2,46	3,01	2,53	2,67	0,299
15	2,26	2,19	2,45	2,30	0,135	6,27	6,45	6,08	6,27	0,185	3,15	3,22	3,43	3,27	0,146
16	1,44	1,21	1,16	1,27	0,149	4,16	4,04	4,24	4,15	0,101	2,24	2,53	2,25	2,34	0,165
17	1,71	1,69	1,53	1,64	0,099	4,03	4,26	5,35	4,55	0,705	2,31	2,37	2,34	2,34	0,030
18	1,52	1,45	1,59	1,52	0,070	6,12	6,83	6,62	6,52	0,365	4,62	4,75	5,61	4,99	0,538
19	2,63	2,58	2,78	2,66	0,104	5,76	5,66	5,54	5,65	0,110	3,53	3,41	3,57	3,50	0,083
20	2,46	2,51	2,64	2,54	0,093	5,25	6,21	6,41	5,96	0,620	3,46	3,39	3,09	3,31	0,197
21	1,55	1,47	1,6	1,54	0,066	4,41	4,44	4,02	4,29	0,234	3,85	3,62	3,16	3,54	0,351
22	1,41	1,39	1,33	1,38	0,042	8,95	9,12	8,16	8,74	0,512	4,98	4,71	4,43	4,71	0,275
23	1,51	1,59	1,66	1,59	0,075	5,31	5,42	5,65	5,46	0,173	4,67	4,52	5,25	4,81	0,386
24	1,35	1,28	1,44	1,36	0,060	4,62	4,13	4,50	4,44	0,272	3,34	3,27	3,24	3,28	0,051
25	0,94	1,12	1,01	1,02	0,091	6,41	6,12	6,83	6,45	0,357	4,21	4,19	4,66	4,35	0,266
Mx±Dp	1,490±0,44	1,492±0,42	1,538±0,47	1,503	0,074	5,432±1,70	5,528±1,81	5,667±1,45	5,538	0,353	2,980±1,06	3,073±1,03	3,098±1,28	3,058	0,289
p	p=0,9105 (1)					p=0,8809 (2)					p=0,9274 (3)				

Nota: A1, A2, A3, B1, B2, B3, C1, C2 e C3: amostras em triplicatas de cada momento de avaliação; Mx: Média aritmética; DP: Desvio padrão; p: significância estatística - One-way Analysis of Variance (ANOVA).

(1) – Avaliação estatística dos resultados em triplicatas das amostras obtidas em T0 - One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is **0.9105**, considered **not significant**.

Variation among column means is not significantly greater than expected by chance.

Post tests

Post tests were not calculated because the P value was greater than 0.05.

Assumption test: Are the standard deviations of the groups equal?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations with identical SDs. This assumption is tested using the method of Bartlett.

Bartlett statistic (corrected) = 0.3110

The P value is 0.8560.

Bartlett's test suggests that the differences among the SDs is not significant.

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations that follow Gaussian distributions. This assumption is tested using the method Kolmogorov and Smirnov:

Group	KS	P Value	Passed normality test?
A1	0.2458	0.0974	Yes
A2	0.2623	0.0641	Yes
A3	0.2471	0.0944	Yes

Intermediate calculations. ANOVA table

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	2	0.03658	0.01829
Residuals (within columns)	72	14.030	0.1949
Total	74	14.067	

$F = 0.09385 = (MS_{\text{treatment}} / MS_{\text{residual}})$

(2) - Avaliação estatística dos resultados em triplicatas das amostras obtidas em T10 - One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is **0.8809**, considered **not significant**.

Variation among column means is not significantly greater than expected by chance.

Post tests

Post tests were not calculated because the P value was greater than 0.05.

Assumption test: Are the standard deviations of the groups equal?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations with identical SDs. This assumption is tested using the method of Bartlett.

Bartlett statistic (corrected) = 1.207

The P value is 0.5468.

Bartlett's test suggests that the differences among the SDs is not significant.

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations that follow Gaussian distributions. This assumption is tested using the method Kolmogorov and Smirnov:

Group	KS	P Value	Passed normality test?
=====	=====	=====	=====
B1	0.1006	>0.10	Yes
B2	0.08577	>0.10	Yes
B3	0.09631	>0.10	Yes

Intermediate calculations. ANOVA table

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
=====	=====	=====	=====
Treatments (between columns)	2	0.6993	0.3496
Residuals (within columns)	72	198.09	2.751
-----	-----	-----	-----
Total	74	198.79	

$F = 0.1271 = (MS_{\text{treatment}} / MS_{\text{residual}})$

(3) - Avaliação estatística dos resultados em triplicatas das amostras obtidas em T30 - One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is **0.9274**, considered **not significant**.

Variation among column means is not significantly greater than expected by chance.

Post tests

Post tests were not calculated because the P value was greater than 0.05.

Assumption test: Are the standard deviations of the groups equal?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations with identical SDs. This assumption is tested using the method of Bartlett.

Bartlett statistic (corrected) = 1.416

The P value is 0.4927.

Bartlett's test suggests that the differences among the SDs is not significant.

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations that follow Gaussian distributions. This assumption is tested using the method Kolmogorov and Smirnov:

Group	KS	P Value	Passed normality test?
C1	0.1460	>0.10	Yes
C2	0.1411	>0.10	Yes
C3	0.1110	>0.10	Yes

Intermediate calculations. ANOVA table

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	2	0.1926	0.09632
Residuals (within columns)	72	91.920	1.277
Total	74	92.112	

$F = 0.07545 = (MS_{\text{treatment}} / MS_{\text{residual}})$

ANEXO D

**QUADRO DOS RESULTADOS DAS DOSAGENS DE PROTEÍNA C REATIVA
(PCR) EM MG/DL, MÉDIAS, DESVIOS PADRÕES E AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA
PELO TESTE DE T-STUDENT**

N.º	T0	T10	T30
1	0	0	0
2	0	0	0
3	0	0,76	0,74
4	0	1,25	1,22
5	0	0,96	1,23
6	0	0	0
7	0	0,92	0,98
8	0	2,14	3,08
9	0	0,74	0,78
10	0	0,96	0,85
11	0	1,85	1,78
12	0	2,21	2,12
13	0	1,36	0,85
14	0	0,82	0,91
15	0	1,07	0,98
16	0	1,32	1,33
17	0	2,12	2,06
18	0	0,66	0,58
19	0	0	0
20	0	0	0
21	0	1,27	1,65
22	0	0,98	0,83
23	0	0,72	1,15
24	0	1,26	1,39
25	0	0,52	0,47
MX	0	0,9556	0,9992
Dp	0	0,6684	0,7576
p	---	0,8301	

Nota: A1, A2, A3, B1, B2, B3, C1, C2 e C3: amostras em triplicatas de cada momento de avaliação; Mx: Média aritmética; DP: Desvio padrão; p: significância estatística (T-Student)*

***Unpaired t test**

Do the means of T10 and T30 differ significantly?

P value

The two-tailed P value is **0.8301**, considered **not significant**.

t = 0.2158 with 48 degrees of freedom.

95% confidence interval

Mean difference = 0.04360 (Mean of T30 minus mean of T10)

The 95% confidence interval of the difference: -0.3627 to 0.4499

Assumption test: Are the standard deviations equal?

The t test assumes that the columns come from populations with equal SDs.

The following calculations test that assumption.

F = 1.285

The P value is 0.2721.

This test suggests that the difference between the two SDs is not significant.

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

The t test assumes that the data are sampled from populations that follow Gaussian distributions. This assumption is tested using the method Kolmogorov and Smirnov:

Group	KS	P Value	Passed normality test?
=====	=====	=====	=====
T10	0.1236	>0.10	Yes
T30	0.1101	>0.10	Yes

Summary of Data

Parameter:	T10	T30
Mean:	0.9556	0.9992
# of points:	25	25
Std deviation:	0.6684	0.7576
Std error:	0.1337	0.1515
Minimum:	0.000	0.000
Maximum:	2.210	3.080
Median:	0.9600	0.9100
Lower 95% CI:	0.6797	0.6864
Upper 95% CI:	1.232	1.312