



**Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Medicina**

Ieda Francischetti

**Efeito do módulo de inativação leucocitária (LIM) na
distribuição de ^{99m}Tc -granulócitos em porcos submetidos
à circulação extracorpórea e à isquemia-reperfusão de
coração e pulmões.**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Bases Gerais da Cirurgia da
Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP
para a obtenção do título de Doutor.**

Orientador: Prof. Dr. Winston Bonetti Yoshida

Botucatu-SP

2010

**Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Medicina**

Ieda Francischetti

**Efeito do módulo de inativação leucocitária (LIM) na
distribuição de ^{99m}Tc -granulócitos em porcos submetidos
à circulação extracorpórea e à isquemia-reperfusão de
coração e pulmões.**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Bases Gerais da Cirurgia da
Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP
para a obtenção do título de Doutor.**

Orientador: Prof. Dr. Winston Bonetti Yoshida

Botucatu-SP

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO

DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Francischetti, Ieda.

Efeito do módulo de inativação leucocitária (LIM) na distribuição de ^{99m}Tc-granulócitos em porcos submetidos à circulação extracorpórea e à isquemia/reperusão de coração e pulmões / Ieda Francischetti. – Botucatu : [s.n.], 2010.

Dissertação (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu, 2010.

Orientador: Winston Bonetti Yoshida

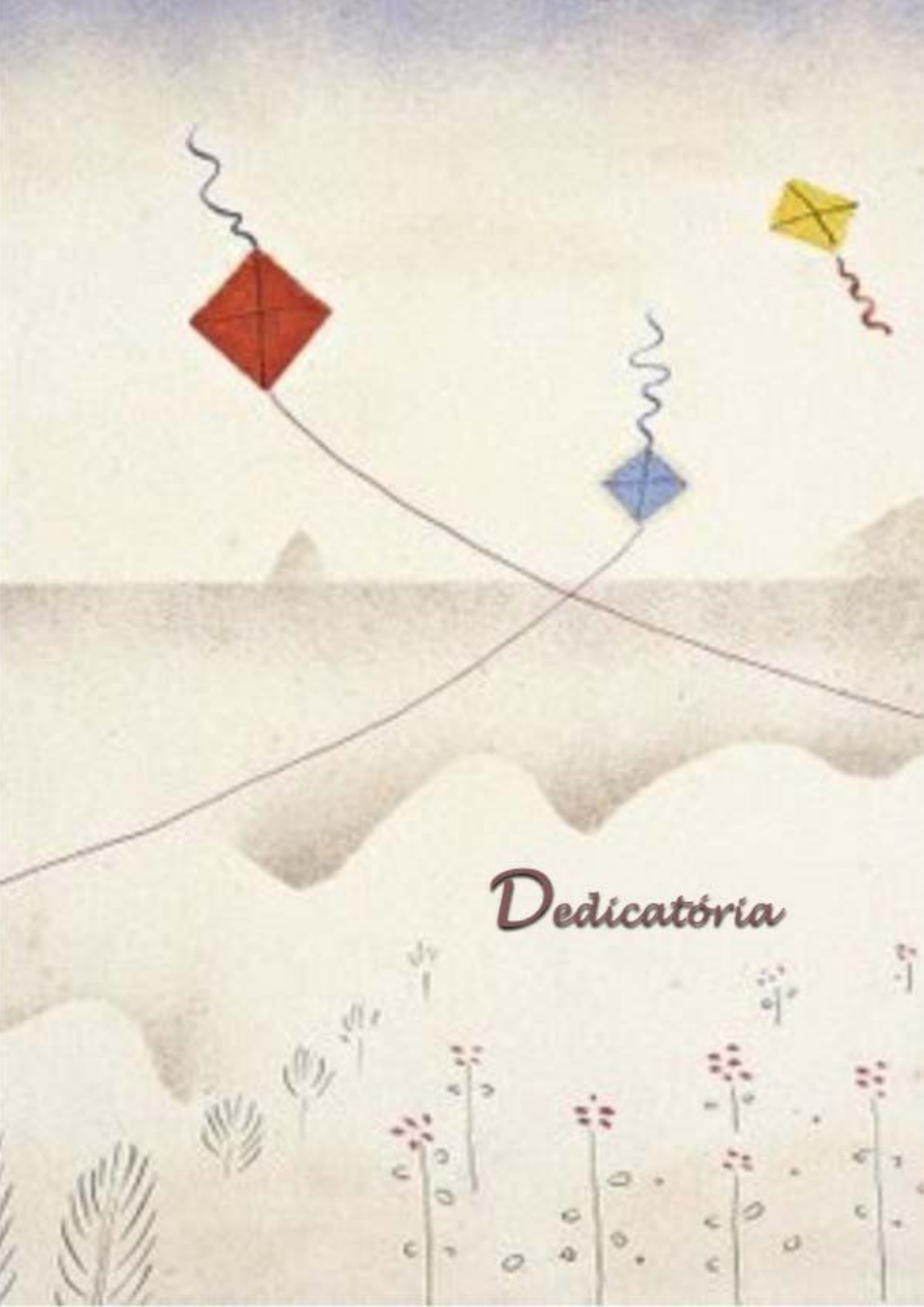
Assunto CAPES: 40102149

1. Coração – Cirurgia – Estudos experimentais 2. Doenças vasculares –

Aspectos imunológicos

CDD 617.412

Palavras-chave: Circulação extracorpórea; Complicação; Imunorregulação; Leucócito; Lesão de isquemia-reperusão



Dedicatória

Aos meus pais, irmãos, esposo e filhos,

*“A Criança Nova que habita onde vivo
Dá-me uma mão a mim
E a outra a tudo que existe
E assim vamos os três pelo caminho que houver,
Saltando e cantando e rindo
E gozando o nosso segredo comum
Que é o de saber por toda parte
Que não há mistério no mundo
E que tudo vale a pena”
Alberto Caeiro (Fernando Pessoa)*



Considerações Iniciais



Os textos correspondentes à seguinte Tese de Doutorado foram elaborados de acordo com a recomendação da coordenação do Curso de Pós-graduação da UNESP, tendo como objetivo facilitar a publicação dos trabalhos.

A dissertação foi subdividida em dois artigos: o primeiro, redigido como um artigo de revisão, intitulado: “Os leucócitos e a lesão de isquemia-reperfusão” e o segundo redigido conforme um artigo original denominado “Efeito do módulo de inativação leucocitária (LIM) na distribuição de ^{99m}Tc-granulócitos em porcos submetidos à circulação extracorpórea e à isquemia-reperfusão de coração e pulmões”. A parte experimental deste estudo foi realizada no *Tier Forschung Abteilung* (Departamento de Pesquisa em Animal) da *Johann Wolfgang Goethe Universität*, Universidade de Frankfurt, Alemanha. Ambos seguiram as normas do *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals*, de 2008, (Convenção de Vancouver*), elaboradas pelo *International Committee of Medical Journal Editors* (ICMJE).

* New England Journal of Medicine 1997; 336(4): 309-15.



Agradecimientos

Ao Professor Adjunto Winston Bonetti Yoshida, Professor Livre-docente da Disciplina de Cirurgia Vasculardo Departamento de Cirurgia e Ortopedia da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP, pela grande confiança, apoio imensurável e por sua sábia e precisa orientação.

Ao Professor Doutor Martin Scholz, Professor Adjunto do Departamento de Cirurgia do Trauma e Mão da Universidade Heinrich Heine - Düsseldorf, Alemanha, pelo incondicional apoio, sustentação técnica e material para o experimento, envolvimento e cuidadosa orientação.

Ao Professor Doutor José Bitu Moreno, Professor Chefe da Disciplina de Cirurgia Vasculardo Departamento de Medicina de Marília, por sua participação direta e imprescindível em todas as fases do projeto e execução do modelo experimental.

Ao Dr. Stefan Margraf, médico e engenheiro mecânico vinculado ao Departamento de Cirurgia Cárdio-Tóraco-Vascular da Universidade Johann Wolfgang Goethe, pela grande contribuição técnica e compromisso com o desenvolvimento deste projeto.

À Pós-Graduação da Faculdade de Medicina - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita" que me oportunizou realizar esta etapa de minha formação.

À Faculdade de Medicina de Marília, Famema, que apoiou e permitiu minha estada junto a Universidade Johann Wolfgang Goethe para o desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade Johann Wolfgang Goethe, especialmente ao Departamento de Cirurgia Córdio-Tóraco-Vascular, pelo acolhimento naquele serviço.

Ao Prof. Dr. Hissachí Tsují, pela confiança e apoio.

Agradeço aos seguintes setores da Universidade Johann Wolfgang Goethe:

Departamento de Cirurgia Córdio-Tóraco-Vascular, na pessoa do seu diretor, Prof. Dr. Anton Moritz e do médico assistente Dr. Ulf Abdel-Rahman;

Laboratório Central de Pesquisa, nas pessoas do seu diretor, Dr. Alf Theisen e do perfusionista Heinz Winklmaier;

Laboratório científico; nas pessoas da bióloga Dra. Kerstin Wilhem e da técnica de análises clínicas Vera Beinrucker;

Departamento de Medicina Nuclear; na pessoa de seu diretor, Prof. Dr. Frank Grünwald, dos físicos Dr. W. Tilman Kranert e Christian Happel e do médico assistente Dr. Jürgen Diener.

Agradeço:

À empresa Leukocare A.G., na pessoa do médico e diretor de qualidade, Dr. Jens Altrichter e da técnica de análises clínicas, Julia Quathamer, pelo apoio logístico e técnico;

Às bibliotecárias Helena Maria da Costa Lima e Josefina Barbosa de Faria da Faculdade de Medicina de Marília e Rosemary Cristina da Silva da Universidade Estadual Paulista, Campus Botucatu, pela competência e dedicação que dispensaram à revisão das referências deste trabalho;

À Selma Maria de Jesus, pela realização da ficha catalográfica;

Ao Prof. Dr. Sebastião Marcos Ribeiro de Carvalho, pelo tratamento estatístico dos dados;

À Profa. Maria Dercí da Silva Nóbrega, pelo grande cuidado que dispensou à forma final deste trabalho.

Agradeço ao meu esposo, José Bitu Moreno, pelo apoio incondicional, presença e estímulos constantes.

Agradeço aos meus pais e irmãos por nossa querida, afetuosa e unida família, que tanto tem nos impulsionado em nossos sonhos.

Agradeço aos nossos filhos amados que vivenciaram cada momento desta experiência, tornando-a uma grande aprendizagem.



Lista de Abreviaturas e Siglas



Ac -	anticorpo
ACD-A -	solução de citrato, composta por: A, ácido cítrico monohidratado; C, citrato de sódio dihidratado; D, glicose monohidratada e A, água destilada.
ADP-	difosfato de adenosina
Ag -	antígeno
AK -	<i>Aktivitätskonzentration</i> (concentração atividade radioativa)
Apo-1-	proteína receptora de morte celular, também denominada Fas e CD-95
be -	<i>base excess</i> (excesso de base)
bpm -	batimentos por minuto
°C -	grau Celsius
CAE -	naftol-cloroacetatoesterase
CD 11 -	receptor proteico, componente α de várias integrinas (moléculas de adesão leucocitária)
CD 18 -	receptor proteico, componente β de várias integrinas (moléculas de adesão leucocitária)
CD 95 -	receptor proteico de morte celular, também denominado Fas e Apo-1
CEC -	circulação extracorpórea
CK -	creatinaquinase
CK-mB -	creatinaquinase, isoenzima mB
Cl ⁻ -	cloro
C3a-	fração "a" da proteína C3 do sistema do complemento
C5a-	fração "a" da proteína C5 do sistema do complemento
cpm -	<i>critical path method</i> (algoritmo de relação da atividade radioativa)
DISC -	complexo sinalizador indutor de morte
dl -	decilitro
DNA-	ácido desoxirribonucleico
DP -	desvio padrão
ECG -	eletrocardiograma

ELISA -	<i>enzyme-linked immunosorbend assay</i> (teste imunoenzimático)
EP-	erro padrão
<i>et al.</i> -	<i>et alli</i>
EUA -	Estados Unidos da América
Exp -	<i>exposure</i> (exposição)
FADD -	Fas proteína de morte
Fas -	receptor proteico de morte celular, também denominado CD-95 e Apo-1
Fas-L -	proteína ligante do Fas
FC -	freqüência cardíaca
FDL -	filtro para depleção leucocitária
FS -	<i>Forward Scatter</i> (dispersão anterior)
F -	French (unidade de medida)
F -	nível de significância (análise estatística)
g -	grama
G -	Gauge (unidade de medida)
gl -	grau de liberdade
GTP -	guanosina trifosfato
G1 -	grupo controle sem cirurgia
G2 -	grupo controle com cirurgia
G3 -	grupo com cirurgia e CEC
G4 -	grupo com cirurgia, CEC e LIM
h -	hora
Hb-	hemoglobina
HES -	hidroxetilamido
Ht -	hematócrito
H ₂ O ₂ -	peróxido de hidrogênio
IAM -	infarto agudo do miocárdio
IAP -	proteína inibidora de apoptose
IC -	intervalo de confiança
ICAM-1 -	<i>intercellular adhesion molecule-1</i> (molécula de adesão intercelular-1)

ICSH -	<i>International Committee for Standardization in Haematology</i>
IL -	interleucina
In -	constante de ionização
IP-3K-	fosfoinositol-3 quinase
l -	litro
K+ -	potássio
kBq -	quilobecquerel (1kBq=1x10 ³ Bq)
Kg -	quilo
KCl -	cloreto de potássio
LIM -	módulo de inibição leucocitária
LPS -	lipopolissacarídeo
LI -	limite inferior
LS -	limite superior
LTB ₄ -	leucotrieno B ₄
M -	média
Mac-1 -	receptor de adesão: antígeno de macrófago 1
Md -	mediana
MBq -	megabecquerel (1MBq=1x10 ⁶ Bq)
MEE -	músculo estriado esquelético
Mg -	magnésio
min -	minuto
ml -	mililitro
mM -	milimol
mm -	milímetro
mosm -	miliosmol
M1 -	momento 1; anestesia
M2 -	momento 2; imediatamente antes do início da CEC ou momento equivalente nos outros grupos.
M3 -	momento 3; imediatamente antes do início da reperfusão cardiopulmonar ou momento equivalente nos grupos.
M4 -	momento 4; término da reperfusão cardiopulmonar ou momento equivalente nos grupos
nm -	nanômetro

n -	tamanho da amostra
ng -	nanograma
NaCl -	solução de cloreto de sódio
NADPH -	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NET -	<i>neutrophil extracellular traps</i> (redes extracelular neutrofilica)
NO -	óxido nítrico
NO ₂ [·] -	dióxido de nitrogênio
OONO ⁻ -	peroxinitrito
O ₂ -	oxigênio molecular
O ₂ ^{·-} -	radical superóxido
OH [·] -	radical hidroxil
p -	nível de significância
PA -	pressão arterial
PAF -	fator ativador plaquetário
PAm -	pressão arterial média
PaO ₂ -	pressão de oxigênio arterial
PBS -	<i>phosphate buffered saline</i> (solução tampão de salina fosfato)
PCO ₂ -	pressão de gás carbônico
PCT -	procalcitonina
pg -	picograma (milionésima parte de um micrograma)
PGI ₂ -	prostaciclina
pH -	potencial hidrogeniônico
PMNs -	células sanguíneas polimorfonucleares
PN -	pureza de neutrófilos
PTCA -	angioplastia percutânea transluminal coronária
PPET-1 -	pré-pró-peptídeo endotelina isoforma-1
RNA -	ácido ribonucleico
ROI -	região de interesse
r -	número amostral mínimo de cada grupo
rpm -	rotações por minuto
sg -	sangue

SIRS -	<i>systemic inflammatory response syndrome</i> (síndrome da resposta inflamatória sistêmica)
SPECT -	<i>single photon emission computed tomography</i> (tomografia computadorizada de emissão de fóton único)
SMAC -	segundo ativador da caspase derivado da mitocôndria
SS -	<i>Side Scatter</i> (dispersão lateral)
^{99m} Tc-HMPAO -	tecnécio ^{99m} -hexametilpropilenamina-oxima
TNF- α -	fator de necrose tumoral α
Tris-EDTA -	hidroximetilaminometano (tris), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA)
TRADD -	receptor TNF de morte
TXA ₂ -	tromboxane A ₂
UI -	unidade internacional
UTI -	Unidade de Terapia Intensiva
VCAM -	<i>vascular cell adhesion molecule</i> (molécula de adesão de célula vascular)
VCM -	volume corpuscular médio
VLA -	<i>very late antigens</i> (antígenos muito tardios)
VHS -	velocidade de hemossedimentação sanguínea
VPM -	volume plaquetário médio
VV -	volume ventilatório
ZVAD-fmk-	Z-Val-Ala-DL-Asp-fluorometilquetone
μ l -	microlitro
α M β 2 -	integrina leucocitária também denominada Mac-1



Índice

Índice

Os leucócitos e a lesão de isquemia-reperfusão na circulação extracorpórea (CEC).....	01
Resumo.....	02
Abstract.....	03
Introdução.....	04
<i>Reperusão, leucócitos e RLO.....</i>	05
<i>Interações celulares envolvendo a resposta inflamatória.....</i>	07
<i>Apoptose.....</i>	16
<i>Vantagens e limitações do uso da CEC.....</i>	19
<i>Atenuação da resposta inflamatória: atuações sobre os neutrófilos</i>	20
Conclusão.....	23
Referências.....	24
Efeito do módulo de inativação leucocitária (LIM) na distribuição de ^{99m} Tc-granulócitos em porcos submetidos à circulação extracorpórea e à isquemia-reperfusão de coração e pulmões.....	35
Resumo.....	36
Abstract.....	38
Introdução.....	40
Objetivos.....	42
Materiais e métodos.....	43
<i>Grupos de estudo.....</i>	43
<i>Anestesia.....</i>	45
<i>Coleta de sangue.....</i>	46
<i>Cirurgia.....</i>	46
<i>Injeção periumbilical com lipopolissacarídeo.....</i>	50
<i>Preparação dos granulócitos PMNs e marcação com ^{99m}Tc-HMPAO para cintilografia.....</i>	50
<i>Dosagem de DNA-livre.....</i>	54
<i>Histologia e coloração.....</i>	55
<i>Cintilografia.....</i>	55
<i>Análise sanguínea.....</i>	56
<i>Análise estatística.....</i>	57
Resultados.....	60

<i>Pressão arterial média</i>	60
<i>Frequência cardíaca</i>	60
<i>pH arterial</i>	61
<i>Hemoglobina e hematócrito</i>	61
<i>Neutrófilos</i>	62
<i>DNA-livre</i>	63
<i>Interleucina-6</i>	63
<i>Distribuição de granulócitos</i>	63
<i>Cintilografia</i>	64
<i>Histologia</i>	67
Discussão	69
Conclusão	76
Referências	77
Apêndice	83



Artigo de Revisão

*Os leucócitos e a lesão de isquemia-reperfusão
na circulação extracorpórea (CEC)*

Os leucócitos e a lesão de isquemia-reperfusão na circulação extracorpórea (CEC)

The leukocytes and the ischemia-reperfusion injury in the extracorporeal circulation (ECC)

Dra Ieda Francischetti¹, Prof Dr José Bitu Moreno², Prof Dr Martin Scholz³,
Prof Dr Winston Bonetti Yoshida⁴

Resumo

O uso da circulação extracorpórea desencadeia uma resposta inflamatória sistêmica, que somada às reações em cadeia relacionadas à isquemia-reperfusão de coração e pulmões pode levar a lesões celulares e até falência de órgãos no pós-operatório de cirurgia cardíaca.

Vários estudos foram feitos visando melhor entendimento desses processos inflamatórios associados à circulação extracorpórea. Assim, esta revisão abordará os mecanismos de isquemia-reperfusão cardiopulmonar a ativação da cascata inflamatória por esse processo e o papel dos leucócitos na fisiopatologia destas lesões. Serão consideradas as interações de proteínas imunomoduladoras na resposta leucocitária e o bloqueio das mesmas por meio de filtros biológicos, do uso de anticorpos monoclonais e do estímulo à apoptose.

Palavras-chave: lesão isquemia-reperfusão, circulação extracorpórea, efeitos adversos, leucócitos, apoptose.

¹ Docente da Faculdade de Medicina de Marília, FAMEMA, Marília, SP.

² Docente, Doutor, Chefe da Disciplina de Cirurgia Vascular, FAMEMA, Marília, SP

³ Docente, Doutor, Adjunto do Departamento de Clínica Cirúrgica do Trauma e Mão, Universidade Heinrich-Heine, Düsseldorf, Alemanha.

⁴ Professor livre-docente, Adjunto da Disciplina de Cirurgia Vascular, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu, SP.

Abstract

The use of extracorporeal circulation starts a whole body inflammatory response that when added with a chain reactions related to heart and lung ischemia-reperfusion may cause cellular injuries and organ failures in the cardiac surgery pos-operative period.

Many studies were made to achieve better comprehension of the inflammatory process that occur with use of extracorporeal circulation. So, this review discusses the ischemia- reperfusion events, their large activated inflammatory cascade as well as the leukocytes role on the pathophysiology of their associated injuries. The interactions of immunomodulatory proteins with the leukocitary response and their blockade through leukocytes filters, the monoclonal antibody use and the apoptosis stimuli will be approached too.

Keywords: ischemia-reperfusion injury, extracorporeal circulation, adverse effects, leukocytes, apoptosis.

Introdução

As doenças cardiovasculares são, na atualidade, a principal causa de morte no mundo ocidental. No ano de 2005, elas corresponderam a 30% do total, o que significou 17,5 milhões de óbitos, sendo que 1/3 destes foram provocados pelas cardiopatias isquêmicas^{1,2}. Estima-se que, no ano de 2015, o número de óbitos crescerá para 20 milhões, demonstrando a importância de medidas que possam contribuir para sua menor incidência e melhor terapêutica¹.

Nas cardiopatias isquêmicas, tanto na fase aguda como na fase crônica, existe o risco potencial de duas situações importantes que, em última análise, podem levar a resposta inflamatória sistêmica: 1) a isquemia seguida por reperfusão cardíaca após a desobstrução das coronárias e 2) as complicações originadas do uso de circulação extracorpórea (CEC) nas cirurgias com assistolia cardíaca.

Durante a isquemia, prevalece o metabolismo anaeróbico, que leva ao aumento de lactato e fosfato inorgânico e diminuição do pH, do trifosfato de adenosina (ATP) e da creatina. A falta de ATP leva à falência das bombas transmembrana e a alterações no gradiente iônico das células, ocorrendo afluxo de sódio e cálcio para o meio intracelular e formação de edema celular. O aumento de cálcio intracelular ativa principalmente a fosfolipase A₂ e a calpaína entre outras proteases citoplasmáticas, enquanto a falência das bombas de hidrogênio lisossomais e a queda do pH ativam enzimas lisossômicas que lesam diretamente organelas celulares. A fosfolipase A₂

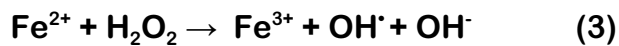
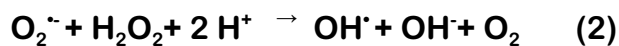
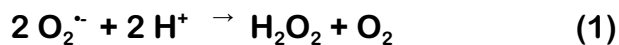
degrada o ácido aracdônico dando origem a mediadores da inflamação, como leucotrienos, prostaglandinas e tromboxanos. A ação destas substâncias desencadeia adesão e ativação neutrofílica, vasoconstricção, lesão tecidual, agregação plaquetária e quimiotaxia na área isquêmica^{3,4}. A calpaína, durante a isquemia, transforma a xantina desidrogenase, gerada pelo metabolismo anaeróbico, em xantina oxidase, que tem importância nas lesões de reperfusão, como se verá adiante³.

Por outro lado, a restauração do fluxo sanguíneo (reperfusão), necessária à recuperação da função celular, pode piorar as lesões presentes na isquemia, desencadeando lesões irreversíveis e morte celular. A reintrodução do oxigênio molecular (O₂) em tecido isquêmico produz radicais livres de oxigênio (RLO), altamente lesivos às células e que podem iniciar uma reação inflamatória sistêmica exacerbada. Especificamente nas cirurgias cardíacas com circulação extracorpórea (CEC), a isquemia cardiopulmonar inerente ao próprio procedimento cirúrgico provoca mecanismo lesivo adicional de isquemia e reperfusão, tanto nos pulmões como no coração, além de causar resposta imunológica por meio do contato do sangue com os materiais sintéticos de que é constituída a CEC^{5,6,7}.

Reperfusão, leucócitos e RLO

Em situações fisiológicas, a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) é o acceptor final de elétrons na cadeia respiratória, que tem a participação da enzima xantina desidrogenase catalisando essa reação, cujo produto final é a água. Nos tecidos pós-isquêmicos (na reperfusão) há o

acúmulo da xantina oxidase que, ao invés do NADPH, utiliza o O_2 , disponibilizado pela reperfusão, como acceptor final de elétrons. Na reação hipoxantina-xantina, os elétrons são transferidos para o O_2 , gerando o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o qual, espontaneamente ou por ação enzimática (reação com a superóxido dismutase-SOD), sofre dismutação em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), (reação 1). Por meio da reação descrita por Haber-Weiss (2), a reação entre H_2O_2 e $O_2^{\cdot-}$ pode dar origem “in vivo” ao radical hidroxil (OH^{\cdot}). Na presença de certos metais de transição (Fe^{2+} , Cu^{1+} , Co^{2+}), o OH^{\cdot} pode ser formado muito mais rapidamente, pela reação 3, descrita por Fenton^{3,8,9}.



Outras vias de produção de RLO conhecidas são a autooxidação de catecolaminas e a enzima NADPH-oxidase neutrofílica. Os neutrófilos ativados geram RLO nos vacúolos fagocitários, pela ativação da oxidase nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH-oxidase), que converte o O_2 em ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), seguindo-se a cadeia de eventos até a formação do radical OH^{\cdot} . A mieloperoxidase presente nos leucócitos catalisa a reação do H_2O_2 com o cloro, formando hipoclorito, potente agente oxidante^{10,11} (Figura 1).

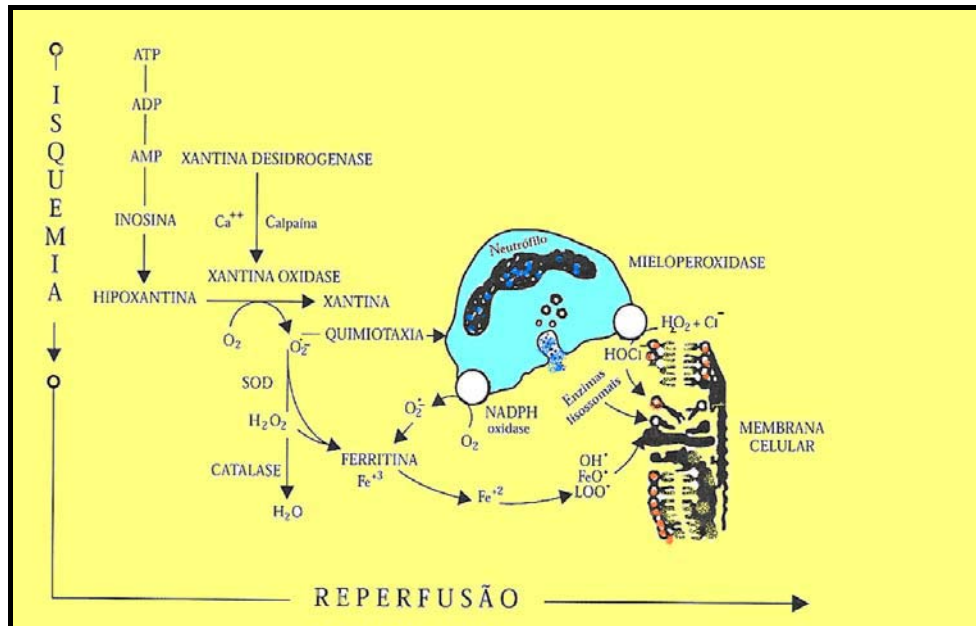


Figura 1 - Eventos bioquímicos da isquemia-reperfusão, ativação de neutrófilos e mecanismos de lesão. Adaptado de Kirschner & Fantini, 1994¹².

Os RLO e produtos da reação inflamatória funcionam como quimiotáticos, atraindo e ativando os leucócitos, os quais liberam várias enzimas proteolíticas como elastases, hidrolases, mieloperoxidasas e proteases, causando destruição tecidual e amplificando a resposta inflamatória e a quimiotaxia^{3,4,6}.

Interações celulares envolvendo a resposta inflamatória

Os leucócitos são as principais células sanguíneas envolvidas na resposta inflamatória embora plaquetas e eritrócitos também participem. Os leucócitos são classificados em neutrófilos (40-75%), linfócitos (20-50%), monócitos (2-10%), eosinófilos (1-6%) e basófilos (<1%). Destes, os neutrófilos são os mais importantes na patogênese da inflamação e são os maiores leucócitos com cerca de 12 a 18 micrômetros. Duram de 7-10 horas na circulação e sofrem apoptose em 24 horas, sendo as células predominantes nas primeiras 6 a 24 horas da maioria das inflamações agudas¹³.

As principais alterações da inflamação aguda ocorrem: 1) no calibre vascular com vasodilatação (com ou sem vasoconstrição transitória anterior) que levam a um aumento no fluxo sanguíneo, 2) alterações estruturais na microcirculação, que permitem o extravasamento de proteínas plasmáticas para o interstício em forma de exsudato inflamatório (edema) e 3) na migração de leucócitos da microcirculação e seu acúmulo no local de lesão inicial^{6,13}.

Logo após esta lesão inicial, ocorre vasodilatação e aumento da permeabilidade endotelial, provocando aumento da pressão hidrostática e diminuição da pressão osmótica do plasma, pela saída de líquido rico em proteínas. A perda de líquido resulta em concentração elevada de hemácias e aumento de viscosidade sanguínea, deixando o fluxo mais lento (estase), e contribuindo para que os leucócitos (especialmente os neutrófilos) se movam para as camadas mais periféricas da corrente sanguínea, iniciando a chamada marginação leucocitária ao longo do endotélio vascular⁶.

Em função da inflamação, após o processo de marginação, tanto células endoteliais quanto os leucócitos circulantes são ativados pelas substâncias inflamatórias circulantes. Inicia-se, então, a fase de rolamento dos leucócitos que por meio da exposição de seus receptores, L-selectinas, e a interação destes com os receptores P-selectinas das células endoteliais ativadas, desenvolvem uma fase de adesão frouxa com as células endoteliais que produzem este processo de rolamento³⁻⁶. A adesão firme ocorre posteriormente por meio do contato das integrinas leucocitárias com as imunoglobulinas endoteliais³⁻⁶.

Assim, no início do processo destacam-se as selectinas, dentre elas a P-selectina que participa apenas no rolamento, enquanto a E-selectina participa tanto no rolamento quanto na adesão de leucócitos ao endotélio, como destacamos a seguir:

1. A P-selectina é uma glicoproteína intracelular presente nas plaquetas e no endotélio, que quando expressa, liga-se principalmente aos neutrófilos, sendo essa ligação normalmente induzida pelo TNF e IL-1;
2. A E-selectina (ELAM-1), também exposta pelo endotélio ativado, é responsável pela adesão da maioria dos grupos leucocitários, principalmente no estágio inicial⁶;
3. A L-selectina está presente na superfície da maioria dos neutrófilos, monócitos e linfócitos, participa do início do processo de adesão dos leucócitos ao endotélio^{6,14}.

Em seguida, o processo caminha para a forte adesão quando participam as integrinas nos leucócitos e as imunoglobulinas nas células endoteliais. As integrinas são proteínas transmembrana da superfície celular que reagem a sinais de ativação celular e se ligam a imunoglobulinas e à matriz extracelular. Cada integrina contém cadeias α e β , com estruturas características, e classificadas segundo sua cadeia β :

1. As β 1-integrinas, também chamadas de *very late antigen* (VLA), estão presentes em leucócitos e contêm muitas subunidades de α 1 a α 6. A integrina α 4 β 1 (VLA-4 ou CD49d) é importante com relação à adesão leucocitária-endotelial, pois interage com a molécula de adesão celular vascular (VCAM-1);
-

2. As β 2-integrinas são rapidamente apresentadas pelos leucócitos em reação a quadros agudos. São β 2-integrinas as LFA-1 (também denominadas CD11a / CD18 ou α L β 2), e MAC-1 (CD11b/CD18 ou α M β 2). As integrinas MAC-1 e LFA-1 são as mais estudadas, sendo que a integrina MAC-1, em particular, desempenha papel primordial tanto na adesão quanto na diapedese de todos os leucócitos^{15,16}.

As imunoglobulinas são expressas nas células endoteliais como receptores para integrinas leucocitárias. A VCAM-1 e a molécula de adesão intracelular-1 (ICAM-1) são os principais receptores para as β 2-integrinas dos leucócitos^{6,14,15}.

Após a forte adesão ao endotélio, os leucócitos migram através de junções interendoteliais (diapedese) e se dirigem aos sítios de inflamação guiados pelos fatores quimiotáticos⁶ (Figura 2).

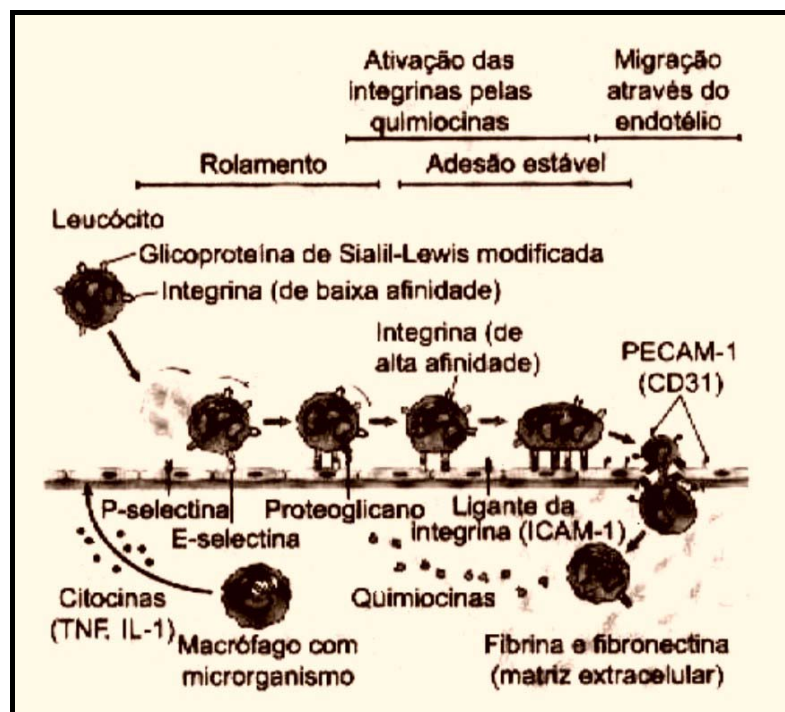


Figura 2 - Etapas do processo de migração leucocitária. Adaptado de Mitchell RN, Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Robbins & Cotran: fundamentos de patologia. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier;2006. Capítulo2, Inflamação aguda e crônica; p. 33.

Tanto a adesão como a diapedese leucocitárias são afetadas por mediadores químicos da inflamação, os quais além do efeito quimiotático, podem gerar uma cascata capaz de ampliar e liberar outros fatores estimulantes. A quimiotaxia envolve a ligação de mediadores químicos ou agentes quimiotáticos a receptores específicos na superfície da proteína G de leucócitos que ativa a via da fosfoinositol-3 quinase (IP-3K). Essas alterações causam aumento do cálcio citosólico e ativam as guanosinas trifosfatases (GTPases), favorecendo a apresentação de pseudópodes e o movimento leucocitário. Além da locomoção, os agentes quimiotáticos também induzem à ativação dos leucócitos com todas suas consequências: produção de metabólitos do ácido aracdônico; degranulação e secreção de enzimas lisossômicas; secreção de citocinas, assim como maior expressão de moléculas de adesão e maior exposição das integrinas.

Entre os mediadores da inflamação, encontram-se: aminas vasoativas (histamina, serotonina), metabólitos do ácido aracdônico (prostaglandinas, leucotrienos e lipoxinas), proteínas plasmáticas (sistemas do complemento, das cininas e da coagulação), fator de ativação das plaquetas (PAF), citocinas (TNF, e IL-1), óxido nítrico (NO), componentes lisossômicos dos leucócitos e RLO. Destes, os produtos do metabolismo do ácido aracdônico, fragmentos do complemento e as citocinas parecem ter ação fundamental na quimiotaxia^{3,4,5}. (Figura 3)

A histamina e a serotonina estão entre os primeiros mediadores químicos liberados durante a inflamação. São encontrados nos mastócitos, nos basófilos e nas plaquetas do sangue. A liberação dos mastócitos é desencadeada por diferentes fatores como reações imunológicas envolvendo

IgE, fragmentos do complemento C3a e C5a, citocinas (IL-1, IL-18) e fatores liberadores de histamina derivados de leucócitos. A liberação das plaquetas é estimulada após contato com colágeno, trombina, difosfato de adenosina (ADP), complexos antígeno-anticorpo e fatores de ativação das plaquetas.

Os metabólitos do ácido aracdônico também são importantes mediadores químicos da inflamação e agentes quimiotáticos. A partir do ácido aracdônico, por meio da via da lipooxigenase são formados os leucotrienos, dentre eles, o leucotrieno B₄ (LTB₄), que se liga a receptores específicos na superfície dos leucócitos dando origem a uma série de respostas que incluem, a ativação de adesão molecular das integrinas β_2 e aderência à célula endotelial. Os leucotrienos C₄ e D₄ e o TxA₂ afetam o fluxo sanguíneo e a perfusão pela ação direta na microcirculação. Pela via da ciclooxigenase são liberados a prostaciclina (PGI₂) e o tromboxane A₂ (TxA₂). A PGI₂ causa vasodilatação e inibe a agregação plaquetária, enquanto o TxA₂, sintetizado ao nível das plaquetas, causa forte vasoconstricção e induz fortemente à agregação plaquetária. O TxA₂ é um forte quimiotático para os neutrófilos e promove a ativação e a adesão dos mesmos ao endotélio^{5,6}.

Os fragmentos do complemento estão também entre os mais potentes agentes quimiotáticos. São proteínas plasmáticas que quando ativadas se tornam proteases que degradam outras proteínas do complemento, formando uma cascata. A ativação do complemento pode se dar por diversas vias, entre as quais a clássica (complexo Ag-Ac dependente, via deposição de IgM nos tecidos isquêmicos) e a via alternativa (hidrólise dependente), sendo que ambas causam a clivagem de C3, cujos produtos levam à lise celular, quimiotaxia, opsonização e alterações na permeabilidade vascular. Os

fragmentos C3a e C5a são importantes iniciadores da ativação neutrofílica e da produção de interleucina-8 (IL-8)^{4,17}.

As citocinas pró-inflamatórias são produzidas principalmente por linfócitos e macrófagos, mas também por células do endotélio¹⁸. As duas principais citocinas na inflamação aguda são o TNF- α e as interleucinas (IL-1, IL-6 e IL-8), que são importantes mediadores endógenos das moléculas de adesão. Sob influência das citocinas há exposição de cargas negativas na superfície das células endoteliais (fase de rolamento e adesão), ativando a pré-caliceína que, então, converte-se em caliceína e ativa o fator XII, o qual, ativado, ativa os neutrófilos. A degranulação neutrofílica, induzida por TNF- α ou pelo fator XIIIa, leva à destruição da arquitetura endotelial vascular por meio da liberação de enzimas proteolíticas, como elastase e colagenase^{4,5,6}.

A maioria dos agentes quimiotáticos, tem uma meia-vida curta, sendo inativados por enzimas ou por inibidores.

Proteínas lisossômicas de neutrófilos e monócitos, quando liberadas, podem também contribuir para a resposta inflamatória. Os neutrófilos têm grânulos específicos, menores que contêm lisozima, colagenase, gelatinase, lactoferrina, ativador do plasminogênio, histaminase; e grânulos azurófilos, maiores, com mieloperoxidase, fatores bactericidas (lisozima, defensinas), hidrolases ácidas e várias proteases neutras (elastase, catepsina G, colagenases). Esses grânulos podem descarregar seus conteúdos nos vacúolos fagocitários ou, alternativamente, os conteúdos podem ser excretados diretamente no espaço extracelular ou liberado após a morte celular. As proteases ácidas degradam proteínas, bactérias e fragmentos

somente dentro dos fagolisossomas, enquanto as proteases neutras são capazes de degradar os componentes extracelulares em um pH neutro. Os componentes lisossômicos podem aumentar ainda mais a permeabilidade vascular e a quimiotaxia, além de causar dano tecidual⁶.

Outro mediador da resposta inflamatória que também age alterando tônus e permeabilidade vascular além de ser agente quimiotático é o óxido nítrico (NO). O NO é sintetizado pela enzima óxido nítrico sintetase (NOS), presente no endotélio, que é ativada pelo aumento do cálcio intracelular ou pelos macrófagos após indução por determinadas citocinas, como interferon- γ . Além da vasodilatação, da inibição da agregação e adesão plaquetárias, o óxido nítrico também atua como um mecanismo compensatório para reduzir o recrutamento leucocitário. O NO, por outro lado, pode combinar-se com os RLO levando à formação de metabólitos como o peroxinitrito (OONO^-), S-nitrosotiol, e dióxido de nitrogênio (NO_2^{\cdot}), que são microbicidas, mas correm o risco de danificar as células do hospedeiro. O OONO^- ou seus produtos de decomposição podem iniciar a peroxidação lipídica sem a necessidade de ferro. Existem evidências que indicam que na isquemia e reperfusão existe uma estreita relação entre NO e endotelina^{5,6,19}. A endotelina, é um potente agente vasoconstrictor e responde a vários estímulos que aumentam os níveis de RNAm do pré-pró-peptídeo endotelina isoforma-1 (PPET-1) nas células endoteliais, entre eles: a isquemia, a trombina, lesão vascular e níveis baixos de NO. Este aumento de endotelina ocorre possivelmente à partir de metaloproteinases de matriz (gelatinase1 e 2) que via receptor proteína G da membrana celular neutrofílica leva a exposição de suas β -integrinas e à adesão dos neutrófilos ao endotélio²⁰⁻²² (Figura 3).

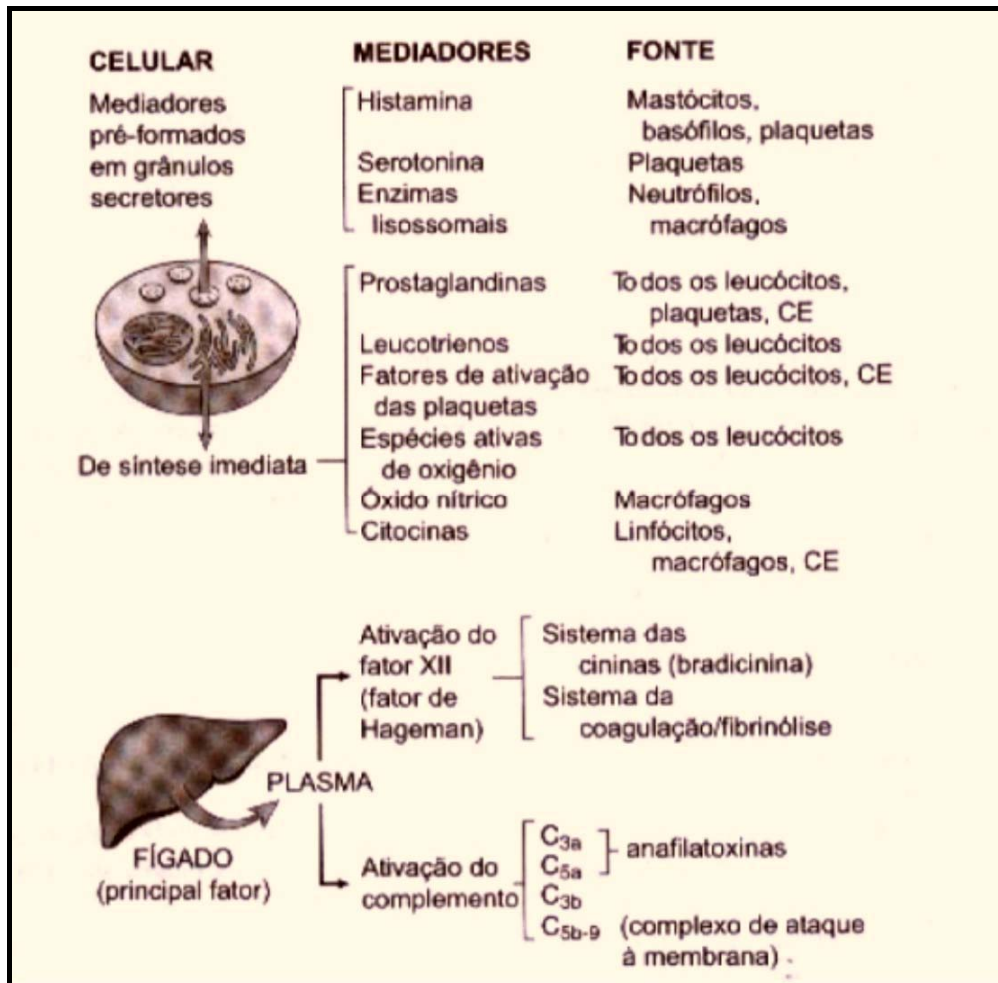


Figura 3 - Mediadores químicos da inflamação. Adaptado de Mitchell RN, Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Robbins & Cotran: fundamentos de patologia. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier;2006. Capítulo2, Inflamação aguda e crônica; p. 38.

Os RLO, além de mediadores químicos da resposta inflamatória, ativam diferentes vias mediadoras, tanto de expressão gênica (adaptação celular) como de apoptose. Níveis baixos ou moderados de RLO são controlados pelos mecanismos antioxidantes endógenos, enquanto níveis elevados podem lesar o DNA das células, assim como proteínas e lipídios, acarretando respostas como proliferação, parada de crescimento, senescência e até morte celular (apoptose)²³.

Apoptose

A apoptose é um mecanismo de morte celular programada, regulado por comandos intracelulares capazes de eliminar células indesejáveis sem lesar células vizinhas e sem causar processo inflamatório adjacente. Trata-se de um processo celular fisiológico muito importante para a homeostase tecidual, mas pode também ser desencadeada por situações patológicas^{6,23}.

Descrita em 1972, tem seu mecanismo regulado por controle genético²⁴. Neste processo, a membrana plasmática celular permanece íntegra enquanto as organelas se agrupam e a célula diminui de tamanho. A cromatina se prende à carioteca e pode ocorrer fragmentação do núcleo, enquanto se formam bolhas de citoplasma revestidas por membrana plasmática. Essas bolhas se desprendem e formam corpos apoptóticos, que são então reconhecidos e fagocitados sem que haja perda de integridade das membranas celulares, extravasamento de enzimas e processo inflamatório local, caracterizando assim, importante diferença entre a apoptose e a necrose⁶.

A via efetora da apoptose, via das caspases, é iniciada no citoplasma celular, por meio da ativação de proteínas do grupo das cisteína-proteases chamadas caspases (cysteine-aspartic-acid-proteases). As caspases identificadas em humanos são onze e dividem-se em dois tipos: iniciadoras, como as caspases 8 e 9, e efetoras, como as caspases 3 e 7²⁴⁻²⁶. Após ocorrer a ativação de uma caspase ativadora, o programa de morte enzimática é iniciado. Já as caspases efetoras vão atuar clivando proteínas do

citoesqueleto e levando à destruição do núcleo celular. São duas as vias iniciadoras das caspases: via extrínseca (de morte iniciada por receptor) e via intrínseca (mitocondrial). Ambas as vias confluem na via efetora²⁷ (Figura 4).

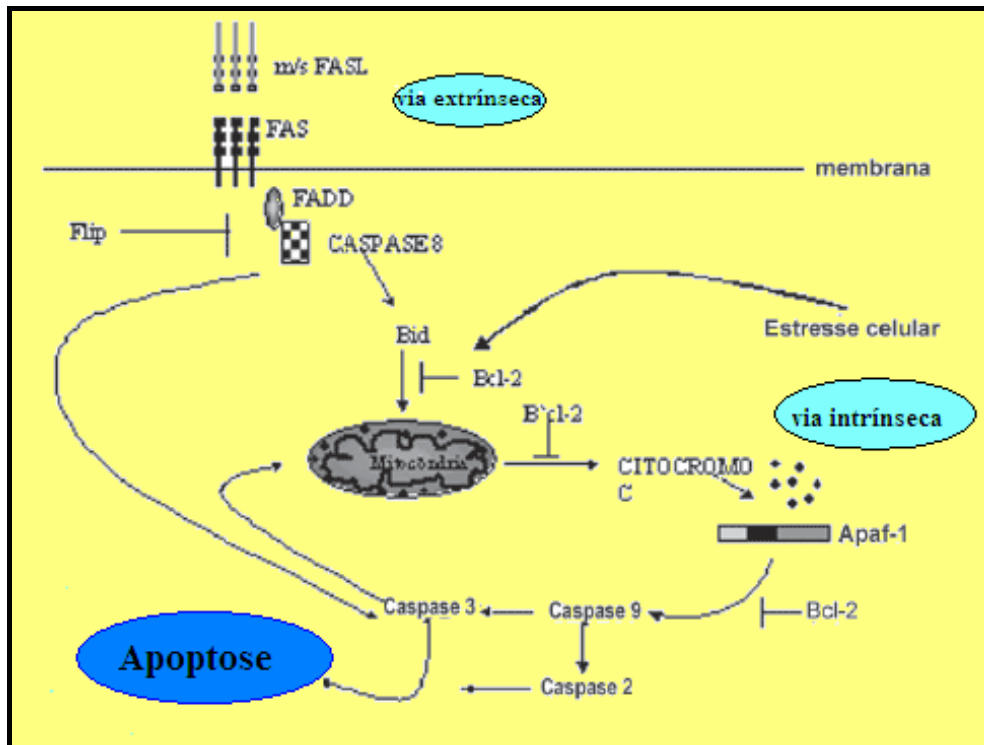


Figura 4 - Vias intrínseca e extrínseca de ativação das caspases.

O ativador interno da via intrínseca, citocromo c (Figura 4), responde a alterações mitocondriais, alterações de transporte elétrico, perda de potencial transmembrana, lesão por óxido-redução e, ainda, à participação pró e anti-apoptótica da família de proteínas Bcl-2) ou a lesões do DNA celular resultantes de toxicidade ou radiação. Os ativadores da via extrínseca são da família do TNF e se ligam ao receptor TNF-R1 e à via do Fas. O TNF-R1 inicia o processo apoptótico ao se ligar ao receptor TNF de morte (TRADD) e à Fas-proteína de morte (FADD)²³. O receptor Fas (APO-1 ou CD-95) se liga ao

FasL, outro componente do grupo do TNF. O complexo Fas e Fas-L resulta na formação do complexo sinalizador indutor de morte (DISC), o qual contém a FADD e ativa as caspases 8 e 10²⁵.

As caspases podem ser inibidas pela proteína inibidora de apoptose (IAP), a qual pode ser deslocada pelo segundo ativador da caspase derivado da mitocôndria (SMAC)²⁶. Estão sendo estudados inibidores das caspases na tentativa de reduzir a resposta inflamatória em modelos de isquemia-reperfusão cardíaca em ratos²⁸. Neste sentido, por exemplo, resultados preliminares mostram que a administração endovenosa de Z-Val-Ala-DL-Asp-fluorometilquetone (ZVAD-fmk) contribuiu, ao menos parcialmente, para a atenuação da apoptose dos cardiomiócitos²⁸.

Os RLO podem ativar numerosas vias de sinalização celular, e modular seja, direta ou indiretamente, as funções de muitas enzimas e fatores de transcrição por meio de sinais em efeito cascata. A dimensão e duração do estresse assim como o tipo celular envolvido são importantes fatores para determinar qual via será ativada²⁶.

Considerando a imensa rede inflamatória envolvida na lesão de isquemia-reperfusão, este quadro parece ser ainda mais complexo especificamente nos casos das isquemias miocárdicas, quando ao lado do tratamento da isquemia miocárdica, além da reperfusão, se soma o uso indispensável de CEC.

Vantagens e limitações do uso da CEC

Há mais de meio século foi feita a primeira cirurgia cardíaca com uso de CEC. Em todos esses anos subsequentes, a cirurgia cardíaca e a técnica de CEC foram aperfeiçoadas, pelo desenvolvimento de oxigenadores, cata-bolhas, materiais biocompatíveis, filtros e sistemas de bombeamento com vórtice centrífugo, entre outros, diminuindo a morbi-mortalidade do procedimento^{29,30}. Hoje, o uso da CEC é rotina indispensável na maioria dos serviços de cirurgia cardíaca no mundo, possibilitando diferentes abordagens cirúrgicas com segurança e eficácia. Mesmo assim, traz consigo muitos efeitos indesejáveis, provocando complicações pulmonares, renais, neurológicas, hemodinâmicas e distúrbios de coagulação, que podem levar a disfunções e, ocasionalmente, até a falência de órgãos, o que justifica tentativas para aprimorá-la ainda mais^{7,31-34}.

Nas cirurgias cardíacas com CEC, existem mecanismos lesivos provocados pela isquemia e reperfusão, tanto nos pulmões como no coração, assim como pela ativação da resposta imunológica desencadeada pelo circuito. Alterações mecânicas de fluxo sanguíneo e hemodiluição, decorrentes do uso da CEC, podem causar ativação de neutrófilos polimorfonucleares (PMN) e das plaquetas, sendo que o principal mecanismo ativador destes parece ser o contato do sangue com as superfícies artificiais da CEC. Durante a CEC, a isquemia pulmonar, embora parcial, contribui em muito para as lesões secundárias à ação de mediadores inflamatórios. Neste período, mesmo preservando-se o fluxo pelas artérias brônquicas, ele não é suficiente, pois estas suprem apenas 20% da necessidade de oxigenação tissular pulmonar⁷.

O uso de técnicas cirúrgicas minimamente invasivas, como as cirurgias cardíacas sem uso da CEC, surgiu, então, como alternativa principalmente em pacientes idosos, com múltiplas obstruções arteriais cardíacas, e outras co-morbidades^{35,38}. Ainda que muitos relatos clínicos refiram bons resultados com essas técnicas mini-invasivas, existem contra-indicações específicas a serem consideradas, como dilatação cardíaca, reoperação, pericardite e necessidade de remodelação cardíaca³⁵⁻³⁸.

Por outro lado, uma revisão da American Heart Association Council mostrou que os resultados comparativos entre abordagem com e sem o uso de CEC foram semelhantes entre os grupos, não indicando essa abordagem como substituta sistemática e vantajosa ao uso da CEC. O estudo relacionou, como parâmetros, tempo de hospitalização, mortalidade, função neurológica e desempenho cardíaco pós procedimento cirúrgico³⁸.

Atenuação da resposta inflamatória: atuações sobre os neutrófilos

Com o mesmo objetivo de atenuação da resposta inflamatória e das lesões de isquemia-reperfusão, outras abordagens foram propostas, como produção de neutropenia, ação de drogas atuando sobre aderência leucocitária e modificações nas soluções de cardioplegia visando a proteção celular.

A promoção de neutropenia através de filtro para depleção leucocitária (FDL)¹¹ e de radiação³⁹; a associação entre NO e hipotermia durante a CEC, diminuindo a aderência dos leucócitos ao endotélio^{40,41}; as modificações da solução de cardioplegia; a heparinização da superfície do sistema de CEC; a

adição de antiinflamatórios e de quelantes de RLO ao circuito^{4,42-44}, não foram suficientes para reduzir os marcadores inflamatórios no pós-operatório e para sustentar a padronização de quaisquer destas alternativas junto ao procedimento de CEC⁴⁵.

Em 1972 foram comercializados os primeiros FDLs⁴⁶. No final da década de 90, eram amplamente utilizados na CEC durante a cardioplegia, tanto no sangue transfundido como no aspirado do circuito ou nas soluções de preservação⁴⁷⁻⁴⁹.

Estudos clínicos iniciais indicaram efeitos benéficos de FDL na CEC, com menor liberação de enzimas leucocitárias, melhora na recuperação clínica, menor permanência em unidade de terapia intensiva (UTI) e custos mais baixos^{50,51}. Entretanto, outros autores mostraram que o uso de FDL parecia ser menos efetivo que o esperado⁵² e sua eficiência diminuía ao longo do tempo cirúrgico⁵³⁻⁵⁵. Observaram, ainda, que leucócitos presos nas malhas do filtro podiam ser ativados, liberando seus produtos na circulação^{56,57}. Assim, a partir desse ponto, os FDLs foram menos utilizados por falta de evidências suficientes sobre seu benefício⁵⁸.

A abordagem imunorreguladora da apoptose representa novo enfoque no controle inflamatório relacionado à CEC. Pois sabe-se hoje que o receptor de membrana Fas (CD95), conjugado com o ligante Fas (FasL), proteína produzida pelas células do sistema imunológico, além de induzir a apoptose, tem papel importante na regulação da proliferação celular e do crescimento tumoral. Assim, uma disfunção do Fas/FasL em células tissulares, protelando a apoptose, pode favorecer desordens proliferativas, enquanto uma menor atividade deste sistema apoptótico, nos PMNs, pode ter algum potencial terapêutico antiviral ou efeito anti-cancerígeno^{18,59,60}.

Ao interferir no tempo de vida das células, os receptores Fas/FasL podem funcionar como reguladores das respostas mediadas por PMNs⁶¹. Uma maior sobrevivência dos PMNs pode acarretar grande lesão tecidual pelo maior tempo de secreção de metabólitos tóxicos⁶², enquanto um menor tempo de vida pode amenizar reações imunes^{59,60}.

O potencial terapêutico de um anticorpo anti-Fas, na inativação neutrofílica rápida, foi constatado em estudos *in vitro*, estudos *in vivo* em animais, e em estudo clínico com pacientes submetidos à cirurgia cardíaca⁶³⁻⁶⁵. Os estudos *in vitro*, mostraram que células epiteliais infectadas por citomegalovírus, quando co-cultivadas com neutrófilos, levavam à inativação dos neutrófilos⁶⁶. Demonstraram que os neutrófilos tiveram seu receptor de membrana Fas rapidamente ativados pelos FasL das células epiteliais e evoluíram para um processo pré-apoptótico, com perda da atividade de adesão associada à redução da expressão da ICAM-1 (sítio de ligação para β 2-integrina CD11a/CD18)^{65,67-69}. Assim, considerando esses resultados, construíram um módulo de inibição leucocitária (*leukocyte inhibition module*- LIM[®]), aparentemente semelhante a um filtro biológico, mas com sua trama revestida por anticorpos anti-Fas. Esse módulo, quando introduzido na CEC em pacientes, resultou em diminuição da hiperatividade neutrofílica, com ativação significativa da apoptose dessas células^{63-65,70}.

Apesar dessa abordagem parecer promissora ao reduzir a quantidade de marcadores inflamatórios e apresentar boa recuperação cardíaca tanto em modelo animal quanto na clínica cirúrgica em humanos, ainda requer estudos com maior número de casos.

Conclusão

A grande amplitude da resposta inflamatória secundária às lesões de isquemia-reperfusão e ao uso da CEC sinaliza para a necessidade de medidas que possam senão inibi-la ao menos atenuá-la. Assim, o controle dos fatores de risco, a redução de eventos isquêmicos cardiovasculares, a capacitação técnica para cirurgias sem CEC, assim como os avanços na terapêutica anti-inflamatória, são medidas a serem reforçadas enquanto pesquisas devem ser fomentadas para que esses objetivos sejam alcançados.

Embora o uso dos filtros leucocitários e de drogas bloqueadoras dos mediadores inflamatórios não tenham se comprovado definitivos na atenuação das lesões de isquemia-reperfusão, a utilização de técnicas combinadas parece ser mais promissora por intervir em diferentes pontos da rede inflamatória.

O uso de módulo de inibição leucocitária que atua sobre o complexo Fas/FasL por meio da ligação de imunoglobulina anti-CD95 ao CD-95 leucocitário (LIM) tem se mostrado um procedimento terapêutico seguro, com a imobilização exclusiva de leucócitos ativados sem interferir com o número de linfócitos e sem alterar com o sistema de coagulação do paciente.

A abordagem imunorreguladora pode trazer novas perspectivas tanto agindo diretamente por meio de anticorpos contra mediadores inflamatórios, como na modulação de receptores de membrana celular responsáveis pela ativação, adesão, diapedese e quimiotaxia leucocitárias e ainda por meio da ativação ou inibição de proteínas das vias efetoras pró e anti-apoptóticas, firmando-se como um campo para contínuo aprofundamento.

Referências

1. World Health Organization. Programmes and Projects: Cardiovascular disease [site na Internet]. Ginebra: WHO; 2009. [citado 2009 abr 17]. http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/
 2. Ministério da Saúde (BR). DATASUS. Indicadores de mortalidade: taxa de mortalidade específica por doenças do aparelho circulatório [site na Internet]. Brasília: DATASUS; 2009. [citado 2009 abr 17]. <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2007/c08.def>
 3. Silveira M, Yoshida WB. Isquemia e reperfusão em músculo esquelético: mecanismo de lesão e perspectivas de tratamento. *J Vasc Br.* 2004;3(4):367-78.
 4. Moura HV, Pomerantzeff PMA, Gomes WJ. Síndrome da resposta inflamatória sistêmica na circulação extracorpórea: papel das interleucinas. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2001;16(4):376-87.
 5. Yoshida WB. Radicais livres na síndrome da isquemia e reperfusão. *Cir Vasc Angiol.* 1996;12:82-95.
 6. Mitchell RN, Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Robbins & Cotran: fundamentos de patologia. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier;2006. Capítulo2, Inflamação aguda e crônica; p.29-54.
-

-
7. Clark SC. Lung injury after cardiopulmonary bypass. *Perfusion*. 2006;21:225-8.
 8. Granger D N. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol*. 1988; 255(6 part 2): H1269-75.
 9. Grace PA. Ischemia-reperfusion injury. *Br J Surg*. 1994;81:637-47.
 10. Del Maestro RF, Planker M, Arfors KE. Evidence for the participation of superoxide anion radical in altering the adhesive interaction between granulocytes and endothelium, in vivo. *Int J Microcirc Clin Exp*. 1982;1:105-20.
 11. Johnson D, Thomson D, Hurst T, et al. Neutrophil-mediated acute lung injury after extracorporeal perfusion. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1994;107:1193-202.
 12. Kirschner RE, Fantini GA. Role of iron and oxygen-derived free radicals in ischemia-reperfusion injury. *J Am Coll Surg*. 1994; 179: 103-17.
 13. Junqueira LC, Carneiro C. *Histologia básica*. 10^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. p.223-37.
 14. Bevilacqua MP, Nelson RM. Selectins. *J Clin Invest*. 1993;91:379-87.
 15. Stewart M, Thiel M, Hogg N. Leukocyte integrins. *Curr Opin Cell Biol*. 1995;7:690-6.
-

-
16. Lu H, Ballantyne C, Smith W. LFA-1 (CD11a/CD18) triggers hydrogen peroxide production by canine neutrophils. *J Leukocyte Biol.* 2000;68:73-80.
 17. Gourlay T, Asimakopoulos G, Taylor KM. Leukocyte biology and pathogenicity in cardiac surgery and cardiology: the need for leukocyte depletion. In: Matheis G, Moritz A, Scholz M, editors. *Leukocyte depletion in cardiac surgery and cardiology.* Basel: Karger; 2002. p.1-12.
 18. Mojcić CF, Levy JH. Aprotinin and the systemic inflammatory response after cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg.* 2001;71:745-54.
 19. Cerqueira NF, Yoshida WB. Óxido nítrico. Revisão *Acta Cir Bras.* 2002;17(6):417-42.
 20. Carvalho MHC, Nigro D, Lemos VS, Tostes RCA, Fortes ZB. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. *Rev Bras Hipertens.* 2001;8(1):76-88.
 21. Farre LA, Riesco A, Espinosa G, et al. Effect of endothelin-1 on neutrophil adhesion to endothelial cells and perfused heart. *Circulation.* 1993;88:1166-1171.
 22. Fernandez-Patron C, Zouki C, Whittal R, et al. Matrix metalloproteinases regulate neutrophil-endothelial cell adhesion through generation of endothelin-1[1–32]. *FASEB.* 2001;15:2230-2240.
-

-
23. Gulbins E, Jekle A, Ferlinz K, Grassme H, Lang F. Physiology of apoptosis. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2000;279:F605-15.

 24. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Câncer.* 1972;26:239-57.

 25. Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nature Rev Immunol.* 2003;3:745-56.

 26. Martindale JL, Holbrook NJ. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol.* 2002;192:1-15.

 27. Mitchell RN, Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Robbins & Cotran: fundamentos de patologia. 7^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2006. Capítulo1, Adaptações celulares, lesão celular e morte celular; p.3-28.

 28. Yaoita H, Ogawa K, Maehara K, Maruyama Y. Attenuation of ischemia-reperfusion injury in rats by a caspase inhibitor. *Circulation.* 1998;97: 276-81.

 29. Stephenson LH. History of cardiac surgery. In: Cohn LH, Edmunds LH Jr. editors. *Cardiac surgery in the adult.* New York: McGraw-Hill, 2003. p. 329.

 30. Gomes WJ, Saba JC, Buffolo E. 50 anos de circulação extracorpórea no Brasil: Hugo J. Felipozzi, o pioneiro da circulação extracorpórea no Brasil. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2005;20(4):3-8.
-

-
31. Brasil LA, Gomes WJ, Salomão R, Buffolo E. Ativação de citocina (fator de necrose tumoral – alfa) e resposta clínica induzida pela circulação extracorpórea. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 1996;11:188-200.
 32. Sievers H-H, Freund-Kaas C, Eleftheriadis S, et al. Lung protection during total cardiopulmonary bypass by isolated lung perfusion: preliminary results of a novel perfusion strategy. *Ann Thorac Surg*. 2002;74:1167-72.
 33. Motwani JG, Topol EJ. Aortocoronary saphenous vein graft disease. pathogenesis, predisposition and prevention. *Circulation*. 1998;97:916-31.
 34. Gomes WJ, Erlichman MR, Batista Filho ML, et al. Vasoplegic syndrome after off-pump coronary artery bypass surgery. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2003;23:165-9.
 35. Buffolo E, Branco JN, Gerola LR, et al. Off-pump myocardial revascularization: critical analysis of 23 years' experience in 3.866 patients. *Ann Thorac Surg*. 2006; 81 (1): 85-9.
 36. Brasil LA, Gomes WJ, Salomão R, Buffolo E. Inflammatory response after myocardial revascularization with or without cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg*. 1998;66:56-9.
 37. Lobo Filho JG, Leitão MCA, Lobo Filho HG, et al. Cirurgia de revascularização coronariana esquerda sem CEC e sem manuseio da aorta em pacientes acima de 75 anos. *Rev Bras Cir Cardiovasc [online]*. 2002; 17(3): 208-14.
-

-
38. Selke FW, DiMaio JM, Caplan LR. Comparing on-pump and off-pump coronary artery bypass grafting: numerous studies but few conclusions: a scientific statement from the American Heart Association Council on cardiovascular surgery and anesthesia in collaboration with the Interdisciplinary Working Group on Quality of Care and Outcomes Research. *Circulation*. 2005;31:2858-64.
39. Belkin M, LaMorte WL, Wright G, Hobson RW. The role of leukocytes in the pathophysiology of skeletal muscle ischemic injury. *J Vasc Surg*. 1989;10:14-9.
40. Weyrich AS, Ma XL, Lefer AM. The role of L-arginine in ameliorating reperfusion injury after myocardial ischemia in the cat. *Circulation*. 1992;86:279-88.
41. El Habbal MH, Carter H, Smith LJ, Elliott MJ, Strobel S. Neutrophil activation in paediatric extracorporeal circuits: effect of circulation and temperature variation. *Cardiovasc Res*. 1995; 29:102-7.
42. Roberts I, Yates D, Sandercock P, et al. CRASH trial collaborators. Effect of intravenous corticosteroids on death within 14 days in 10008 adults with clinically significant head injury (MRC CRASH trial): randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2004; 364(9442):1321-8.
43. Havlicek K, Motycka V, Siller J, Cervinka V. Systemic inflammatory response syndrome (SIRS) in serious chest injuries: is a pharmacological blockade effective? *Ann Thorac Cardiovasc Surg*. 2005;11:232-7.
-

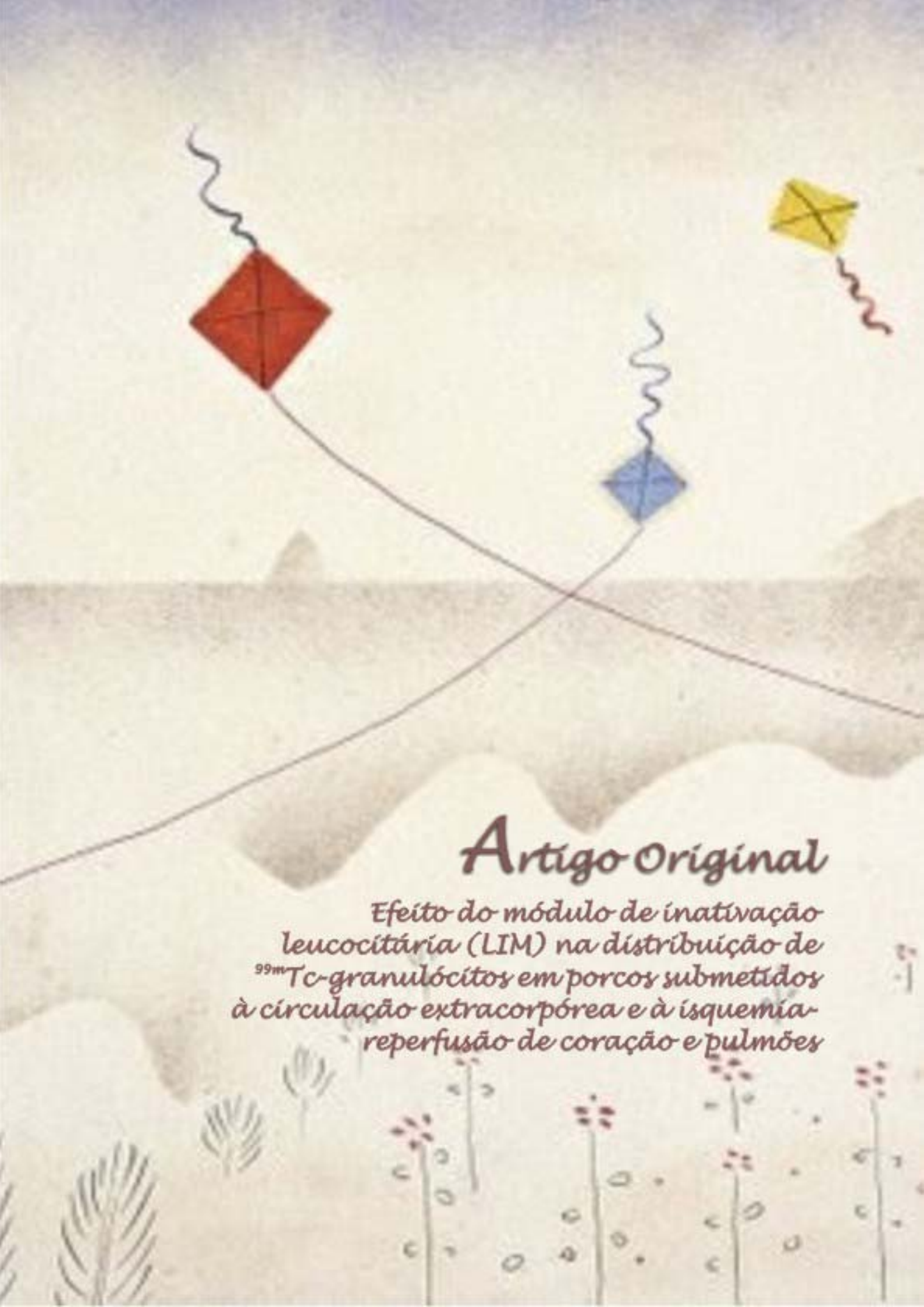
-
44. Goebel U, Siepe M, Mecklenburg A, et al. Reduced pulmonary inflammatory response during cardiopulmonary bypass: effects of combined pulmonary perfusion and carbon monoxide inhalation. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2008;34:1165-72.
45. Bartels C, Gerdes A, Babin-Ebell J, et al. Cardiopulmonary bypass: evidence or experience based? *J. Cardiovasc Surg.* 2002;124:20-7.
46. Greenwalt TJ, Gajewski M, McKenna JL. A new method for preparing buffy-coat poor blood. *Transfusion.* 1962;2:221.
47. Roth M, Kraus B, Scheffold T, Reuthebuch O, Klövekorn WP, Bauer EP. The effect of leukocyte-depleted blood cardioplegia in patients with severe left ventricular dysfunction: a randomized, double-blind study. *J Thorac ardiovasc Surg.* 2000;120:642-50.
48. van de Watering LMG, Hermans J, Houbiers JGA, et al. Beneficial effects of leukocytes depletion of transfused blood on postoperative complications in patients undergoing cardiac surgery: a randomized clinical trial. *Circulation.* 1998;97:562-8.
49. Lick SD, Brown Jr PS, Kurusz M, Vertrees RA, McQuitty CK, Johnston WE. Technique of controlled reperfusion of the transplanted lung in humans. *Ann Thorac Surg.* 2000;69:910-12.
-

-
50. Alexiou C, Tang AA, Sheppard SV, et al. The effect of leucodepletion on leucocyte activation, pulmonary inflammation and respiratory index in surgery for coronary revascularisation: a prospective randomised study. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2004;26:294-300.
51. Olivencia-Yurvati AH, Ferrara CA, Tierney N, Wallace N, Mallet RT. Strategic leukocyte depletion reduces pulmonary microvascular pressure and improves pulmonary status post-cardiopulmonary bypass. *Perfusion.* 2003;18 S1:23-31.
52. Leal-Noval SR, Amaya R, Herruzo A, et al. Effects of a leukocyte depleting arterial line filter on perioperative morbidity in patients undergoing cardiac surgery: a controlled randomized trial. *Ann Thorac Surg.* 2005;80:1394-400.
53. Gott JP, Cooper WA, Schmidt Jr FE, et al. Modifying risk for extracorporeal circulation: trial of four anti-inflammatory strategies. *Ann Thorac Surg.* 1998;66:747-53.
54. Baksaas ST, Flom-Halvorsen HI, Ovrum E, et al. Leucocyte filtration during cardiopulmonary reperfusion in coronary artery bypass surgery. *Perfusion.* 1999;14:107-17.
55. Smit JJ, de Vries AJ, Gu YJ, van Oeveren W. Efficiency and safety of leukocyte filtration during cardiopulmonary bypass for cardiac surgery. *Transfus Sci.* 1999;20:151-65.
-

-
56. Scholz M, Simon A, Matheis G, et al. Leukocyte filtration fails to limit functional neutrophil activity during cardiac surgery. *Inflammation Res.* 2002;51:363-8.
57. Ilmakunnas M, Pesonen EJ, Ahonen J, Rämö J, Siitonen S, Repo H. Activation of neutrophils and monocytes by a leukocyte-depleting filter used throughout cardiopulmonary bypass. *J Thoracic Cardiovasc Surg.* 2005;129:851-9.
58. Warren O, Alexiou C, Massey R, et al. The effects of various leukocyte filtration strategies in cardiac surgery. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2007;31(4): 665-76.
59. Los M, Burek CJ, Stroh C, Benedyk K, Hug H, Mackiewicz A. Anticancer drugs of tomorrow: apoptotic pathways as targets for drug design. *Drug Discov Today.* 2003;8:67-77.
60. Everett H, McFadden G. Apoptosis: an innate immune response to virus infection. *Trends Microbiol.* 1999;7:160-5.
61. Scheel-Toellner D, Wang K, Craddock R, et al. Reactive oxygen species limit neutrophil lifespan by activating death receptor signaling. *Blood.* 2004;104: 2557-64.
62. Albelda SM, Smith CW, Ward PA. Adhesion molecules and inflammatory injury. *FASEB J.* 1994;8:504-12.
-

-
63. Scholz M, Simon A, Berg M, et al. In vivo inhibition of neutrophil activity by a FAS (CD95) stimulating module: arterial in-line application in a porcine cardiac surgery model. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2004;127:1735-42.
64. Aybek T, Kahn MF, Dogan S, et al. Cardiopulmonary bypass impairs left ventricular function determined by conductance catheter measurement. *Thorac Cardiovasc Surg.* 2003;51:301-5.
65. Moreno JB, Margraf S, Schuller AM, Simon A, Moritz A, Scholz M. Inhibition of neutrophil activity in cardiac surgery with cardiopulmonary bypass: a novel strategy with the leukocyte inhibition module. *Perfusion.* 2004;19:11-6.
66. Cinatl Jr J, Blaheta R, Bittoova M, et al. Decreased neutrophil adhesion to human cytomegalovirus-infected retinal pigment epithelial cells is mediated by virus-induced up-regulation of Fas ligand independent of neutrophil apoptosis. *J Immunol.* 2000;165:4405-13.
67. Greenstein S, Barnard J, Zhou K, Fong M, Hendey B. Fas activation reduces neutrophil adhesion to endothelial cells. *J Leukoc Biol.* 2000;68:715-22.
68. Sieg S, Smith D, Kaplan D. Differential activity of soluble versus cellular Fas ligand: regulation by an accessory molecule. *Cell Immunol.* 1999;195:89-95.
-

69. Curtin JF, Cotter TG. Live an let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis. *Cell Signal*. 2003;15:983-92.
70. Abdel-Rahman U, Margraf S, Aybek T, et al. Inhibition of neutrophil activity improves cardiac function after cardiopulmonary bypass. *J Inflamm [revista eletrônica]*. 2007 Oct 10 [citado 2008 jun 11];4:21. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?artid=2100046&blobtype=pdf>
-



Artigo Original

Efeito do módulo de inativação leucocitária (LIM) na distribuição de ^{99m}Tc -granulócitos em porcos submetidos à circulação extracorpórea e à isquemia-reperfusão de coração e pulmões

Efeito do módulo de inativação leucocitária (LIM) na distribuição de ^{99m}Tc -granulócitos em porcos submetidos à circulação extracorpórea e à isquemia-reperfusão de coração e pulmões

The effect of leukocyte inhibition module (LIM) on ^{99m}Tc -granulocytes distribution in pigs submitted to extracorporeal circulation and to heart and lungs ischemia-reperfusion

Dra Ieda Francischetti¹, Prof Dr José Bitu Moreno², Dr Stefan Margraf³, Prof Dr Martin Scholz⁴, Prof Dr Winston Bonetti Yoshida⁵

Resumo

Contexto: A circulação extracorpórea (CEC), embora imprescindível em 90% das cirurgias cardíacas, provoca grande ativação do sistema imunológico e das cascatas inflamatórias, respondendo por grande parte da morbi-mortalidade nestes procedimentos. A neutralização do componente leucocitário poderia minimizar tais complicações.

Objetivos: Estudar-se o efeito do módulo de inativação leucocitária (LIM) na quantidade e distribuição de granulócitos nos tecidos, sangue e na resposta inflamatória.

Métodos: Utilizaram-se 24 porcos (*Deutsches Hausschwein*), randomizados em 4 grupos: só anestesia (G1); controle: só acessos e simulação da CEC (G2); circulação extracorpórea, CEC (G3) e CEC com LIM (G4). Os animais do G1 foram anestesiados por 240 min e tiveram amostras

¹Docente da Faculdade de Medicina de Marília, FAMEMA, Marília, SP.

²Docente, Doutor, Chefe da Disciplina de Cirurgia Vascular, FAMEMA, Marília, SP.

³Médico e engenheiro do Departamento de Cirurgia Cárdio-Tóraco-Vascular da Universidade Johann Wolfgang Goethe, Frankfurt am Main, Alemanha.

⁴Docente, Doutor, Adjunto do Departamento de Clínica Cirúrgica do Trauma e Cirurgia da Mão, Universidade Heinrich-Heine, Düsseldorf, Alemanha.

⁵Professor livre-docente, Adjunto da Disciplina de Cirurgia Vascular, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu, SP.

coletadas no momento 1 (início da anestesia), momento 2 (120 min depois), momento 3 (210 min) e momento 4 (240 min). Somente G3 e G4 foram submetidos à CEC, com 90 min de isquemia parcial de coração e pulmões (momento 3) e 30 min de reperfusão (momento 4), sendo que todos os animais receberam injeção de ^{99m}Tc -granulócitos antes do início da CEC, (momento 2) ou 120min do início do experimento. Após a eutanásia, coletaram-se biópsias de baço, cérebro, coração, fígado, músculo esquelético, pulmão, realizaram-se cintilografias e foram dosados DNA-livre e IL-6 de todos os animais.

Resultados: Semiquantitativamente, observou-se maior infiltrado granulocitário nos cortes histológicos de baço, fígado, pulmão e rim nos grupos CEC e CEC com LIM.

Em todos grupos, os ^{99m}Tc -granulócitos distribuíram-se, preferencial e similarmente, para o baço, fígado e pulmões, corroborando achados histológicos, exceto rins. Os parâmetros hemodinâmicos não mostraram diferenças estatísticas entre os grupos CEC e CEC com LIM.

As dosagens médias de DNA-livre foram significativamente mais elevadas nos grupos CEC e CEC com LIM, nos momentos 3 e 4 ($p < 0,01$), mas não houve diferença estatística entre esses 2 grupos. Os valores de IL-6 foram similares nos diferentes grupos e momentos estudados.

Conclusões: O uso do LIM não alterou a quantidade, a distribuição dos ^{99m}Tc -granulócitos, nem atenuou alterações laboratoriais relacionadas à CEC no modelo utilizado, demonstrando a ineficiência desse na redução de alterações inflamatórias.

Palavras-chave: lesão isquemia-reperfusão, circulação extracorpórea, efeitos adversos, neutrófilos, marcação por isótopo, imunoterapia.

Abstract

Background: Although the extracorporeal circulation (ECC) is essential for 90% heart surgery, it promotes an increased activation of the immune system and the inflammatory cascades; it is also responsible for the high morbidity and mortality in these cases. The neutralization of the leukocyte role in these events can minimize such complications.

Objective: To study the effect of leukocyte inhibition module (LIM) on the quantity, distribution of granulocytes in the tissues and blood and on the inflammatory response.

Methods: There were used twenty-four German landrace pigs that were randomized in 4 groups: only anesthesia (G1); control: only access and ECC simulation (G2); extracorporeal circulation, ECC (G3) and ECC with LIM (G4). The animals of G1 were anesthetized during 240 min and their samples were quantified at moment 1 (anesthesia beginning), moment 2 (120 min later), moment 3 (210 min) and moment 4 (240 min). Groups 3 and 4 underwent ECC 90 min parcial lung and heart ischemia (moment 3), followed by 30 min reperfusion (moment 4) and all animals received injection of ^{99m}Tc -granulocytes before the ECC beginning or on the correspondent moments in groups 1 and 2. Spleen, brain, heart, liver, muscle, lung and kidney biopsies as well as scintigraphies were carried out after euthanasia and free-DNA and IL-6 of all animals were quantified.

Results: Semiquantitatively, the ECC and ECC with LIM groups had larger spleen, liver, lung and kidney granulocytic infiltration. In all groups,

the ^{99m}Tc -granulocytes went preferential and similar to liver, spleen and lungs in agreement with histological findings except for kidney. The hemodynamics parameters did not show significant difference between ECC and ECC with LIM groups.

The mean free-DNA quantity was statistically high significant in groups ECC and ECC with LIM at moments 3 and 4 ($p < 0,01$), while a statistical difference among IL-6 values in the different studied groups and moments did not occur.

Conclusion: LIM did not change either ^{99m}Tc -granulocytes quantity, distribution or improved laboratorial alterations secondary to ECC in the studied model.

Keywords: ischemia-reperfusion injury, extracorporeal circulation, adverse effects, neutrophils, isotope labeling, immunotherapy.

Introdução

Embora o uso de circulação extracorpórea (CEC) seja imprescindível em cerca de 90% dos procedimentos cirúrgicos cardíacos e cardiovasculares¹, pode provocar grande resposta inflamatória no paciente, causada por contato do sangue com superfícies artificiais e variações de sua temperatura, alteração do fluxo laminar e da pressão sanguínea e por efeitos da isquemia e reperfusão de coração e pulmões^{2,3}. Essa resposta inflamatória ocorre em consequência da exacerbada ativação leucocitária, secundária à ativação do fator XII, ativação das vias clássicas e alternativas do complemento^{4,5} e às alterações causadas pela isquemia e reperfusão de coração e pulmões, que levam à produção de radicais livres do oxigênio (RLO)⁶⁻⁹. Os leucócitos ativados produzem substâncias pró-inflamatórias, e sua ativação maciça tem efeito de retroalimentação das cascatas inflamatórias^{10,11} e de produção de RLO. As repercussões no organismo podem variar desde disfunção ou lesão pulmonar leves até graves complicações sistêmicas com falência de múltiplos órgãos e óbito^{2,4,5}.

Algumas estratégias utilizadas para se minimizar o processo inflamatório foram dirigidas sobre os leucócitos. A interposição de filtro leucocitário na CEC teve seu emprego limitado ao se constatar que o filtro se saturava ao longo do procedimento e provocava a liberação de enzimas pelos neutrófilos presos em sua trama^{12,13}. Outra estratégia foi o bloqueio de receptores de membrana endotelial e leucocitária^{8,14}, através da administração endovenosa de anticorpos contra estas moléculas, o que, experimentalmente, demonstrou diminuir o infiltrado neutrofílico em

modelos de isquemia e reperfusão miocárdica^{14,15}. Finalmente, uma alternativa adicional estudada foi o uso do módulo de inativação leucocitária-LIM (LIM[®], Leukocare, Munique, Alemanha), um tipo de filtro biológico com tramas revestidas por anticorpos, que inativariam os neutrófilos por meio de estímulo ao processo de apoptose dos mesmos^{16,17}.

O LIM é um cilindro plástico com 160 ml de volume, contendo uma rede porosa de poliuretano, revestida de anticorpos IgM anti-Fas (clone CH11; Coulter-Immunotech, Hamburg, Alemanha). Esse módulo, instalado em uma via da CEC, permite que o anticorpo anti-Fas se ligue ao CD95 (Fas), receptor de membrana dos neutrófilos o qual é expresso quando esses são ativados. Após o contato do Fas com o anti-Fas, ocorre a ativação da via apoptótica nos granulócitos. Aqueles granulócitos circulantes, ativados pelo processo de isquemia-reperfusão e pela CEC, após entrarem em contato com o LIM e ocorrer a ativação apoptótica, migrariam para os tecidos e lá evoluiriam para a apoptose ou entrariam em processo apoptótico na circulação e seriam capturados pelo sistema mononuclear fagocítico¹⁷. Estudos experimentais e clínicos com LIM mostraram efetividade desse dispositivo para limitar a hiperreatividade neutrofilica e prevenir a diminuição da função cardíaca secundária à CEC^{17,18,19}. Porém, ainda não se tem claro para quais órgãos os granulócitos ativados dos capilares migrariam e com qual intensidade causariam inflamação tecidual.

Objetivos

O objetivo foi estudar o efeito do LIM, em modelo experimental de cirurgia com CEC, sobre:

- 1- a quantidade de granulócitos no sangue;
 - 2- a quantidade e distribuição de ^{99m}Tc-granulócitos em órgãos como baço, cérebro, coração, fígado, músculo esquelético e pulmões de porcos;
 - 3- os níveis plasmáticos de 2 marcadores inflamatórios (IL-6 e DNA-livre).
-

Material e Métodos

Grupos de estudo

O estudo foi realizado em conformidade com o *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* publicado pelo *US National Institutes of Health* (NIH, NO. 85-23, revisado em 1996) e aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Científica do *Regierungspräsidium Darmstadt* (Câmara Governamental-Darmstadt), com licença número V54-19c20/15-F93/27, regulamentada pela Lei de Proteção aos Animais de 25 de maio de 1998.

Utilizaram-se 40 porcos da raça *Deutsches Hausschwein*, com cerca de 3 meses de idade, entre 13 e 14 semanas e pesando $43,35 \pm 8,049\text{Kg}$ ($p > 0,01$). Desses, 10 animais serviram à padronização do modelo experimental e manejo seguro do material radioativo. Seis porcos foram excluídos por óbito ou infecção e o restante foi dividido aleatoriamente em 4 grupos de 06 animais cada um. O n foi definido a partir de cálculo amostral (ver estatística). E entre os 24 animais, 08 eram machos e 16 eram fêmeas.

Grupo 1- Controle anestesia: os animais foram somente anestesiados, sem sofrer nenhum procedimento cirúrgico. Após 120 minutos, injetaram-se granulócitos marcados por via IV e, 120 minutos depois, procedeu-se à eutanásia.

Grupo 2- Controle cirurgia: os animais foram anestesiados e submetidos a uma toracotomia mediana, seguida de dissecação e preparo de coração e grandes vasos para a simulação da CEC. O circuito de CEC era montado, contudo não era efetivado conforme a definição do sorteio do grupo pelo perfusionista. Após a abertura e fixação do pericárdio, injetaram-se

^{99m}Tc-granulócitos similarmente ao G1, seguido de eutanásia após 120 minutos.

Grupo 3- Cirurgia com CEC: os animais foram anestesiados e submetidos a uma toracotomia mediana. Em seguida foram colocados em CEC e concomitantemente receberam ^{99m}Tc-granulócitos. Os animais foram mantidos por 90 minutos em CEC e, após, por mais 30 minutos de reperfusão. Ao término, foi feita a eutanásia aos 120 minutos.

Grupo 4- Cirurgia com CEC e colocação do LIM: os animais foram anestesiados e submetidos a toracotomia mediana. Em seguida foram colocados em CEC e concomitantemente receberam ^{99m}Tc- granulócitos. Um LIM foi conectado à linha venosa da CEC. Os animais foram mantidos por 90 minutos em CEC, seguidos por 30 minutos de reperfusão e depois por eutanásia aos 120 minutos.

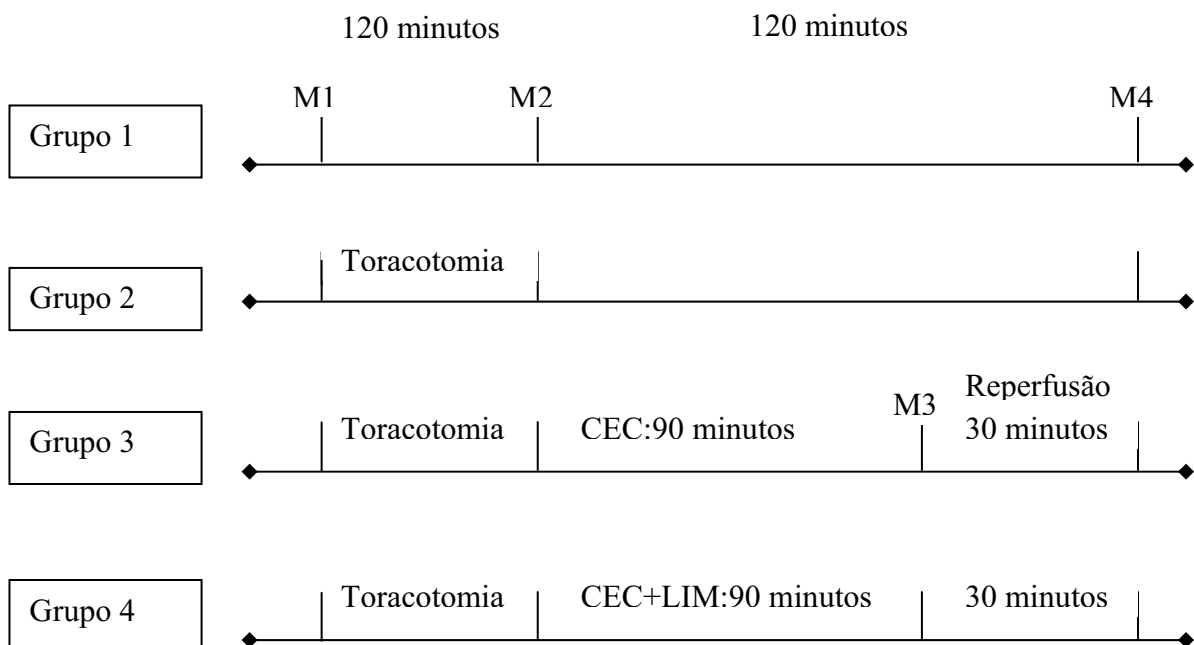


Figura 1- Fases da experimentação M 1= anestesia, M 2= injeção IV de ^{99m}TC-granulócitos e início da CEC, M3= reperfusão cardiopulmonar, M4= eutanásia e coleta de biópsias.

Anestesia

Os animais foram medicados com o antibiótico enrofloxacina (100mg/ml), 2,5ml/100kg de peso via SC, (Baytril[®], Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Alemanha) profilática e mantidos em jejum alimentar com água *ad libidum* por 12 horas até o início do procedimento. Todo animal foi examinado clinicamente, pré-medocado, pesado e teve a velocidade de hemossedimentação sanguínea (VHS) verificada. Os critérios de exclusão foram VHS >30mm/h, infecção (04 animais) e óbito (02 animais) .

A pré-medicação foi feita por via IM com hidrocloreto de quetamina, hidrocloreto de xilasina e cloridrato de midazolam. Em seguida, injetou-se, *in bolus*, cloridrato de midazolam, citrato de fentanil e brometo de pancurônio para a realização da traqueostomia. Conectou-se o ventilador mecânico (Dräger Respirator Evita[®], Drägerwerk AG, Lübeck, Alemanha) ao animal, mantendo-se pressão expiratória final positiva de 5-10 mm/Hg, pressão parcial de oxigênio (O₂) entre 90 e 150 mm/Hg, e fração inspirada de O₂ em torno de 0,4l. O ventilador foi ajustado conforme a gasometria arterial (ABL-500[®], Radiometer, Copenhagem, Dinamarca). Os animais foram monitorados por meio de eletrocardiograma (ECG) (Medical Monitor TRAM[®]-rac4A, Microvitec PLC, Bradford, EUA), capnógrafo (Capnox[®], Medlab GmbH, Karlsruhe, Alemanha), oxímetro (NANOX-10[®], Medlab GmbH, Karlsruhe, Alemanha), pulsímetro e pressão arterial média (PAm), (Combitrans-Blutdrucktransducer[®], B Braun, Melsungen, Alemanha), pressão atrial, pressão ventricular direita, pressão artéria pulmonar e pressão capilar pulmonar (catéter de termodiluição Swan Ganz[®], Baxter GmbH, Unterschleissheim, Alemanha).

Manteve-se a anestesia com infusão venosa contínua de diisopropilfenol 2% (Propofol[®], B Braun, Melsungen, Alemanha), 12ml/h e citrato de fentanil (0,0785mg/ml), 6ml/h.

Coleta de sangue

Puncionou-se a artéria carótida esquerda com uma cânula 14 G (B Braun, Melsungen, Alemanha). e conectou-se esta agulha a um sistema múltiplo de torneiras para coleta de sangue, monitorização de PAm e posterior injeção ^{99m}Tc- granulócitos. Imediatamente antes de se iniciar a coleta de sangue, cada animal recebeu 5mg/Kg (500UI/Kg) de heparina sódica, (Liquemine[®], Ratiopharm GmbH, Ulm, Alemanha) via IV.

Cirurgia

Realizou-se toracotomia mediana, seguida por exposição do pericárdio e da aorta ascendente conforme técnica padronizada por Brix-Christensen et al, 2002²⁰. Nos grupos CEC, foi realizada uma sutura em bolsa na aorta à altura da origem do tronco braquiocefálico direito e outra no átrio direito. A aorta foi então canulada com cânula 20 F (Medtronic Inc., Mineápolis, EUA), seguida imediatamente pela canulação do átrio direito com cânula 32 F (Jostra AG, Hirrlingen, Alemanha). As cânulas foram fixadas com torniquetes DLP right-angled[®] (Medtronic Inc., Mineápolis, EUA). Na aorta proximal foi posicionada a cânula de 22G (Arteriofix Art.-Kath. Set[®], B Braun, Melsungen, Alemanha) para a cardioplegia. Simultaneamente ao início da CEC, foi desligado o ventilador mecânico e clampeada a artéria aorta entre as cânulas de cardioplegia e a da aorta conectada à máquina de CEC (Computerunterstütztes Perfusion System CAPS, Stöckert[®], Munique, Alemanha), oxigenador de membrana (Medos Hilite[®] 7000, Stolberg,

Alemanha) e reservatório venoso (Affinity[®], Medtronic GmbH, Meerbusch, Alemanha). O fluxo da CEC era de cerca de 3,5 l/min e a temperatura do sistema mantida em 35°C.

Os granulócitos marcados com tecnécio 99m-hexametilpropilenoamina-oxima (^{99m}Tc-HMPAO, Ceretec[®], GE Healthcare, EUA) foram injetados IV, nos G3 e G4, imediatamente após o clampeamento da aorta ou em momento similar nos grupos G1 e G2. Os animais do G4 tiveram o LIM conectado à linha venosa da CEC, conforme sorteio realizado pelo perfusionista. O *priming* (perfusato) da CEC era de 2000ml de solução de Ringer 309 mosm/l (Baxter Deutschland, Unterschleissheim, Alemanha) e 500 ml hidroxetilamido a 10% (HAES[®], Fresenius Kabi, Bad-Homburg, Alemanha).

Durante a CEC, correram 20 ml de solução de cardioplegia (KCl 14,9%; K⁺ 2mmol/ml, Cl⁻ 2mmol/ml e Mg 3,15 mmol/ml) de forma intermitente a cada 30 min ± 2 min, a 180 ml/h, e com pressão de entrada de 100mm/Hg (Perfusor[®] secura FT, B Braun, Melsungen, Alemanha).

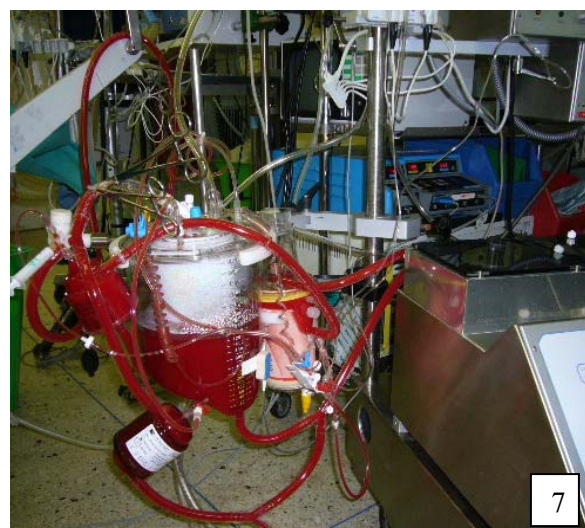
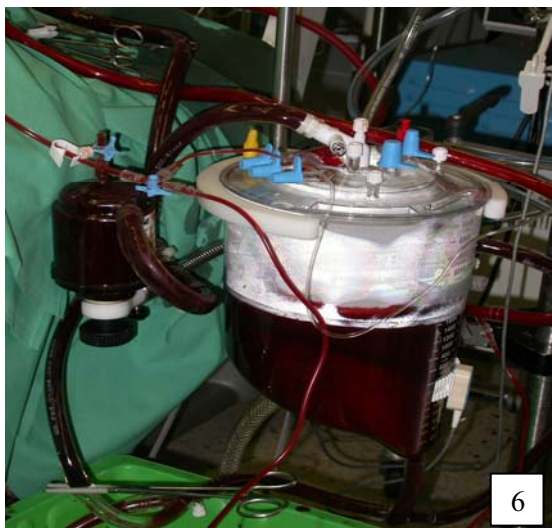
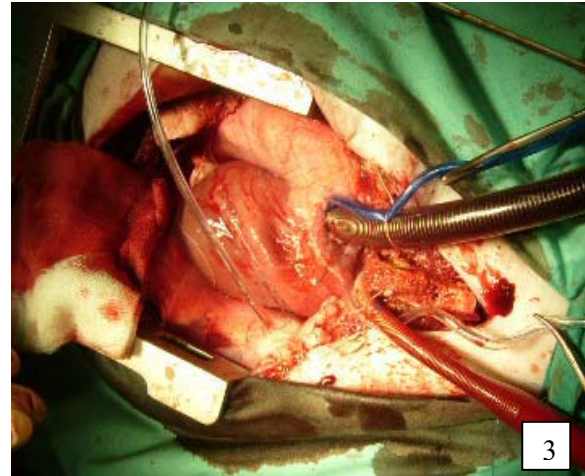
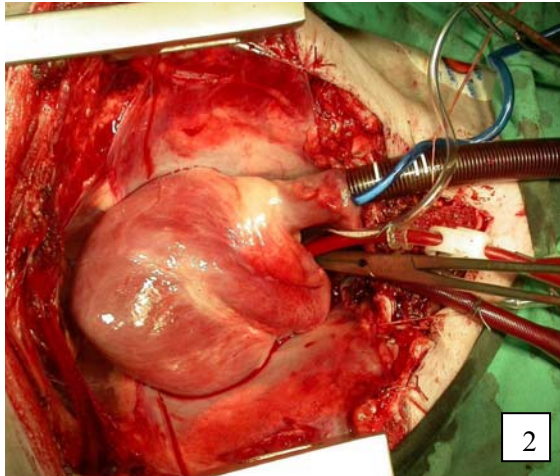
Os animais dos grupos G3 e G4 foram mantidos por 90 minutos em CEC com clampeamento da aorta, seguidos por 30 minutos de reperfusão com aorta desclampeada e coração batendo, e os dos grupos G1 e G2 foram apenas monitorados e tiveram amostras coletadas nos tempos M3 e M4. O início da reperfusão foi precedido pelo desclampeamento da aorta, clampeamento da cânula inserida na aorta e clampeamento progressivo da cânula no átrio direito, permitindo ganho paulatino de volemia e retorno dos batimentos cardíacos. O ventilador mecânico era posto em funcionamento, evitando-se áreas importantes de atelectasias, as cânulas cardíacas eram retiradas e os orifícios ligados.

Após 30 minutos de reperfusão e momento correspondente nos grupos controle, a heparinização era revertida com sulfato de protamina e procedida a eutanásia do animal com injeção via IC de embutramida. As cânulas de aorta e de átrio direito eram reconectadas e seguia-se a coleta de todo o sangue do animal, por meio de bomba, sendo injetada paulatinamente pela aorta a solução de 3l de Rheomacrodex[®] 5% (Knoll AG, Ludwigshafen, Alemanha), diluída em solução de soro fisiológico, enquanto o sangue venoso que simultaneamente afluía ao átrio direito era desprezado pela cânula do átrio direito em recipiente coletor, posicionado em nível inferior.

Por fim, retiravam-se todas as cânulas e catéteres dos animais e coletavam-se biópsias para histologia e contagem de radioatividade em gama-câmera (SMV[®] Dual Heads 60 Hz, GE Healthcare, Frankfurt am Main, Alemanha). Realizaram-se biópsias do ventrículo cardíaco esquerdo, lobo inferior de pulmão esquerdo, lobo direito de fígado, extremidade mediana de baço, rim esquerdo, músculo glúteo esquerdo e cérebro.

Após as biópsias, as paredes torácica e abdominal eram suturadas em plano único e o animal era transportado ao departamento de medicina nuclear para cintilografia de corpo inteiro com gama-câmera e a quantificação de radioatividade de cada biópsia em aparelho de cintilografia de fonte (*2"Brunnenbohrloch-well counter* e TISA Vielkanalanalysatorsystem TMCA2 Software[®], Target System Eletronic GmbH, Solingen, Alemanha).

O animal era armazenado em câmara fria por uma semana para posterior controle radioativo e liberação.



Figuras 2 e 3 - Canulação cardíaca

Figuras 4 e 5 - Preparos para cirurgia

Figuras 6 e 7 - LIM e reservatório da CEC

Injeção periumbilical com lipopolissacarídeo

Injetaram-se 0,5 µl de lipopolissacarídeos (LPS) de *Escherichia c.* via SC, periumbilical, de 20 em 20 min após o M2, nos animais do grupo piloto. Este procedimento foi feito para se comprovar, por meio do registro cintilográfico, a preservação da capacidade de migração dos ^{99m}Tc-granulócitos em resposta à presença de antígenos e substâncias quimiotáticas¹⁹. Portanto, nas cintilografias foi possível obter o registro da migração de ^{99m}Tc-granulócitos em cada ponto de inoculação, indicando a não interferência da marcação radioativa com tecnécio sobre a capacidade de migração dos ^{99m}Tc-granulócitos. Assim, considerou-se que os ^{99m}Tc-granulócitos aderiram ao endotélio e infiltraram-se nos tecidos da mesma forma que aqueles não marcados pelo tecnécio.

Preparação dos granulócitos PMNs e marcação com ^{99m}Tc-HMPAO para cintilografia

As células foram isoladas e marcadas em câmara de fluxo laminar e à temperatura ambiente, com utilização de material estéril e descartável. Seguiram-se os passos segundo o protocolo modificado para porco de Roca et al²¹. Prepararam-se 4 seringas de perfusão (50ml cada) com 15% de seu volume, 6,0ml, com tampão de citrato ACD-A[®] (ácido cítrico, monoidratado 4g; citrato de sódio diidratado 11g; glicose monoidratada 12,25g; água destilada 500ml) (Baxter Healthcare Corporation, Deerfield, EUA) e completou-se cada seringa com 44 ml de sangue retirados do animal. A três destas seringas, denominadas “A”, adicionaram-se 10 ml de hidroxietilamido HES[®] 6% (450/0,7 mosm) (Fresenius Kabi, Bad-Homburg, Alemanha),

homogeneizando-se cuidadosamente e deixando-se sedimentar por 30 minutos. A quarta seringa, “B”, foi centrifugada (Labofuge 400R[®], Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Alemanha) a 4500 rotações por minuto(rpm) por 10 minutos (min) à temperatura ambiente (25°C) para obtenção do plasma, que serviu como meio de suspensão para os granulócitos a serem isolados. Prepararam-se 4 tubos de ensaio de 50 ml, nominados “C”, com 3 ml de Dulbecco’s PBS[®] (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Áustria), livre de cálcio e magnésio e 5ml de solução de Percoll[®] (Biochrom AG, Berlin, Alemanha). A cada um acrescentaram-se 8ml da substância sobrenadante presente em cada seringa A. Logo após, os tubos “C” foram centrifugados a 2000 rpm por 25 min, a 25°C. Pipetou-se o fundo dos tubos e isolaram-se os leucócitos sedimentados. Distribuiu-se este conteúdo em dois tubos de ensaio de 15ml, “D”, e acrescentou-se a eles quantidade equivalente de Dulbecco’s PBS[®]. Centrifugou-se a seguir a 1200 rpm por 5 minutos, a 25°C. Pipetou-se o sedimento e procedeu-se à nova suspensão em PBS e centrifugação a 1200 rpm por 5 minutos, a 25°C. Pipetou-se o sedimento que foi então diluído em 1 ml de plasma, solução “B”. Verificou-se a pureza dos granulócitos separados (97,05±1,95%). As células suspensas foram então marcadas com ^{99m}Tc - HMPAO[®] (Ceretek, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, EUA). A marcação foi realizada de acordo com atividade máxima de 740 MBq²⁰. Adicionou-se 1 ml de ^{99m}Tc-HMPAO (<740MBq). Homogeneizou-se a solução que foi incubada por pelo menos 10 min a temperatura ambiente. Adicionaram-se 3 ml de plasma (“B”), centrifugou-se a 150 rpm por 5 min e desprezou-se o radiofármaco não associado às células. Reservou-se o sobrenadante para cálculo do produto marcado. Lavou-se o sedimentado de

células com 4 ml de plasma e reservou-se novamente o sobrenadante. Ressuspenderam-se as células marcadas em 12 a 15 ml de plasma. Mais de 98% das células ($316,34 \pm 121,46 \times 10^3/\mu\text{l}$) foram marcadas. Verificou-se a radioatividade de ambos os sobrenadantes e quantificou-se a radiação dos granulócitos marcados ($199,38 \pm 44,178 \text{ MBq}$):

$$\frac{\text{Quantificação do Produto marcado radioativamente} = \text{Radioatividade ligada às células} \times 100}{\text{Atividade total}} = \text{MBq}$$

Foi construído um algoritmo para quantificação da radiação emitida pelos granulócitos em cada tecido, considerando-se o peso total de cada animal. Para isso, considerou-se a marcação radioativa inicial dos granulócitos, sua quantidade de radiação por meio da concentração da atividade (*Aktivitätskonzentration* -AK) medida pela cintilografia.

A quantificação radioativa de cada biópsia tissular dos órgãos estudados, assim como a diferença da AK ao longo do tempo e por grama de tecido era calculada segundo a fórmula:

Atividade (AK-Bq/g) = {valor medido em *critical path method* (cpm) x 1000 x Exp x [(ln (2)x(tempo1- tempo2) x 24/4)]}/(fator de calibração x tempo da aferição x peso da amostra)

Fator de calibração do $^{99\text{m}}\text{Tc}$ = 48500cpm/kBq

Por meio da divisão do valor da atividade final pela atividade aplicada, obteve-se a parcela de atividade resultante em cada grama de tecido, de modo que os dados de todos os animais puderam ser comparados.

A quantidade de granulócitos marcados com ^{99m}Tc foi calculada como coeficiente por grama de tecido e foi gerada a partir das dosagens das provas biopsiadas considerando-se a meia vida do material radiativo (tabela 1, apêndice).

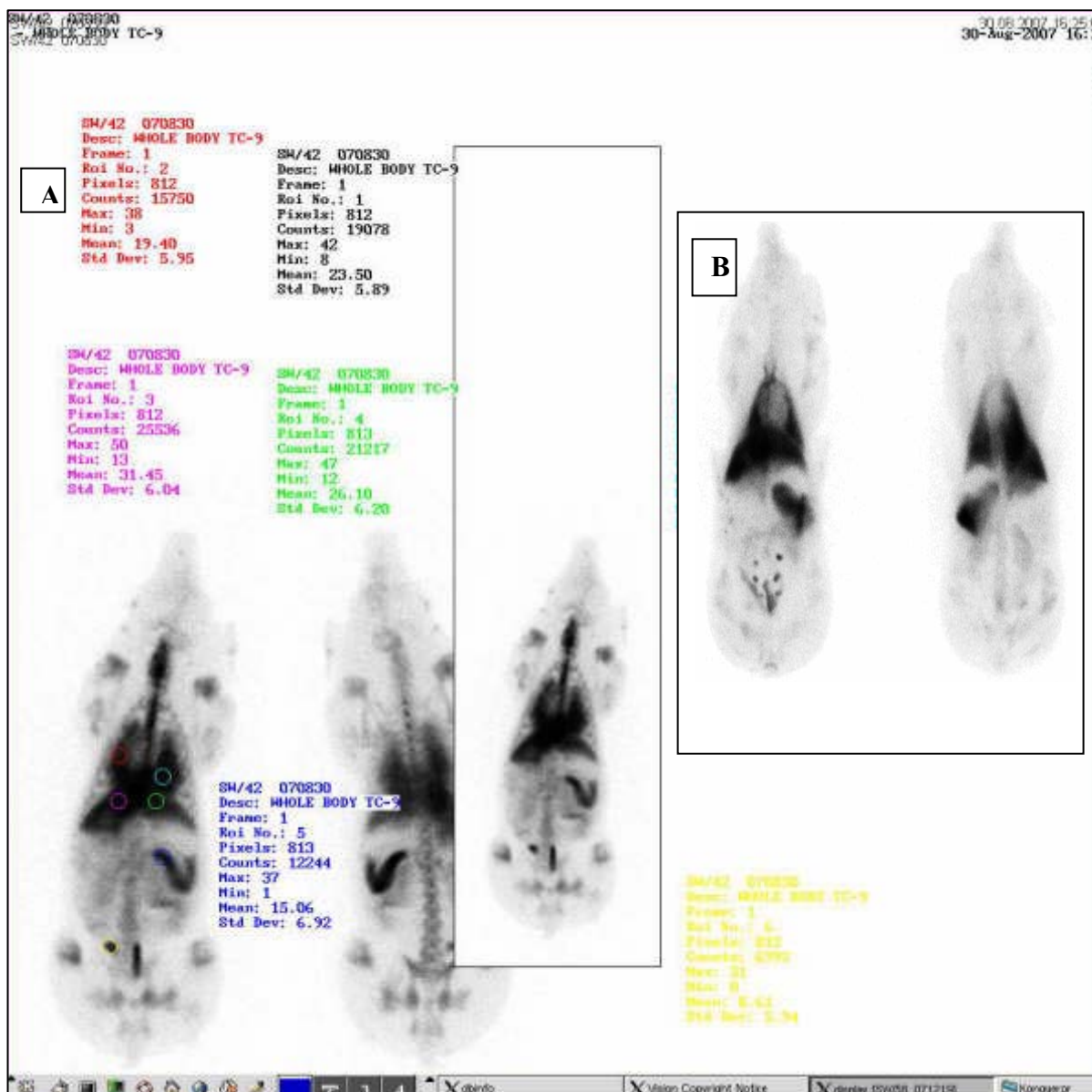


Figura 8 - Distribuição da radiação nos órgãos. A- Cintilografia com ROIs. B- Cintilografia com teste de migração leucocitária.

Dosagem de DNA-livre

O DNA foi extraído de 200 μ l de amostras de soro dos animais, usando QIAamp Blood Kit[®] (Qiagene, Hilden, Alemanha). Após a remoção da maioria das proteínas por digestão com proteínase, a amostra foi aplicada no QIAamp 96 plate[®](Qiagene, Hilden, Alemanha). O DNA foi adsorvido à membrana de sílica durante curta centrifugação (Labofuge 400R[®], Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Alemanha), enquanto as proteínas restantes, sais e outros contaminantes foram completamente removidos por três lavagens consecutivas. O DNA ligado à membrana nuclear das células sanguíneas foi então dissolvido em H₂O deionizada ou tampão hidroximetilaminometano (tris), ácido etilenodiaminotetracético-EDTA (Melford Laboratories Ltd, Suffolk, Inglaterra), num volume final de 200 μ l.

Realizou-se a quantificação de DNA usando-se o teste de detecção de DNA PicoGreen[®]. O DNA de timo de almalho (100mg/ml) serviu como padrão. A concentração de DNA é representada por uma curva padrão que vai de 0 a 100 ng/ml. Tomaram-se 20 μ l do DNA final preparado e misturou-se com 1 ml de Tris-EDTA (10 mmol/l Tris-HCl, 1 mmol/l EDTA, pH 7,5) diluído com reagente PicoGreen[®] (Invitrogen, Carlsbad, EUA). A intensidade da fluorescência foi então medida em espectrofluorômetro (BioTeK Instruments, Winooski, EUA) a um comprimento de onda de emissão de 520 nm e excitação de 480 nm.

Histologia e coloração

As biópsias de baço, cérebro, coração, fígado, músculo esquelético, pulmão e rim dos animais foram fixadas em formaldeído a 4% e preparadas com o processador tecidual (Hypercenter XP[®] Shandon. Fabricante: Life Science International GmbH, Frankfurt am Main, Alemanha). Os cortes com 5 µm de espessura foram corados com solução de hematoxilina-eosina e em seguida embebidos em naftol-cloroacetatoesterase (CAE), coloração específica para granulócitos e granulopoése. Estudaram-se histologicamente as biópsias dos diferentes órgãos (baço, cérebro, coração, fígado, músculo esquelético, pulmão e rim), buscando-se analisar a presença de infiltrado inflamatório por meio de coloração apropriada (CAE). As análises foram realizadas por patologista, sem conhecimento prévio dos grupos.

Cintilografia

Foi realizada cintilografia de corpo inteiro em gama-câmera (SMV[®] Dual Heads 60 Hz, GE Healthcare, Frankfurt am Main, Alemanha) e quantificação radioativa das biópsias com cintilografia de fonte (*2"Brunnenbohrloch-well counter* e TISA Vielkanalanalysatorsystem TMCA2 Software[®], Target System Eletronic GmbH, Solingen, Alemanha) para quantificação específica da radiação por miligrama de peso dos animais. Buscou-se registrar a distribuição de granulócitos marcados com ^{99m}Tc-HMPAO nos órgãos e sangue dos animais após o experimento e quantificar, por meio de cálculos, o número de granulócitos nos diferentes tecidos.

Análise sanguínea

Coletou-se amostra sanguínea no início da narcose, no tempo de 120 minutos (M1), em todos os grupos. No grupo G1, seguiram-se coletas nos tempos 0, 90 e 120 minutos após a injeção dos granulócitos marcados, correspondendo, respectivamente, aos momentos M2, M3 e M4. No G2, ao término da fixação do pericárdio, coletou-se a amostra referente ao tempo 0 (M2) e em seguida as amostras nos tempos 90 e 120 minutos, (M3) e (M4). Nos grupos G3 e G4, as amostras M2 foram coletadas imediatamente antes de se colocarem os animais em circulação extracorpórea, enquanto as amostras M3 foram coletadas ao término da isquemia e M4 ao término da reperfusão. As determinações laboratoriais feitas foram VHS (velocidade de hemossedimentação sanguínea), hemograma (Cell Dyn 3500R®, Abbott GmbH, Wiesbaden, Alemanha), gasometria arterial e por teste enzimático interleucina-6, IL-6 (Elisa, DRG Instruments GmbH, Marburg, Alemanha) como parâmetro inflamatório. O DNA-livre, marcador de lesão tecidual, foi quantificado por meio do teste PicoGreen®, (Invitrogen, Carlsbad, EUA).

Tabela 2 - Parâmetros processados a partir das amostras sanguíneas, métodos e fabricantes.

Parâmetros	Momentos	Método	Procedência
VHS	M1	Citrato de sódio 3,8%	Farmácia Uni-Klinikum, Frankfurt am Main, Alemanha
Hemograma	M1, M2, M3, M4	Cell Dyn 3500R®	Abbott GmbH, Wiesbaden, Alemanha
Gasometria arterial	M1, M2, M3, M4	ABL-500	Radiometer, Copenhagen, Dinamarca
Interleucina 6	M1, M2, M3, M4	ELISA	DRG Instruments GmbH, Marburg, Alemanha
DNA-livre	M1, M2, M3, M4	PicoGreen®	Invitrogen, Carlsbad, EUA

Análise estatística

Foram estudadas as seguintes variáveis no mesmo conjunto de animais: sexo, peso, VHS, PAm, FC, Hb, Ht, neutrófilos, pH, IL-6, DNA-livre, quantidade de radiação presente nas biópsias dos seguintes órgãos dos animais nos diferentes grupos: baço, cérebro, coração, fígado, pulmão, músculo esquelético e rim .

A análise estatística foi realizada com o programa SPSS®2002 (*Statistical Analysis Software* para Windows®, SPSS Inc., Chicago, EUA).

As variáveis quantitativas foram avaliadas nos grupos e nos momentos descritos na tabela 3, com os testes de:

- interação entre grupos e momentos visando verificar se os perfis dos quatro grupos poderiam ser aceitos como similares ao longo do tempo;

- fator independente (grupos): comparou as médias marginais entre os grupos;

- fator de medidas repetidas (momentos): comparou as médias marginais entre os momentos;

- efeito de grupo em cada momento: comparou os grupos em cada um dos momentos, separadamente;

- efeito de momento dentro de cada grupo: comparou a média dos momentos em cada um dos grupos, separadamente.

Tabela 3 - Variáveis estudadas, grupos e respectivos momentos.

Variável	Grupos	Momentos
PAm	G1, G2, G3 e G4	M1, M2 e M4
FC	G1, G2, G3 e G4	M1, M2 e M4
pH	G1, G2, G3 e G4	M1, M2, M3 e M4
Hb	G1, G2, G3 e G4	M1, M2, M3 e M4
Ht	G1, G2, G3 e G4	M1, M2, M3 e M4
Neutrófilos	G1, G2, G3 e G4	M1, M2, M3 e M4
IL- 6	G1, G2, G3 e G4	M1, M2, M3 e M4
DNA-livre	G1, G2, G3 e G4	M1, M2, M3 e M4
Radiação nas biópsias dos órgãos	G1, G2, G3 e G4	M4

As variáveis foram apresentadas por média e desvio padrão. A homogeneidade das variâncias foi verificada pelo teste de Levene e a normalidade dos dados, por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov²².

Utilizou-se ANOVA de Medidas Repetidas e, quando o resultado foi significativo, realizaram-se as comparações múltiplas por meio do teste de Bonferroni²². Quando o resultado do teste de normalidade foi significativo, utilizou-se, para medidas repetidas, a prova não paramétrica de Wilcoxon (dois grupos/momentos pareados) ou a prova não paramétrica de Friedman (três ou mais grupos/momentos) e, para grupos independentes, a prova não paramétrica de Kruskal-Wallis²².

Todas as estatísticas calculadas foram consideradas significativas quando $p < 0,01$, sendo p o nível de significância associado à estatística calculada²².

O cálculo do tamanho amostral mínimo (r) (número de repetições mínimo por grupo) foi realizado levando-se em conta o maior valor do número de neutrófilos obtido entre os grupos na pesquisa de Abdel-Rahman et al (2007)¹⁹, $13,4 \pm 2,3$ ($\times 10^3/\mu\text{L}$), de modo a permitir uma oscilação ($\varepsilon=2,68$) de 20% em torno da média.

Considerando-se a expressão do erro amostral do intervalo de confiança da média: $r_{\text{mínimo}} = (t \cdot s / \varepsilon)^2$, sendo $t=2,84$, e o valor médio para t_{tabelado} , entre t com $gl=11$ e com $gl = \infty$; $s = 2,3$, $\varepsilon = 2,68$. Obteve-o número de repetições mínimo de $r = 6$ animais por grupo.

Resultados

Os dados clínicos e laboratoriais verificados foram: peso, sexo, diurese, FC, PAm, pH arterial, Hb, Ht e neutrófilos plasmáticos. A diurese quantificada foi de $679,17 \pm 275,41$ ml ($p > 0,01$).

1. Pressão arterial média- PAm

Não houve diferença estatística significativa entre as pressões arteriais médias nem entre os momentos, nem entre os grupos estudados. Figura 1 e tabela 13b (apêndice).

2. Freqüência cardíaca- FC

O G4 apresentou aumento estatisticamente significativo da FC no momento M4 em relação aos outros grupos nos momentos M1 e M2. ($M1=M2 < M4$). Figura 9 (abaixo) e tabela 14b (apêndice).

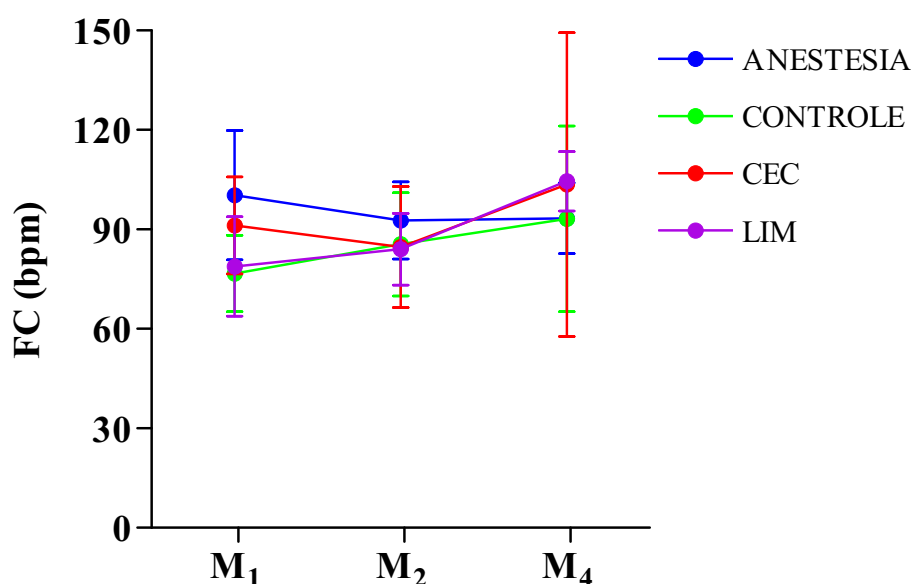


Figura 9 - Valores médios da FC nos momentos M1, M2 e M4, para os grupos anestesia, controle, CEC, CEC+LIM.

3. pH arterial

O resultado das médias das medidas do pH não demonstrou diferença estatística significativa nem entre os momentos, nem entre os diferentes grupos experimentais. Figura 3 e 4 e tabela 15b (apêndice).

4. Hemoglobina- Hb e hematócrito- Ht

As médias dos valores de hemoglobina e hematócrito apresentaram valores significativamente menores em G3 e G4, nos momentos M3 e M4 com relação aos grupos G1 e G2, nos momentos M3, M4. Figuras 10 e 11(abaixo) e tabelas 16 b e 17b (apêndice).

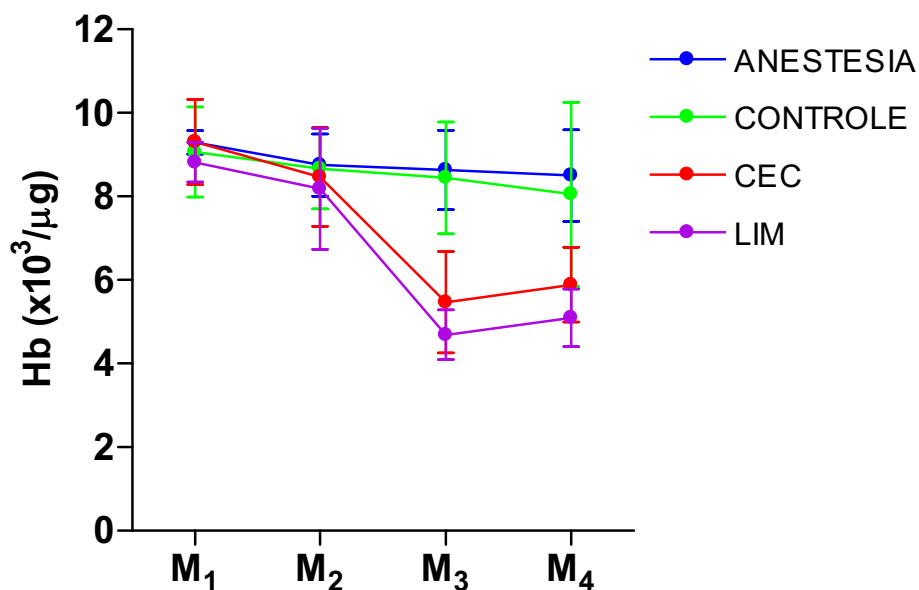


Figura 10 - Diagrama de perfil das médias de Hb, segundo os momentos M1, M2, M3 e M4, para os grupos anestesia, controle, CEC e LIM

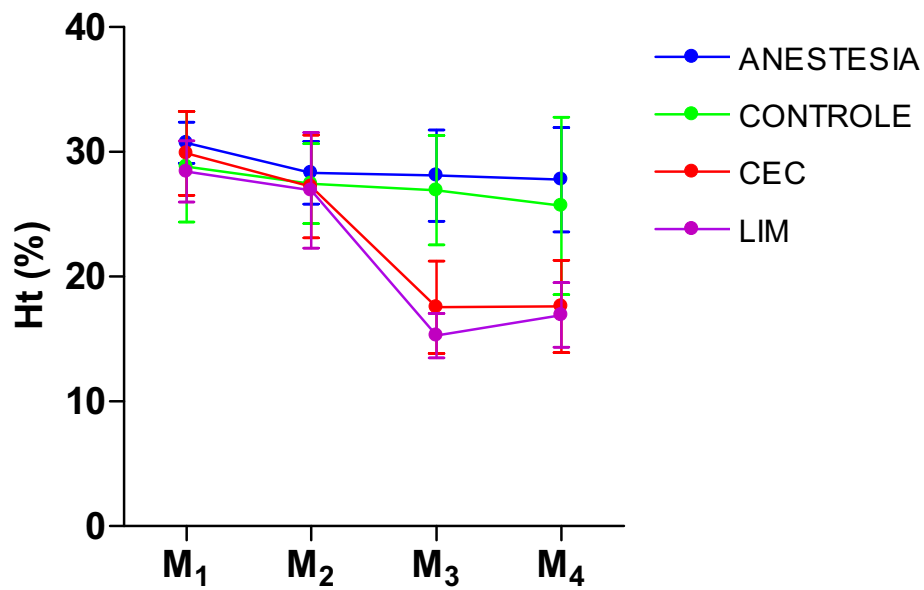


Figura 11 - Diagrama de perfil das médias de Ht, segundo os momentos M1, M2, M3 e M4, para os grupos anestesia, controle, CEC e LIM

5. Neutrófilos

As médias dos valores sanguíneos de neutrófilos dos grupos foram aumentando significativamente ao longo do tempo. Figura 12 (abaixo) e tabela 18b (apêndice).

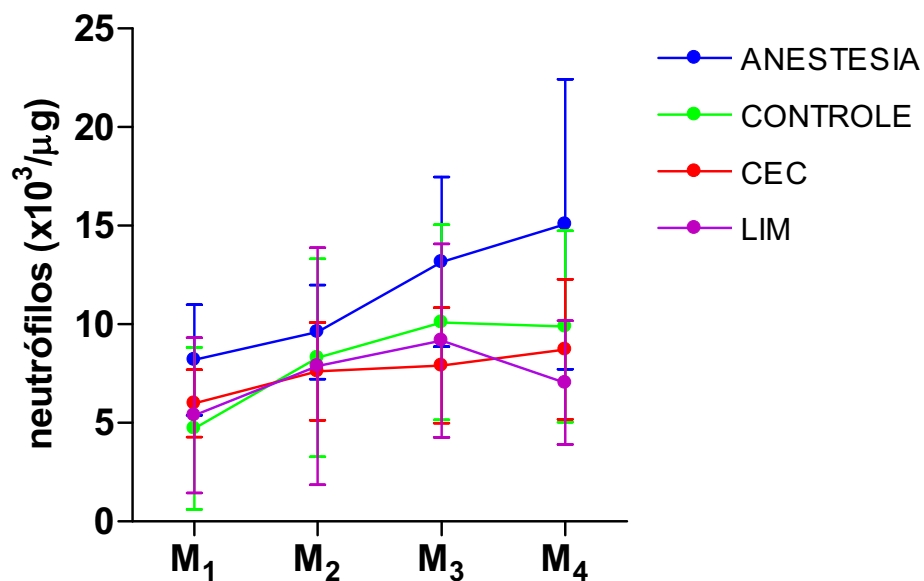


Figura 12 - Diagrama de perfil das médias de neutrófilos, segundo os momentos M1, M2, M3 e M4, para os grupos anestesia, controle, CEC e LIM.

6. DNA-livre

Ao longo do experimento, observaram-se valores significativamente mais altos nas dosagens de DNA-livre dos animais dos grupos G3 e G4, nos momentos M3 e M4, com relação aos outros grupos e momentos. Figura 13 (abaixo) e tabela 19b (apêndice).

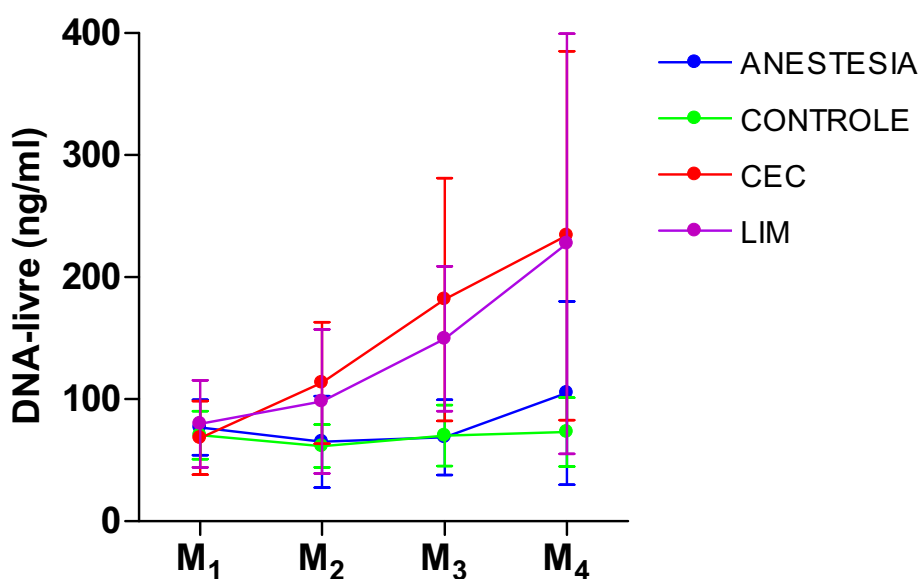


Figura 13 - Diagrama de perfil das médias de DNA, segundo os momentos M1, M2, M3 e M4, para os grupos anestesia, controle, CEC e LIM.

7. Interleucina-6

Ao longo do experimento, não houve variação nos valores da IL-6 nem entre os grupos nem entre os momentos estudados. Figura 9 e tabela 20a (apêndice).

8. Distribuição de granulócitos

A resposta celular foi inferida pela distribuição de granulócitos marcados radioativamente e quantificados por meio das biópsias nos órgãos.

Com relação às biópsias de baço, cérebro, coração, fígado, músculo esquelético, pulmão e rim, realizadas ao término do experimento, nos diferentes grupos, não houve diferença significativa na quantidade de radiação presente, o que permite afirmar que o tipo de tratamento não influenciou na quantidade de radiação presente nas biópsias estudadas. Figura 14 (abaixo) e Figuras 10-16 e tabela 21 (apêndice).

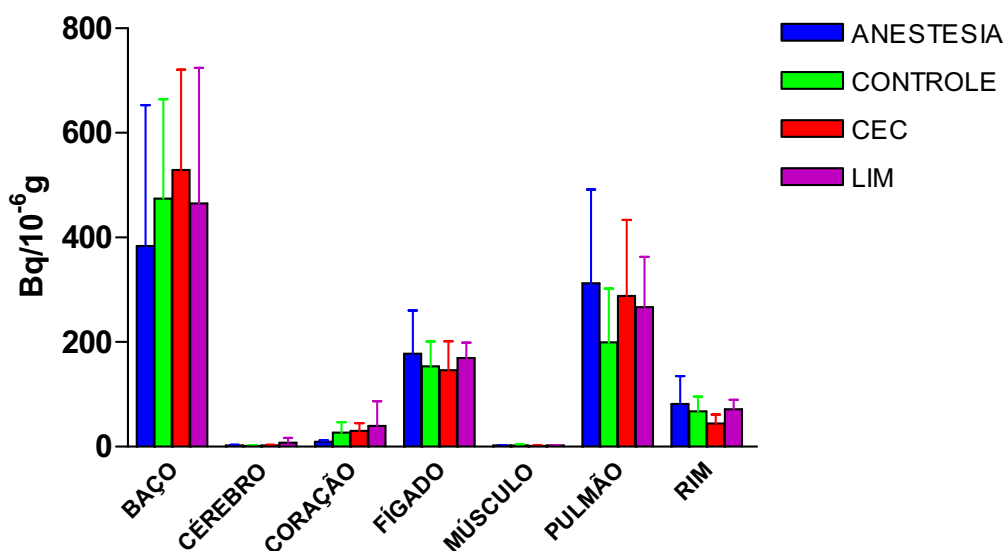


Figura 14 - Medida da radiação das biópsias dos órgãos, nos diferentes grupos.

9. Cintilografia

No estudo piloto da radioatividade no sangue durante a CEC, inicialmente mediu-se a atividade radioativa nos momentos: 0,10,20,30 90 e 120 minutos após a aplicação dos ^{99m}Tc-granulócitos. Considerou-se a radioatividade inicial como 100% para se compensar variações individuais. No geral, observou-se uma tendência de curva comparável para os grupos controle e CEC. Observou-se, nos primeiros 10 minutos após a injeção de ^{99m}Tc-granulócitos uma diminuição de 32+/-17% na atividade radioativa total

no sangue. Depois, houve uma queda lenta ao longo do tempo com permanência de 40-60% da atividade inicial. Os dados foram corrigidos pela meia vida do ^{99m}Tc e não apresentaram diferença significativa entre os dois grupos (Figura 15). Já a quantidade de granulócitos totais na circulação observados nos momentos: M1,M2,M3 e M4 nos experimentos foi sempre crescente para todos os grupos ao longo do tempo com exceção do grupo LIM no M4.

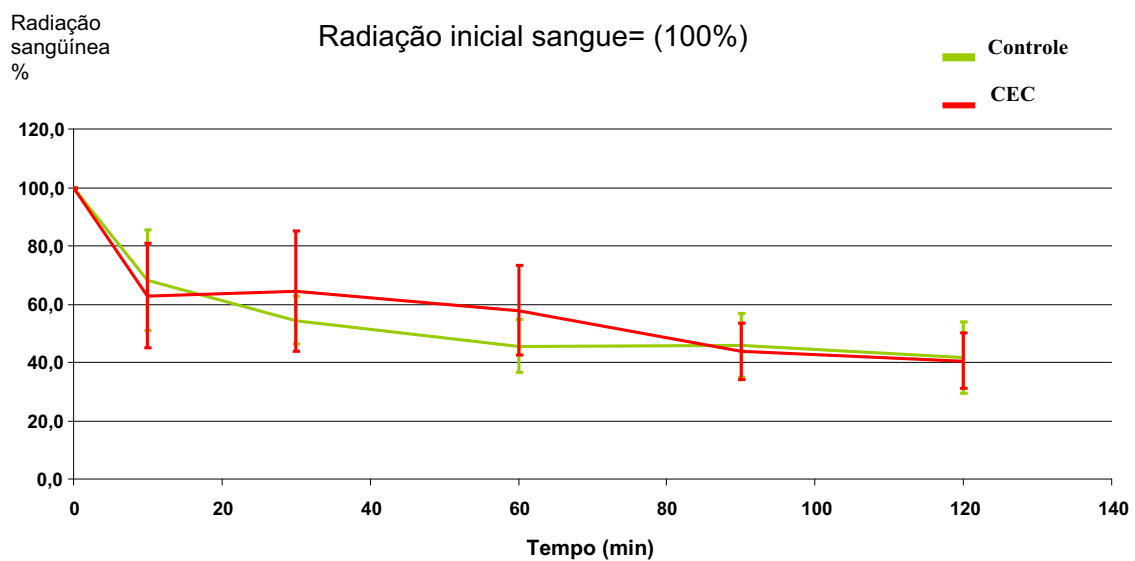


Figura 15 - Quantidade de radiação presenteno sangue dos animais ao longo do tempo (estudo piloto, n=5).

As cintilografias mostraram grande quantidade de radiação (^{99m}Tc -granulócitos) nos órgãos. No G1, notadamente em pulmões e baço (Figura 16); em G2, fígado, baço e pulmões (Figura 17); assim como nos grupos G3 e G4, também pulmões, fígado e baço (Figuras 18 e 19). Nas imagens cintilográficas, as áreas correspondentes ao cérebro, rins e musculatura biopsiada (região lombar esquerda) apareceram frias, em azul, demonstrando baixa radiação em todos os grupos. A área cardíaca permaneceu de difícil identificação devido à sobreposição à área pulmonar.

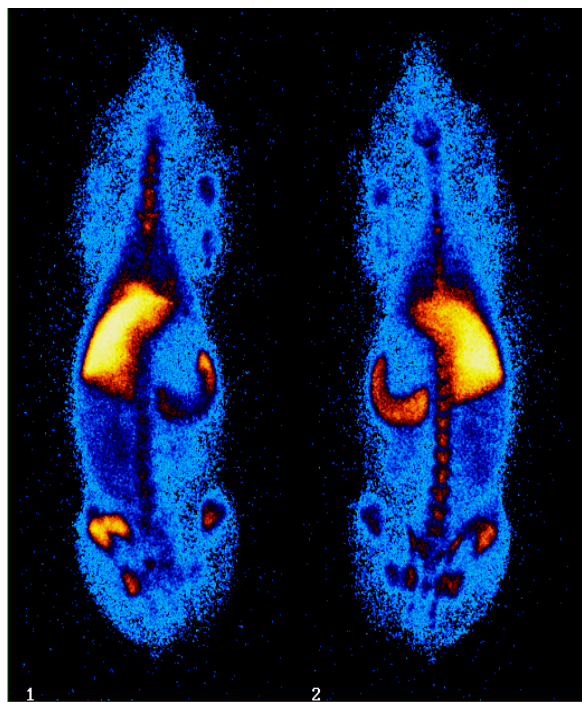


Figura 16 - Cintilografia animal grupo 1

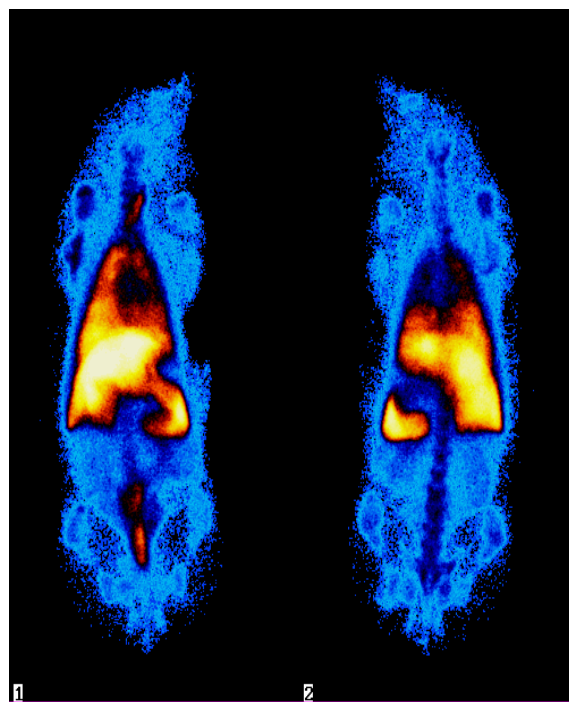


Figura 17 - Cintilografia animal grupo 2

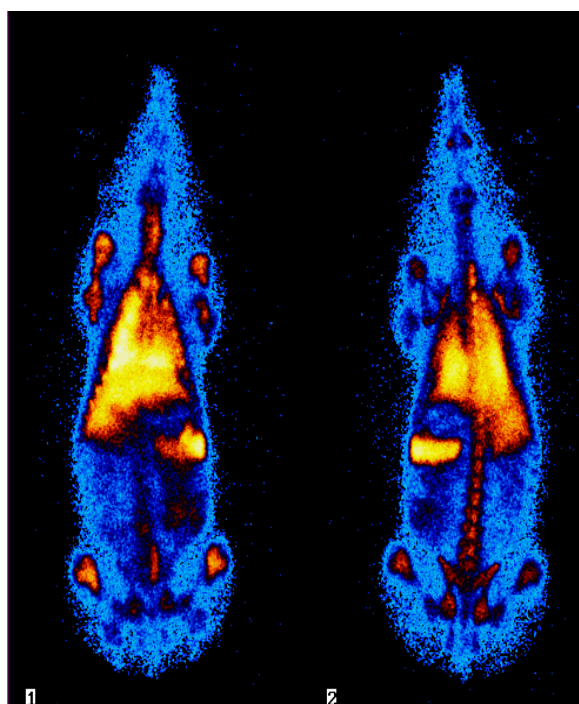


Figura 18 - Cintilografia animal grupo 3

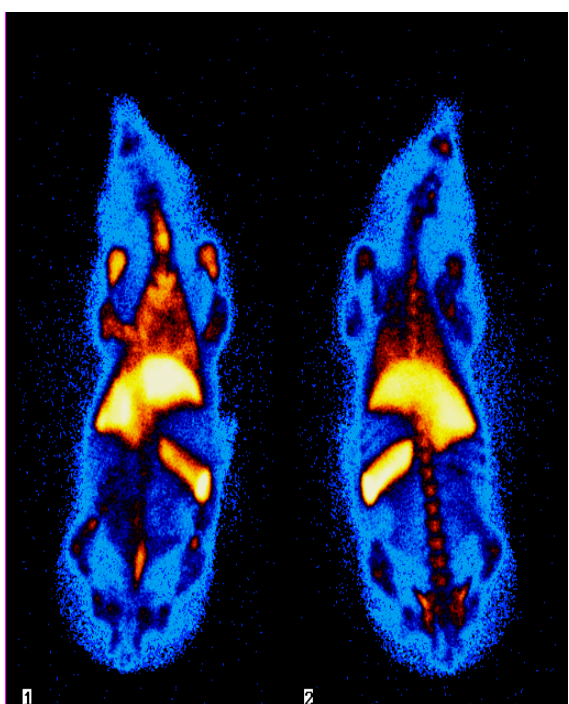


Figura 19 - Cintilografia animal grupo 4.

10. Histologia

O infiltrado inflamatório observado foi analisado de forma semiquantitativa, em cruces, em graus que variam de ausente (-), leve (+), moderado (++) e intenso (+++). Estes foram revertidos em valores numéricos 0, 1, 2 e 3, respectivamente, para fim de cálculo quantitativo (apêndice).

Observou-se intensa presença de granulócitos nas biópsias de pulmão, fígado, baço e leve para moderada em rim, nos animais submetidos à CEC, (G3 e G4) e também, presença de leve para moderada nas biópsias de pulmão, fígado e baço, nos G1 e G2.

Granulócitos corados em vermelho (CAE) foram identificados no parênquima pulmonar, grau 3 (A); no parênquima esplênico, grau 2 (zona perifolicular-B); hepático, grau 2 (C) e em leve quantidade em tecido cardíaco, grau 1 (D) e ausente em tecido cerebral, grau 0 (F). Em corte renal (E), encontraram-se granulócitos, sobretudo, nos glomérulos, grau 2, (Figura 20).

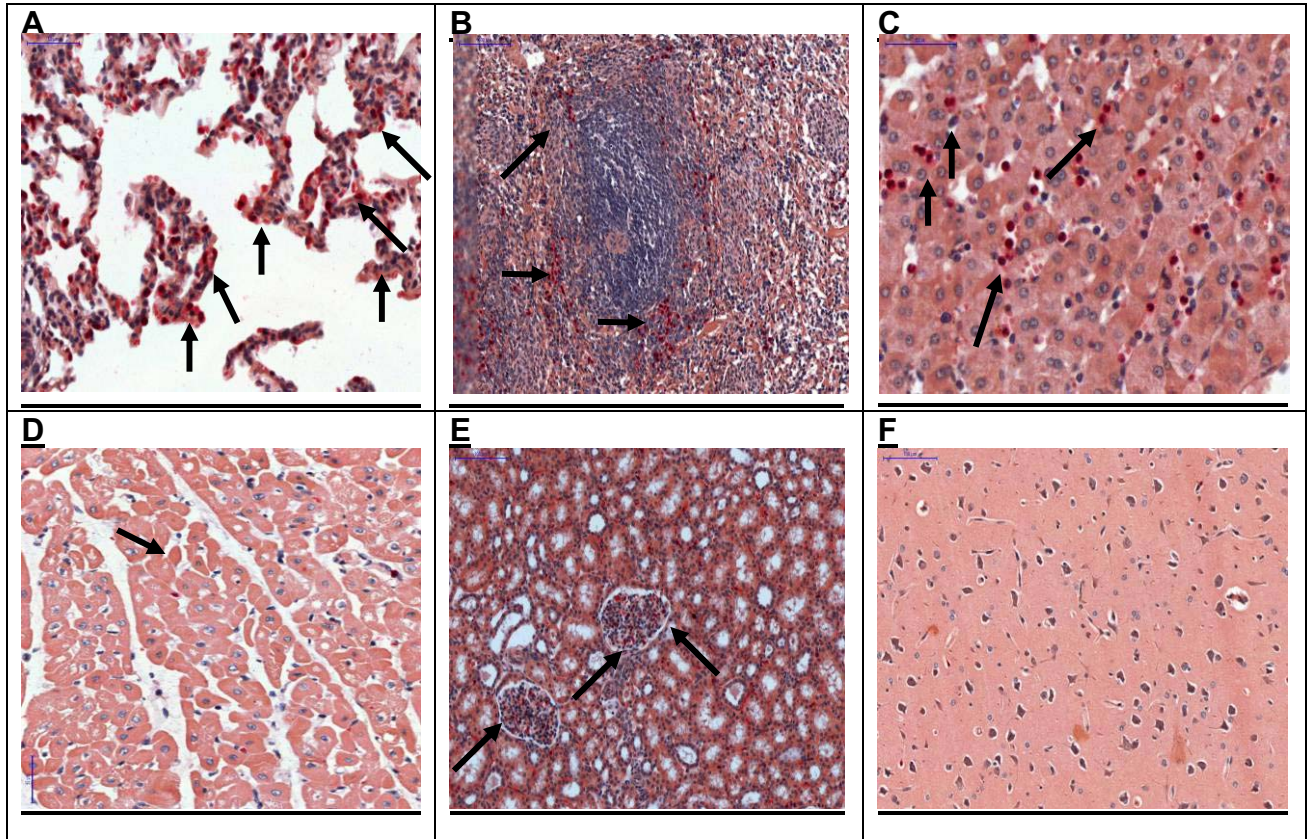


Figura 20 - Imagens histológicas de biópsias de órgãos de animais do G4. Análise de tecido de diferentes órgãos com relação a presença de infiltrado inflamatório. (A,B,D e E: H-E e CAE 100X. C e F: H-E e CAE 400X).

Discussão

Estudos *in vitro*, estudos *in vivo* em animais e estudo clínico com pacientes submetidos à cirurgia cardíaca com CEC mostraram o potencial terapêutico de anticorpo anti-Fas nas malhas de um filtro (LIM), na inativação neutrofílica rápida, e diminuição da resposta inflamatória aguda¹⁷⁻¹⁹.

No presente estudo usou-se como parâmetro a quantidade de granulócitos circulantes e a quantidade e distribuição corporal de ^{99m}Tc-granulócitos^{20,23} em órgãos como baço, cérebro, coração, fígado, músculo esquelético e pulmões de porcos submetidos à cirurgia com CEC. Analisou-se também a ação do LIM sobre níveis plasmáticos do marcador inflamatório IL-6¹¹, que é uma das primeiras citocinas a ser elevada e já relacionada à isquemia-reperfusão²⁴ e do DNA-livre, um marcador do grau de lesão tecidual²⁵. A quantificação de DNA livre em pacientes com câncer e indivíduos com trauma tem sido utilizada como marcador de morte celular e resposta inflamatória exacerbada²⁶⁻²⁹.

Utilizaram-se porcos pela semelhança com os seres humanos na hemodinâmica e anatomia do coração e grandes vasos, assim como pela maior disponibilidade e possibilidade de reprodução de raças específicas para este fim^{18,20,21,24,30,31}.

No experimento simulou-se uma intervenção cirúrgica cardíaca com CEC por 90 min, que incluía clampeamento de aorta, uso de cardioplegia e isquemia-reperfusão de coração e pulmões¹⁷⁻¹⁹. Por meio do tempo de

isquemia parcial pulmonar e miocárdica de 90 min, seguido de 30 min de reperfusão^{17,19}, buscou-se reproduzir situações clínicas comuns nas cirurgias com múltiplas pontes coronarianas³². A interposição do LIM na linha venosa possibilitou contato precoce da maioria dos granulócitos circulantes com a matriz do módulo^{32, 33,34}.

Ainda quanto à normatização do modelo experimental utilizado, as estabilidades hemodinâmica e metabólica dos animais foram observadas por meio da FC, PAm, pH e o perfil celular sanguíneo foi acompanhado com dosagens de Ht, Hb e neutrófilos circulantes nos M1,M2,M3 e M4^{6,19, 32}.

O modelo experimental foi mantido rigorosamente dentro do protocolo padronizado e mostrou-se passível de reprodutibilidade. Um dos problemas desse modelo foi a hemodiluição a que foram submetidos os animais dos grupos com uso de CEC. A hemodiluição diminui o número de células no sangue periférico. Assim, todos os resultados laboratoriais foram corrigidos pela variação do hematócrito. Contudo, a extensão com que a hemodiluição, a hipotermia e a adesão de células sanguíneas ao circuito ou ao endotélio, puderam influenciar as determinações radioativas, tanto isolada como associadamente, não pôde ser determinada^{20,23}.

A possível interferência da marcação isotópica sobre as funções granulocitárias foi considerada irrelevante uma vez que os leucócitos se mantiveram responsivos em testes *in vitro* e *in vivo*^{8,16,19,20,23}.

Ao se analisarem os resultados, observou-se, pelos valores da PAm e pH, que houve boa estabilidade hemodinâmica dos animais, nos diferentes

grupos e momentos do experimento. Quanto à FC, os animais do G4 apresentaram valores significativamente maiores em M4, no retorno dos batimentos cardíacos, quando comparados aos M1 e M2. Os valores de Hb e Ht foram menores nos G3 e G4, nos momentos M3 e M4 devido à hemodiluição das células com o *priming* da CEC.

À semelhança com outros experimentos com uso de CEC^{6,19,32}, o número de granulócitos sanguíneos (granulócitos normais + ^{99m}Tc-granulócitos) aumentou a partir da anestesia, levando a uma diferença significativa entre as médias dos valores dos grupos em M2, M3 e M4 em comparação com as médias de valores dos grupos em M1. Não foram observadas, contudo, diferenças significativas entre outros momentos e grupos, o que demonstrou que o procedimento anestésico, seguido de ventilação mecânica, mesmo sem a intervenção cirúrgica foi capaz de levar a um aumento dos neutrófilos circulantes.

Em estudo piloto, ao mesmo tempo que houve aumento nos granulócitos sanguíneos, observou-se uma grande queda da radioatividade no sangue (^{99m}Tc-granulócitos) em M2 e M3, o que nos fez pensar que, já precocemente, ocorreu uma grande transmigração dos ^{99m}Tc-granulócitos para os tecidos e um imediato incremento no número de granulócitos na circulação por meio da mobilização das células marginadas vasculares ou por aumento da resposta celular com liberação de células de defesa pela medula (Figura 15).

Brix-Christensen et al em 2002, em modelo experimental de cirurgia pediátrica com uso de CEC, em porcos, utilizaram marcadores radioativos

em neutrófilos e plaquetas, para quantificar suas distribuições em órgãos (coração, pulmões, baço, fígado e rins) e no sangue dos animais. O experimento contou com 60 minutos de isquemia, seguidos por 60 minutos de reperfusão. As biópsias foram coletadas após 4 horas do término da isquemia. No grupo CEC, a quantidade de ^{99m}Tc -granulócitos sanguíneos diminuiu no período de CEC comparativamente ao valor inicial de ambos os grupos e, após, tendeu à recuperação durante toda a fase de reperfusão, só se reestabelecendo na quarta hora. Já no grupo controle houve uma diminuição inicial dos ^{99m}Tc -granulócitos sanguíneos que foi seguida por elevação contínua desde a toracotomia até o término do experimento²⁰. Dois anos depois, em estudo semelhante, os mesmos autores observaram diminuição dos ^{99m}Tc -granulócitos circulantes ao longo de todo o experimento, em ambos os grupos²³.

Resultados de Scholz et al, 2003, demonstraram em modelo porcino adulto com uso de CEC, utilizando-se 60 min de isquemia (CEC) e 30 minutos de reperfusão, elevação do número de neutrófilos no sangue ao longo do tempo, contudo, um aumento 43% menor no número de leucócitos no grupo CEC com o uso de LIM, quando comparado ao grupo controle com CEC, sem LIM. Observaram também diminuição dos níveis plasmáticos de TNF- α , IL-8, CK e CK-MB no grupo LIM¹⁷. Valores próximos foram descritos por Abdel-Rahman et al, em modelo suíno com uso de CEC e LIM, que relataram aumento dos valores de neutrófilos circulantes pós CEC (60min de isquemia e 30 de reperfusão) no grupo CEC e ganho significativamente menor no número de neutrófilos sanguíneos no grupo CEC e LIM. Encontraram ainda,

diminuição das resistências vasculares periférica e pulmonar, além de baixos níveis de citocinas circulantes quando utilizaram o LIM¹⁹.

O modelo que utilizamos pouco se diferenciou desses dois últimos, a não ser por um maior tempo de isquemia, contudo não encontramos diferenças entre os grupos e dentro dos próprios grupos nos níveis séricos de marcador inflamatório IL-6, principalmente porque o desvio padrão das amostras foi muito grande, impossibilitando resultados significativos.

O outro marcador, DNA-livre, aumentou significativamente nos animais dos grupos 3 e 4, nos momentos 3 e 4. Estes dados podem corresponder à intensidade de resposta inflamatória e de lesão celular promovidas pela CEC e demonstrar incapacidade do LIM em diminuir as lesões celulares secundárias à isquemia-reperfusão e à CEC.

A quantidade de radiação nas biópsias dos órgãos não nos possibilitou reconhecer algum grupo com maior proteção à resposta inflamatória secundária à CEC e à isquemia-reperfusão de coração-pulmões. Mesmo os grupos G1 e G2, apresentaram medidas de radiação comparáveis aos grupos G3 e G4, embora os primeiros não tenham cursado com CEC. Comparando-se esses resultados com os estudos supracitados de Brix-Christensen et al., vemos que, em 2002, nas biópsias teciduais coletadas, eles observaram acúmulo de neutrófilos em pulmões e rins²⁰. Em estudo posterior, de 2004, que reproduziu o mesmo modelo de 2002, não obtiveram o mesmo resultado com relação à presença de ^{99m}Tc-granulócitos nos pulmões, mas confirmaram seu aumento nos rins. Tal resultado, porém, somente se delineou após duas horas de reperfusão, tornando-se significativo após 4 horas, ou seja, ao final

do experimento. Os autores relataram também que, em pulmões e fígado, a quantidade de ^{99m}Tc -granulócitos foi decrescente até o término do experimento, tanto no grupo controle quanto no grupo submetido a CEC (210 minutos de reperfusão)²³. Eles chamaram a atenção para o fato de ser, esse, um modelo pediátrico, com resposta humoral e celular distinta e discutiram que apesar da reposição volêmica com sangue de doadores, poderia ter havido interferência da hemodiluição nos valores aferidos. Concluíram ainda que devido ao curto tempo de observação, alterações mais evidentes puderam não ter sido observadas²³.

Na análise histológica, em nosso estudo, os tecidos apresentaram diferentes graus de infiltrado inflamatório e não foi possível identificar alterações típicas da apoptose (picnose), sendo então observada tanto a presença de ^{99m}Tc -granulócitos como de granulócitos não marcados. Demonstrou-se, assim, maior quantidade de granulócitos em G3 e G4, enquanto que, na medida da radiação, foram observadas tendências semelhantes em todos os grupos.

As cintilografias mostraram áreas quentes concentradas em pulmões e baço no grupo G1 e nos pulmões, baço e fígado nos grupos G2, 3 e 4. A análise cardíaca ficou prejudicada pela sobreposição da imagem cardíaca à pulmonar na cintilografia²³.

Esperava-se que, em G4 (LIM), com a ativação da via apoptótica e consequente diminuição no número de neutrófilos e de suas proteínas inflamatórias, o número de ^{99m}Tc -granulócitos circulantes diminuísse ao longo do tempo e que houvesse, à cintilografia, notadamente, maior quantidade

de ^{99m}Tc -granulócitos em baço, fígado e pulmões, pois os granulócitos radioativos seriam fagocitados pelas células do sistema mononuclear fagocítico presentes principalmente nestes órgãos. Ao contrário, no modelo estudado, não houve diminuição dos granulócitos circulantes em G4, e observou-se grande presença de ^{99m}Tc -granulócitos também nas cintilografias de animais dos G1, G2 e G3, indicando assim que a anestesia isolada, o procedimento cirúrgico e a CEC, ativaram os leucócitos circulantes, levando-os a se infiltrarem nos tecidos de baço, fígado e pulmões.

Por fim, ponderando nossos resultados, sugerimos a necessidade de tempo de observação mais prolongado durante a reperfusão para se encontrar alterações mais evidentes, à semelhança dos estudos mencionados, assim como número maior de animais, para se evitarem grandes desvios-padrão^{20,23}.

Conclusão

O uso do LIM, não alterou a quantidade de granulócitos no sangue, a quantidade e a distribuição dos ^{99m}Tc -granulócitos nos órgãos estudados, nem os níveis dos marcadores inflamatórios IL-6 e DNA-livre, no modelo experimental utilizado.

.

Referências

1. Frank W, Konta B. Bypassoperation am schlagenden Herzen im Vergleich zur Operation mit Unterstützung durch die Herz-Lungen-Maschine [site na Internet]. Köln: Deutschen Institutes für Medizinische Dokumentation und Information (DIMDI); 2006. [citado 2009 abr 17]. http://gripsdb.dimdi.de/de/hta/hta_berichte/hta141_bericht_de.pdf.
 2. Clark SC. Lung injury after cardiopulmonary bypass. *Perfusion*. 2006;21:225-8.
 3. Moura HV, Pomerantzeff PMA, Gomes WJ. Síndrome da resposta inflamatória sistêmica na circulação extracorpórea: papel das interleucinas. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2001;16:376-7.
 4. Asimakopoulos G, Smith PL, Ratnatunga CP, Taylor KM. Lung injury and acute respiratory distress syndrome after cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg*. 1999; 68:1107-15.
 5. Goebel U, Siepe M, Mecklenburg A, et al. Reduced pulmonary inflammatory response during cardiopulmonary bypass: effects of combined pulmonary perfusion and carbon monoxide inhalation. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2008;34:1165-72.
 6. Johnson D, Thomson D, Hurst T, et al. Neutrophil-mediated acute lung injury after extracorporeal perfusion. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1994;107:1193-202.
-

-
7. Asimakopoulos G, Taylor KM. Effects of cardiopulmonary bypass on leukocyte and endothelial adhesion molecules. *Ann Thorac Surg.* 1998;66:2135-44.
 8. Brix-Christensen V, Petersen TK, Ravn HB, Hjortdal VE, Andersen NT, Tønnesen E. Cardiopulmonary bypass elicits a pro- and anti-inflammatory cytokine response and impaired neutrophil chemotaxis in neonatal pigs. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2001; 45: 407-13.
 9. Kirschner RE, Fyfe BS, Hoffman LA, Chiao JJ, Davis JM, Fantini GA. Ischemia-reperfusion injury in myocutaneous flaps: role of leukocytes and leukotrienes. *Plast Reconstr Surg.* 1997;99:1485-93.
 10. Mojciak CF, Levy JH. Aprotinin and the systemic inflammatory response after cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg.* 2001;71:745-54.
 11. Tárnok A, Schneider P. Pediatric cardiac surgery with cardiopulmonary bypass: pathways contributing to transient systemic immune suppression. *Shock.* 2001;16 Suppl 1:24-32.
 12. Smit JJ, de Vries AJ, Gu YJ, van Oeveren W. Efficiency and safety of leukocyte filtration during cardiopulmonary bypass for cardiac surgery. *Transfus Sci.* 1999;20:151-65.
 13. Ilmakunnas M, Pesonen EJ, Ahonen J, Rämö J, Siitonen S, Repo H. Activation of neutrophils and monocytes by a leukocyte-depleting filter used throughout cardiopulmonary bypass. *J Thoracic Cardiovasc Surg.* 2005;129:851-9.
-

-
14. Zhao ZQ, Lefer DJ, Sato H, Hart KK, Jefforda PR, Vinten-Johansen J. Monoclonal antibody to ICAM-1 preserves postischemic blood flow and reduces infarct size after ischemia-reperfusion in rabbit. *J Leukoc Biol.* 1997;62:292–300.
 15. Lefer AM, Lefer DJ. The role of nitric oxide and cell adhesion molecules on the microcirculation in ischaemia-reperfusion. *Cardiovasc Res.* 1996;32:743-51.
 16. Cinatl J Jr, Blaheta R, Bittoova M, et al. Decreased neutrophil adhesion to human cytomegalovirus-infected retinal pigment epithelial cells is mediated by virus-induced up-regulation of Fas ligand independent of neutrophil apoptosis. *J Immunol.* 2000;165: 4405-13.
 17. Scholz M, Simon A, Berg M, et al. In vivo inhibition of neutrophil activity by a FAS (CD95) stimulating module: arterial in-line application in a porcine cardiac surgery model. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2004;127:1735-42.
 18. Moreno JB, Margraf S, Schuller AM, Simon A, Moritz A, Scholz M. Inhibition of neutrophil activity in cardiac surgery with cardiopulmonary bypass: a novel strategy with the leukocyte inhibition module. *Perfusion.* 2004;19:11-6.
 19. Abdel-Rahman U, Margraf S, Aybek T, et al. Inhibition of neutrophil activity improves cardiac function after cardiopulmonary bypass. *J Inflamm [revista eletrônica].* 2007 Oct 10 [citado 2008 jun 11];4:21. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?artid=2100046&blobtype=pdf>
-

-
20. Brix-Christensen V, Tønnesen E, Hjortdal VE, et al. Neutrophils and platelets accumulate in the heart, lungs, and kidneys after cardiopulmonary bypass in neonatal pigs. *Crit Care Med.* 2002;30(3):670-76.
 21. Roca M, Martín-Comín J, Becker W, et al. A consensus protocol for white blood cells labelling with technetium-99m hexamethylpropylene amine oxime. *Eur J Nucl Med.* 1998;25:797-9.
 22. Armitage P, Berry G, Mattheus JNS. Modelling continuous data. In: Armitage P, Berry G, Mattheus JNS. *Statistical methods in medical research.* Oxford: Blackwell Science Ltd; 2002, p.312-377.
 23. Brix-Christensen V, Rheling M, Flø C, et al. Neutrophil and platelet dynamics at organ level after cardiopulmonary bypass: an in vivo study in neonatal pigs. *APMIS.* 2004;112:133-40.
 24. Seekamp A, Jochum M, Ziegler M, van Griensven MMS, Martin M, Regel G. Cytokines and adhesion molecules in elective and accidental trauma-related ischemia/reperfusion. *J Trauma.* 1998; 44:874-82.
 25. Chang CPY, Chia RH, Wu TL, Tsao KC, Sun CF, Wu JT. Elevated cell-free serum DNA detected in patients with myocardial infarction. *Clin Chim Acta.* 2003; 327:95-101.
 26. Margraf S, Logters T, Reipen J, Altrichter J, Scholz M, Windolf J. Neutrophil-derived circulating free DNA (cf-DNA/NETs): a potential prognostic marker for posttraumatic development of inflammatory second hit and sepsis. *Shock.* 2008;30:352-8.
-

27. Lo YMD, Rainer TH, Chan LYS, Hjelm NM, Cocks RA. Plasma DNA as a prognostic marker in trauma patients. *Clin Chem*. 2000;46:319-23.
 28. Wu TL, Zhang D, Chia JH, Tsao KC, Sun CF, Wu JT. Cell-free DNA: measurement in various carcinomas and establishment of normal reference range. *Clin Chim Acta*. 2002;321:77-87.
 29. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004;303(5663):1532-5.
 30. Höhle P. Zur Übertragbarkeit tierexperimenteller endovasculärer Studien: Unterschiede der Gerinnungs-und Fibrinolyse- Systeme bei häufig verwendeten Tierspezies in Vergleich zum Menschen[site na Internet]. Aachen:RWTH Aachen Hochschulbibliothek - Medizin Fakultät- Dissertation; 19.10. 2000. [citado em 2009 out 20] http://darwin.bth.rwth-aachen.de/opus3/volltexte/2000/61/pdf/Hoehle_Philip.pdf
 31. Boldt J, Brenner T, Lehmann A, Suttner SW, Kumle B, Isgro F. Is kidney function altered by the duration of cardiopulmonary bypass? *Ann Thorac Surg*. 2003;75:906-12.
 32. Scholz M, Cinatl J, Barros RT, et al. First efficacy and safety results with the antibody containing leukocyte inhibition module in cardiac surgery patients with neutrophil hyperactivity. *ASAIO J*. 2005;51:144-7.
-

33. Gu YJ, de Vries AJ, Vos P, Boonstra PW, van Oeveren W. Leukocyte depletion during cardiac operation: a new approach through the venous bypass circuit. *Ann Thorac Surg.* 1999;67:604-9.

 34. Matheis G, Scholz M. Pathogenicity of cardiopulmonary bypass and concepts of leukocyte filtration. In: Matheis G, Moritz A, Scholz M, editors. *Leukocyte depletion in cardiac surgery and cardiology.* Basel: Karger; 2002. p. 47-53.
-



Apêndice



ANEXO 1

Tecnécio

O tecnécio é o elemento químico Tc. Seu número atômico é 43 e o seu peso atômico é 98 (isótopo mais estável). É um metal de transição, radioativo, sólido, cinza prateado, que se oxida lentamente em presença da umidade do ar.

O tecnécio 99m-hexametilpropilenamina-oxima (99mTc-HMPAO) é um isótopo usado para diagnóstico de imagem, onde, “99m” significa que seu peso atômico é 99 e é metaestável, com alto nível de energia. Tem como característica deteriorar-se completamente ao estado 99Tc que, embora radioativo, tem meia-vida curta, 6 horas, sendo liberado do corpo antes que ocorra qualquer problema¹.

¹ Oliveira R et al, Rev Bras Cien Farm, v 42, n 2, 2006.

ANEXO 2

Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma tecnologia baseada no emprego de radiação laser, fluxo hidrodinâmico, ótica, substâncias fluorescentes (fluorocromos), e recursos de informática, utilizada para determinar algumas características estruturais e funcionais de partículas biológicas. Ela determina componentes e propriedades de células e organelas celulares que fluem em uma suspensão celular. Os citômetros de fluxo, como são chamados os equipamentos utilizados para esse fim, têm como princípio básico aspirar células ou partículas de uma suspensão previamente preparada e forçá-las a passar por uma câmara especial (*flow cell*) que faz com que as células fiquem envolvidas e centralizadas num fluxo contínuo de líquido (*sheath fluid*) e saiam desta câmara uma atrás da outra de modo que uma única célula seja interceptada pelo laser. Uma vez interceptada pelo laser, dois tipos de fenômenos físicos ocorrem e fornecem informações acerca da célula.

Primeiro, uma parte da luz é espalhada (*scatter*) de acordo com as características morfológicas e estruturais da célula. O *Forward Scatter* (FS) se relaciona com o tamanho e o *Side Scatter* (SS) com a granularidade da célula ou partícula. Segundo, as células previamente coradas com fluorocromos, uma vez excitadas pelo laser, emitem luz de acordo com suas características fluorescentes que são utilizadas para se examinar aspectos bioquímicos, biofísicos e moleculares das células. Uma série de lentes

colocadas próximas desta zona de interceptação (célula-laser) coleta a luz dispersa e envia-na para tubos fotomultiplicadores, que convertem os sinais luminosos em pulsos elétricos, os quais são proporcionais à quantidade de luz dispersa ou fluorescente captada. Alguns parâmetros determinados pela citometria de fluxo podem ser assim classificados: intrínsecos estruturais (morfologia da célula e proteínas fluorescentes) e intrínsecos funcionais (potencial óxido-redução, proliferação celular, ativação celular e apoptose), assim como extrínsecos estruturais (conteúdos de DNA e RNA, taxa de DNA, estrutura cromatínica, proteínas totais ou básicas, grupos químicos, antígenos, etc.) e extrínsecos funcionais (estudos da membrana celular, síntese de DNA, receptores, potencial de membrana, etc.)

Utilizou-se o CELL-DYN 3500® (Abbott GmbH, Wiesbaden, Alemanha) um citômetro de fluxo que conta e diferencia leucócitos, assim como eritrócitos e trombócitos. Os valores referencias utilizados foram os recomendados pelo *International Committee for Standardization in Haematology* (ICSH 1984)².

² Handbook of Flow Citometry, JP Robinson, editora Wiley-Liss, New York, 1993.

ANEXO 3

Protocolo

Experimentgruppe:

- Kontrolle ohne Chirurgie Chirurgie HLM HLM + LIM

Reduktion der Leukozytenpathogenität durch Leukozyten-Inhibition im herzchirurgischen Tiermodell

**Klinikum der Johann Wolfgang Goethe Universität
Klinik für Herz-, Thorax und thorakale Gefäßchirurgie;**

Tierversuch Nr.:

Datum:

Geschlecht: männlich weiblich; **Gewicht:** ____ Kg

Besonderheiten: _____

Anästhesie:

Narkosebeginn: Zeit _____;

Lungenfunktion:

Ve _____ l/min **Peep** _____ **max** _____ -**min** _____

Atemfrequenz _____ **max** _____ -**min** _____

Atemvolumen Ve _____ / (Sptzd _____ - PEEP _____) = _____

Horovitz-Quotient PaO_2 _____ / FiO_2 _____ = _____

Hämodynamik:

Blutdruck art. Messung: _____ / _____ mmHg; **Herzfrequenz:** _____ /min

Blutentnahme A

Einmal EDTA, einmal Serum zum zentrifugieren&einfrieren, sowie einmal für Blutgase und Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG)

Blutbild: Zeit _____;

Hb _____; **Hk** _____;

Leuc _____

Neutros _____

Lymphos _____

Blutgase: pH _____; pO_2 _____; pCO_2 _____; **BE** _____

Blutsenkungsgeschwindigkeit: _____

Entnahme des Blutes für Leukozytenmarkierung 3x40ml +je 10 ml ACAD +1x40ml und 10 ml ACAD für Plasma:

Zeit: _____;

Reinheit: _____ %

Gesamtmenge der Granulozyten _____

Gesamtaktivität: _____ MBq
 Uhrzeit zur Gesamtaktivität: _____ Uhr
 Besonderheiten: _____

Sternotomie

Ve _____ l/min Peep _____ max _____ -min _____
 Atemfrequenz _____ max _____ -min _____
 Atemvolumen Ve _____ / (Sptzd _____ - PEEP _____) = _____
 Horovitz-Quotient PaO₂ _____ / FiO₂ _____ = _____

Blutdruck: _____ mmHg; Herzfrequenz: _____ /min;

Chirurgie: Heparin:

Blutentnahme B = kurz vor HLM bzw vor Gabe der Strahlung bei Kontrolle

Einmal EDTA, einmal Serum zum zentrifugieren & einfrieren, Blutgase

Blutbild: Zeit _____;
 Hb _____; Hk _____;
 Leuc _____
 Neutros _____
 Lymphos _____
 Blutgase: pH _____; pO₂ _____; pCO₂ _____; BE _____

Gabe der Tech-99 markierten neutrophilen Granulozyten,

Menge _____ %_Uhrzeit: _____
 Anfang der Kardioplegie (Zeit) und HLM: _____;

Anfang der Ischämie:
 Lungenfunktion, falls ohne HLM:

Ve _____ l/min Peep _____ max _____ -min _____
 Atemfrequenz _____ max _____ -min _____
 Atemvolumen Ve _____ / (Sptzd _____ - PEEP _____) = _____
 Horovitz-Quotient PaO₂ _____ / FiO₂ _____ = _____

Hämodynamik:

Blutdruck art. Messung: _____ / _____ mmHg; Herzfrequenz: _____ /min

Neu: Blutentnahme (Edta) 10 min nach Strahlungsgabe
 Dann nach 30 min, 60 min, 90 Min (=B2 und 2. Strahlungsgabe) 120 min (=C)
 Ischämie bzw Kontrolle zur Feststellung des Strahlungsanteils im Blut.

60 min Ischämie

Gabe der Tech-99 markierten neutrophilen Granulozyten,

Menge _____ %_Uhrzeit: _____
 Anfang der Kardioplegie (Zeit) und HLM: _____;

Lungenfunktion, falls ohne HLM:

Ve _____ l/min Peep _____ max _____ -min _____

Atemfrequenz _____ max _____ -min _____
 Atemvolumen V_e _____ / (Sptzd _____ - PEEP _____) = _____
 Horovitz-Quotient PaO_2 _____ / FiO_2 _____ = _____

Hämodynamik:

Blutdruck art. Messung: _____ / _____ mmHg; Herzfrequenz: _____ /min

90 min Ischämie (kurz vor Reperfusion)

Blutentnahme B2

Einmal EDTA, einmal Serum zum zentrifugieren&einfrieren

Blutbild: Zeit _____;

Hb _____; Hk _____;

Leuc _____

Neutros _____

Lymphos _____

Blutgase: pH _____; pO_2 _____; pCO_2 _____; BE _____

Gabe der Tech-99 markierten neutrophilen Granulozyten,

Menge _____ %_Uhrzeit:: _____

Anfang der Kardioplegie (Zeit) und HLM: _____;

Lungenfunktion, falls ohne HLM:

V_e _____ /min Peep _____ max _____ -min _____

Atemfrequenz _____ max _____ -min _____

Atemvolumen V_e _____ / (Sptzd _____ - PEEP _____) = _____

Horovitz-Quotient PaO_2 _____ / FiO_2 _____ = _____

Hämodynamik:

Blutdruck art. Messung: _____ / _____ mmHg; Herzfrequenz: _____ /min

Reperfusion 30 min:

Öffnen der Aorta _____

Besonderheiten: Arrythmie; Fibrillation; Defibrillierung;

Anderes: _____

Ende der Reperfusion

V_e _____ /min Peep _____ max _____ -min _____

Atemfrequenz _____ max _____ -min _____

Atemvolumen V_e _____ / (Sptzd _____ - PEEP _____) = _____

Horovitz-Quotient PaO_2 _____ / FiO_2 _____ = _____

Hämodynamik:

Blutdruck art. Messung: _____ / _____ mmHg; Herzfrequenz: _____ /min

Blutentnahme C

Einmal EDTA, einmal Serum zum zentrifugieren&einfrieren

Blutbild: Zeit _____;

Hb _____; Hk _____;

Leuc _____

Neutros _____
Lymphos _____
Blutgase: pH _____; pO2 _____; pCO2 _____; BE _____

Euthanasie:

Euthanasiezeit:
Entblutungzeit:
Entblutungsmenge aus Spülflüssigkeit+Blut im Container:
Reststrahlung aus der Entblutungsmenge:
Uhrzeit der Messung der Reststrahlung dazu:
Biopsien:
Herz: _____ Lunge: _____ Gehirn: _____
Niere: _____ Leber: _____ Milz: _____
Muskel: _____

Besonderheiten: _____

Gammakamera:

Zeit des Anfangs der Messung:
Ende der Messung:
Rücktransport des Kadavers zur Tierversuchsanlage: Ok
Zeit: _____
Entsorgung des Kadavers: _____ Ok
Zeit: _____
Reinigung des OP-raums: _____ Ok
Zeit: _____

Besonderheiten: _____

Unterschriften des chirurgischen Teams:

Anästhesie _____

HLM _____

Chirurg I _____

Chirurg II _____

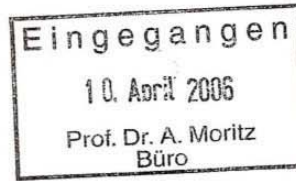
Chirurg III _____

ANEXO 4

Comitê de Ética

Regierungspräsidium Darmstadt

HESSEN



Regierungspräsidium Darmstadt . 64278 Darmstadt

Klinikum der
Johann Wolfgang Goethe-Universität
Klinik für Thorax-, Herz- und Thorakale
Gefäßchirurgie
Herrn Prof. Dr. A. Moritz
Theodor-Stern-Kai 7
60590 Frankfurt am Main

Unser Zeichen: **V 54 - 19 c 20/15 - F 93/27**
Ihr Zeichen:
Ihre Nachricht vom:
Ihr Ansprechpartner: Herr Dr. Sebek/Frau Schader
Zimmernummer: 2.116/2.104
Telefon: 06151-12 53 05/12-55 33
Fax: 06151-12-64 98
E-Mail: veterinaerdezernat@rpda.hessen.de
Datum: 06. April 2006

Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren;
Genehmigung gemäß § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes (TierSchG) vom 25. Mai 1998 (BGBl. I S. 1105)

Ihr Antrag auf Genehmigung vom 06.12.2005
Ihre Schreiben vom 23.03.2006

Sehr geehrte Damen und Herren,

auf Ihren Antrag vom 06.12.2005 , geändert bzw. ergänzt mit Schreiben vom 23.03.2006 erteile ich Ihnen gemäß § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes die

GENEHMIGUNG

zur Durchführung von wissenschaftlichen Versuchen an max. 72 Schweinen

für folgendes Versuchsvorhaben:

“LPI“

(Gen. Nr. F 93/27)

Regierungspräsidium Darmstadt
Wilhelminenstraße 1-3, Wilhelminenhaus
64283 Darmstadt

Internet:
www.rpda.de

Servicezeiten:
Mo. - Do. 8:00 bis 16:30 Uhr
Freitag 8:00 bis 15:00 Uhr
Telefon: 06151 12 0 (Zentrale)
Telefax: 06151 12 6347 (allgemein)

Fristenbriefkasten:
Luisenplatz 2
64283 Darmstadt
Öffentliche Verkehrsmittel:
Haltestelle Luisenplatz

- 2 -

Verantwortlich für die antragsgemäÙe Durchführung des Versuchsvorhabens und die Einhaltung der rechtlichen Vorschriften ist der

Leiter des Versuchsvorhabens: Prof. Dr. A. Moritz

Stellvertreter des Leiters: A. Simon

Im Rahmen des Versuchsvorhabens dürfen auÙer den Obengenannten folgende Personen entsprechend ihrer Qualifikation bzw. aufgrund von Ausnahmegenehmigungen gem. § 9 Abs. 1 Satz 4 TierSchG Eingriffe und Behandlungen vornehmen. Sofern erforderliche Ausnahmegenehmigungen noch nicht vorliegen, sind diese unverzüglich zu beantragen.

Dr. T. Aybek
Dr. M. Scherer
Prof. Dr. M. Scholz

Die Betäubung der Tiere ist durchzuführen bzw. zu beaufsichtigen von:
A. Simon, Dr. T. Aybek, Prof. Dr. M. Scholz, Dr. A. Theisen.

Für die medizinische Versorgung der Tiere ist verantwortlich:
Dr. A. Theisen.

Der Bescheid ergeht unter folgenden Nebenbestimmungen:

Diese Genehmigung ist befristet bis zum 05.04.2009.

Den Widerruf der Genehmigung behalte ich mir vor.

Änderungen bezüglich der versuchsdurchführenden Personen sind der Genehmigungsbehörde unverzüglich anzuzeigen.

Hinweise:

Gemäß § 8 Abs. 4 TierSchG ist der Genehmigungsbehörde jeder Wechsel des Leiters des Versuchsvorhabens oder seines Stellvertreters unverzüglich anzuzeigen. In diesem Fall gilt die Genehmigung weiter, wenn sie nicht innerhalb eines Monats nach Eingang der Anzeige bei der Genehmigungsbehörde widerrufen wird.

Jede Änderung des genehmigten Versuchsvorhabens bedarf der Erlaubnis durch die Genehmigungsbehörde oder ist bei Vorliegen der Voraussetzungen des § 8 Abs. 7 Satz 2 TierSchG anzuzeigen.

Für Betäubungen gelten die Vorschriften des § 9 Abs. 2 Ziffer 4 TierSchG (siehe auch Ziffer 9.2.2.1 und 9.2.2.2 der Allg. Verwaltungsvorschrift zur Durchführung des Tierschutzgesetzes).

- 3 -

- 3 -

Kostenentscheidung:

Die Erteilung dieser Genehmigung ist gem. § 1 Abs. 1 Hessisches Verwaltungskostengesetz i. d. F. vom 12. Januar 2004 (GVBl. I S. 36) kostenpflichtig.

- Gemäß Nr. 53007 der Verwaltungskostenordnung für den Geschäftsbereich des Ministeriums für Umwelt, ländlichen Raum und Verbraucherschutz vom 16.12.2003 (GVBl. I S. 362 ff) beträgt die Gebühr **360,- EUR**.
- Auslagen i. S. d. § 9 Hessisches Verwaltungskostengesetz sind nicht entstanden.

Ich bitte, den Betrag von **360,- EUR innerhalb von 60 Tagen gerechnet ab Datum dieses Bescheides** an die Landesbank Hessen-Thüringen, Konto-Nr. **1005875**, BLZ 500 500 00, unter Angabe Referenznummer: 54007220600159 und des Empfängers **HCC-RP Darmstadt** zu überweisen.

Ich bitte Sie den beiliegenden Zahlungsvordruck für die Überweisung zu verwenden.

Rechtsbehelfsbelehrung

Gegen den Bescheid kann innerhalb eines Monats nach Bekanntgabe Klage beim

Verwaltungsgericht Frankfurt am Main
Adalbertstraße 44 - 48
60486 Frankfurt am Main

schriftlich oder zur Niederschrift der Urkundsbeamtin oder des Urkundsbeamten der Geschäftsstelle erhoben werden.

Die Klage muss die Klägerin oder den Kläger, die Beklagte oder den Beklagten und den Gegenstand des Klagebegehrens bezeichnen.

Die Klage ist gegen das Land Hessen, vertreten durch das Regierungspräsidium zu richten. Sie soll einen bestimmten Antrag enthalten. Die zur Begründung dienenden Tatsachen und Beweismittel sollen angegeben werden. Die angefochtene Verfügung soll in Urschrift oder Abschrift beigelegt werden.

Der Klage und allen Schriftsätzen sollen Abschriften für die übrigen Beteiligten beigelegt werden.

Mit freundlichen Grüßen
Im Auftrag

(Dr. Sebek)



RUTH IVI ELSTER Tradutora Pública e Intérprete Comercial RG 8.686.625-4 Habilitada pela Junta INSS 11645233396 Comercial do Estado de São Paulo nos Idiomas Alemão C.C.M. 2.933.371-7 e Inglês sob o Nº 1677. R. Ouvidor Peleja, 585 Apto. 41 – 04128-001 – Tel/Fax: (11) 5594-3882 – São Paulo – SP TRADUÇÃO Nº 00698 LIVRO Nº 004 FLS. 252

Certifico que me foi enviado um documento em idioma alemão, composto de 3 folhas digitalizadas, com a seguinte identificação: **GENEHMIGUNG**, que passo a traduzir para o vernáculo:

Regierungspräsidium Darmstadt [Administração Municipal]

HESSE

[Brasão]

[carimbo]: Recebido

10. Abril 2006

Prof. Dr. A. Moritz

Escritório

Regierungspräsidium Darmstadt . 64278 Darmstadt

Nossa identificação: **V 54 – 19 c 20/15 – F 93/27**

Sua identificação:

Sua mensagem de:

Seu(s) contato(s): Dr. Sebek/Sra. Schader

Sala Nº: 2.116/2.104

Telefone: 06151-12 53 05/12-55 33

Fax: 06151-12-64 98

E-Mail: veterinardezernat@rpda.hessen.de

Data: 6 de abril de 2006

Hospital Universitário da

Universidade Johann Wolfgang Goethe

Clínica de Cirurgia Vascular Torácica e Cardíaca

Prof. Dr. A. Moritz

Theodor-Stern-Kai 7

60590 Frankfurt am Main

Realização de Experimentos em Vertebrados:

Autorização de acordo com § 8 Seção 1 da Lei de Proteção aos Animais (TierSchG) de 25 de maio de 1998 (Diário Oficial da União [BGBL.] I, Fls. 1105)

Seu requerimento de 06.12.2005

Sua correspondência de 23.03.2006

RUTH IVI ELSTER Tradutora Pública e Intérprete Comercial RG 8.686.625-4 Habilitada pela Junta INSS 11645233396 Comercial do Estado de São Paulo nos Idiomas Alemão C.C.M. 2.933.371-7 e Inglês sob o Nº 1677. R. Ouvidor Peleja, 585 Apto. 41 – 04128-001 – Tel/Fax: (11) 5594-3882 – São Paulo – SP TRADUÇÃO Nº 00698 LIVRO Nº 004 FLS. 253

Prezados Senhores,

Em resposta ao seu requerimento de 06.12.2005, modificado e/ou complementado pela correspondência de 23.03.2006 é concedida a

AUTORIZAÇÃO

de acordo com § 8 Seção 1 da Lei de Proteção aos Animais, para a realização de experimentos científicos em, no máximo, 72 porcos **para o seguinte projeto experimental:**

"LPI"

(Gen. Nr. F 93/27)

[no rodapé]:

Regierungspräsidium Darmstadt Horário de funcionamento:

Wilhelminenstraße 1-3, Wilhelminenhaus 2ª a 5ª 8h00 às 16h30

64283 Darmstadt Sexta 8h00 às 15h00

Internet: www.rpda.de Telefone: 06151 12 0 (Central)

Fax: 06151 12 6347 (Geral)

Fristenbriefkasten [Caixa de correio para remessas com prazo]:

Luisenplatz 2

64283 Darmstadt

Transporte público: Parada Luisenplatz

[folha 2]

Pela realização do projeto experimental de acordo com o requerimento e pela observação das regras legais é responsável o

Chefe do projeto experimental: Prof. Dr. A. Moritz

Substituto do Chefe: A. Simon

Além das pessoas acima citadas, as seguintes pessoas estão autorizadas a realizar procedimentos e tratamentos no âmbito do projeto, de acordo com a sua qualificação e/ou com base nas autorizações de exceção conforme § 9 Seção 1 Item 4 da Lei de Proteção aos Animais. Caso ainda não estejam de posse das autorizações excepcionais, estas devem ser requeridas imediatamente.

RUTH IVI ELSTER Tradutora Pública e Intérprete Comercial RG 8.686.625-4 Habilitada pela Junta INSS 11645233396 Comercial do Estado de São Paulo C.P.F. 013.181.768-08 Paulo nos Idiomas Alemão C.C.M. 2.933.371-7 e Inglês sob o Nº 1677. R. Ouvidor Peleja, 585 Apto. 41 – 04128-001 – Tel/Fax: (11) 5594-3882 – São Paulo – SP TRADUÇÃO Nº 00698 LIVRO Nº 004 FLS. 254

Dr. T. Aybek
Dr. M. Scherer

Prof. Dr. M. Scholz

A anestesia dos animais deve ser conduzida ou supervisionada por:
A. Simon, Dr. T. Aybek, Prof. Dr. M. Scholz, Dr. A. Theisen.

É responsável pela assistência médica dos animais:

Dr. A. Theisen.

A decisão é emitida sob as seguintes condições:

Esta autorização tem prazo até 05.04.2009.

Reservo-me o direito de revogar a autorização.

Qualquer alteração com relação às pessoas que realizarão o experimento deve ser informada imediatamente à autoridade competente.

Observações:

De acordo com § 8 Seção 4 da Lei de Proteção aos Animais, qualquer mudança do chefe do projeto experimental ou de seu substituto deve ser imediatamente comunicada à autoridade competente. Neste caso a autorização continuará válida, desde que não seja revogada no prazo de um mês após a entrada da comunicação junto à autoridade competente.

Qualquer alteração no projeto experimental autorizado necessita de permissão pela autoridade competente ou deverá ser comunicada, quando existirem as condições do § 8 Seção 7 Item 2.

Para anestésias valem as regras do § 9 Seção 2 Número 4 da Lei de Proteção aos Animais (ver também número 9.2.2.1 e 9.2.2.2 da Regra Administrativa Geral para a aplicação da Lei de Proteção aos Animais).

RUTH IVI ELSTER Tradutora Pública e Intérprete Comercial RG 8.686.625-4 Habilitada pela Junta INSS 11645233396 Comercial do Estado de São Paulo C.P.F. 013.181.768-08 Paulo nos Idiomas Alemão C.C.M. 2.933.371-7 e Inglês sob o Nº 1677. R. Ouvidor Peleja, 585 Apto. 41 – 04128-001 – Tel/Fax: (11) 5594-3882 – São Paulo – SP TRADUÇÃO Nº 00698 LIVRO Nº 004 FLS. 255

[folha 3]

Quanto às despesas:

A concessão desta autorização é sujeita a taxa conforme § 1, Seção 1 da Lei de Custos Administrativos de Hesse na forma de 12 de janeiro de 2004 (Diário Oficial I, Fl. 36).

• De acordo com o N° 53007 da Tabela de Custos Administrativos para a área do Ministério do Meio-ambiente, da Zona Rural e da Proteção ao Consumidor de 16.12.2003 (Diário Oficial I, Fls. 362 e seg.), a taxa corresponde a

360,-- EUR

• Não se incorreu em despesas nos termos do § 9 da Lei de Custos Administrativos de Hesse.

Peço que a quantia de **360,-- EUR** seja transferida **no prazo de 60 dias a contar da data desta decisão** para o banco Landesbank Hessen-Thüringen, Conta Corrente N° **1005875**, BLZ [Código do banco] 500 500 00, informando o número de referência: 54007220600159 e o favorecido **HCC-RP Darmstadt**.

Para a transferência, solicito que seja usado o formulário de pagamento anexo.

Instrução sobre recursos legais cabíveis

No prazo de um mês após a comunicação, pode-se apresentar petição contra a decisão, por escrito ou a ser registrada pelo escrevente do cartório, junto ao

Tribunal Administrativo de Frankfurt am Main

Adalbertstraße 44 - 48

60486 Frankfurt am Main.

A petição deve designar o(a) requerente, a requerida ou o requerido e o objeto da reivindicação.

A petição deve ser dirigida ao Estado de Hessen, representado pelo *Regierungspräsidium* [Governo da Região Administrativa].

RUTH IVI ELSTER Tradutora Pública e Intérprete Comercial RG 8.686.625-4 Habilitada pela Junta INSS 11645233396 Comercial do Estado de São Paulo C.P.F. 013.181.768-08 Paulo nos Idiomas Alemão C.C.M. 2.933.371-7 e Inglês sob o N° 1677. R. Ouvidor Peleja, 585 Apto. 41 - 04128-001 - Tel/Fax: (11) 5594-3882 - São Paulo - SP TRADUÇÃO N° 00698 LIVRO N° 004 FLS. 256

Ela deve conter uma reivindicação explícita. Devem ser informados os fatos e as provas, nos quais se fundamentam a petição. A disposição contestada deve ser anexada em original ou em cópia. Devem ser anexadas cópias da petição e de todos os documentos para as outras partes interessadas.

Cordialmente

Por ordem

[assinatura ilegível]

(Dr. Sebek)

NADA MAIS. Executei a presente tradução conforme o meu melhor entender, conferi, assino e dou fé.

São Paulo, 16 de janeiro de 2010

RUTH IVI ELSTER

Emolumentos: R\$ 166,40 [4 laudas]

Recibo Jucesp N 352

**An das
Regierungspräsidium Darmstadt
z. Hd. Herr Dr. Sebek /Fr. Schader
64278 Darmstadt
Betr.: V 54-19c20/15-F93/27**

Dr. med. Dipl. Ing (FH) Stefan Margraf
Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Thorax-, Herz- und thorakale Gefäßchirurgie
Theodor-Stern-Kai 7
60590 Frankfurt am Main

Tel.: 069 / 6301-7548, -6500
Fax: 069 / 6301-7108

Sehr geehrter Herr Dr. Sebek, sehr geehrte Frau Schader,

hiermit zeige ich Ihnen personelle Veränderungen der Mitwirkenden an dem Tierversuchsvorhaben:

**Untersuchungen zur Verminderung inflammatorischer Reaktionen während
und nach Operationen mit cardio-pulmonalen Bypass mittels eines in den
Bypass angeordnetem Modul**

mit der Genehmigungsnummer V 54-19c20/15-F93/27 an.

Ich bitte den Stellvertreter des Leiters, Dr. A. Simon zu streichen und zu ersetzen mit Dr. Sven Martens.

Leiter bleibt Prof. Dr. Moritz.

Weiter bitte ich Dr. T. Aybek und Dr. Scherer als Experimentatoren zu streichen und stattdessen Dr. Ulf Abdel-Rahman einzusetzen.

Zusätzlich bitte ich den Gefäßchirurgen Prof. Dr. Jose Moreno, die Thoraxchirurgin Dr. Ieda Franschichetti und Dr. Stefan Margraf als unter Aufsicht tätige Personen zu vermerken. Die beiden erstgenannten sind zwar erfahrene Experimentatoren am Schweinemodell und waren diesbezüglich schon unter Prof. Satter tätig, jedoch

suchen wir noch die dazu gehörigen Tierversuchsnummern als Nachweis. Infolge Umzugs des Regierungspräsidiums Giessen ist dies erschwert.

Mit freundlichen Grüßen

Stefan Margraf

S. Margraf

PS:

Könnten Sie bitte den Eingang dieses Schreibens quittieren (z. B. mit Ihrem Eingangsstempel versehen zurückfaxen) ?



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu – S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br

Instituída na Faculdade de Medicina através da Portaria do Diretor nº 30 de 26/04/99



Comissão de Ética em Experimentação Animal

Botucatu, 19 de janeiro de 2010.

Of. 001/10-CEEA

Ilustríssimo Senhor
Prof. Dr. Winston Bonetti Yoshida
Departamento de Cirurgia e Ortopedia
Faculdade de Medicina do Campus de Botucatu

Com referência ao Projeto de Pesquisa "Efeito do módulo de inativação leucocitária (LIM) na distribuição de ^{99m}Tc -granulócitos em porcos submetidos à circulação extracorpórea e à isquemia - reperfusão de coração e pulmões" de autoria da Dr^a Ieda Francischetti, orientada pelo Prof. Dr. Winston Bonetti Yoshida, obteve reconhecimento pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Medicina do Campus de Botucatu - UNESP aos 19/01/2010, estando em condições de ser defendido a tese de doutorado.

Atenciosamente,

Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEEA

Apêndice 1

Tabela 1 - Exemplo da planilha de cálculo ^{99m}Tc – granulócitos; grupo 1, experimento 34.

Kennzeichnung Schwein: SW34/070531		Aktivitätsbestimmung		Datum: 31/5/2007		Durchschnitt MBq/kg 5,03		Durchschnitt Bq/g 5025			Pig-Milz-Leber-BLut						
Gewicht: 39 kg		Uhrzeit: 13:02		Aktivität: 196 MBq		Kalibrierfaktor: 48.500 cpm/kBq		Blutaktivität (%): 36,13		Milz+Leber (%): 19,18		Lunge (%): 5,84		87,58		158,40	
Blutmenge Container: 3 l		Gruppe: A		2,9								5025,64		2300		8530	
Organ	Filename	Uhrzeit Messung	Messdauer [min]	Totzeit [%]	Messwert [cpm]	Gewicht der Probe [g]	Aktivitätskonzentration [Akt.messung] [Bq/g]	Aktivitätsanteil applizierte Aktivität [10 ⁶ g]	Organfaktoren	Strahlungsmenge der jeweiligen Organe (MBq)	Strahlung in Prozent pro Gramm Gewebe wenn Blutstrahlung 100% sei	Strahlungsmenge der ganzen Organe wenn appl. Aktivität=100%	Strahlung in Prozent pro Gramm Gewebe wenn Pig-strahlung 100% sei	Strahlung in Prozent pro Gramm Gewebe wenn Pig-Milz-Leber-BLut 100% sei	Strahlung in Prozent pro Gramm Gewebe wenn Pig-Milz-Leber 100% sei		
Gehirn	SW34Him	19.00	1	4	18.271	1,68	399	2,0	0,00150	0,02	2	Gehirn	0,01	8	17	5	
Lunge	SW34Luf	18.42	1	9	625.308	0,79	31.407	160,2	0,00935	11,45	129	Lunge	5,84	625	1365	368	
Herz	SW34Herz	18.58	1	5	36.665	1,12	1.340	6,8	0,00450	0,24	5	Herz	0,12	27	58	16	
Niere	SW34Nire	18.52	1	8	406.697	1,34	12.277	62,6	0,00427	2,04	50	Niere	1,04	244	634	144	
Muskel	SW34Musk	18.54	1	4	12.780	1,61	322	1,6	0,50000	6,29	1	Muskel	3,21	6	14	4	
Milz	SW34Milz	18.50	1	17	1.047.688	0,36	174.721	891,4	0,00182	12,38	716	Milz	6,32	3477	7595	2048	
Leber	SW34Leb	18.52	1	8	489.322	0,7	27.121	138,4	0,02384	25,22	111	Leber	12,87	540	1179	318	
Blut 120min C	SW34Bl	18.10	1	9	560.239	1	20.902	106,6	0,08000	70,82	100	Blut	36,13	456	1061	286	
Blut 90min pl (B2)		18.04	1	10	661.847	1	24.409	124,5		128,5		Rest	34,5				
Blut 60 min p.L		18.00	1	9	602.646	1	22.055	112,5									
Blut 30min p.L		17.48	1	12	972.990	1	34.795	177,5									
Blut 10 min p.L	SW3410n	17.45	1	20	1.958.253	1	69.656	354,9									
Lunge Hilus	Sw34Luf	18.46	1	5	150.706	0,34	17.724	90,4									
Milz-Blutaktivität																	
Kommentar: XXXXXXXXXX BSG 28mm/ Std. war Kurzatmig. 50 CO2, rechter Mittelappen war szintigraphisch hoch akt. ca. 400 Mio Granus																	



Blut MBq	70,82
Milz+Leber MBq	1800
	21
	1688
	72
	660
	17

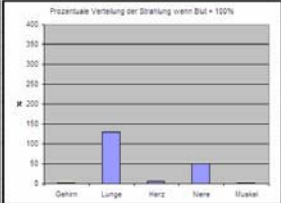
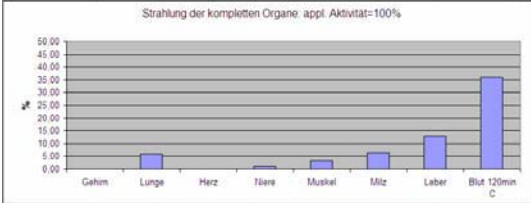


Tabela 2 - Dados relativos ao M1.

Grupos	Animais	Sexo	peso	PAS		FC	VV	VHS	VCM	HbM1	HbM1	Leuc	Neutr	Linfóc	Monóc	Eosin	Basóf	plaq	VPM	pHh	pO2	pCO2	BE	DNA	PN	Radtot	IL6				
				M1	M2																							M1	M2	M1	M2
Anestesia	32	f	31	84	76	72	57	54	48	89	0.4	5.14	9.13	30.3	20.4	7.17	11.4	1.52	0.163	0.089	568	8.05	7.41	105	45	3.2	84,3	98,00	226	20	
Anestesia	34	f	39	81	78	75	64	53	50	94	3.0	5.86	9.28	33.6	19.1	7.94	8.6	2.45	0.045	0.130	598	8.05	7.38	104	53	4.8	59,6	98,00	196	20	
Anestesia	45	f	41	86	86	99	67	67	68	119	3.0	5.05	9.24	29.3	14.2	5.50	7.6	0.99	0.052	0.124	388	6.69	7.49	98	34	3.0	39,1	98,00	232	20	
Anestesia	51	f	45	65	113	134	52	79	95	124	3.0	5.55	9.31	30.6	23.8	8.10	14.2	1.19	0.139	0.114	460	7.31	7.55	115	32	6.3	92,2	97,00	214	20	
Anestesia	52	f	35	86	104	90	60	65	57	104	3.0	5.41	9.00	29.1	14.3	6.83	7.4	0.09	0.014	0.000	508	7.90	7.55	100	31	4.9	87,3	98,00	218	20	
Anestesia	53	m	43	100	100	89	72	78	73	72	3.0	5.97	9.82	31.5	18.4	13.60	2.7	2.15	0.006	0.035	649	5.92	7.56	120	29	4.8	98,1	96,00	159	20	
Controle	10	f	38	96	100	87	67	58	47	94	2.0	4.94	8.95	28.9	12.6	2.35	9.3	0.80	0.058	0.069	454	9.03	7.59	201	29	6.6	72,6	98,00	82	20	
Controle	18	f	34	78	74	81	45	40	39	61	7.7	3.0	3.84	7.92	23.2	12.70	7.1	2.54	0.045	0.522	481	5.86	7.59	267	30	7.7	71,8	98,00	230	20	
Controle	31	f	52	71	77	90	42	41	53	70	7.2	1.8	6.61	10.90	36.4	21.1	5.62	1.48	0.138	0.077	430	9.13	7.50	150	31	2.4	98,2	98,00	238	38	
Controle	36	f	51	77	72	72	50	46	51	82	7.2	1.0	4.86	8.74	27.3	15.1	2.83	1.6	0.49	0.106	0.027	323	7.61	7.56	211	32	6.6	48,5	92,00	132	130
Controle	41	m	48	73	106	79	45	86	50	72	6.5	1.0	5.44	9.63	30.4	17.9	2.21	15.0	0.58	0.083	0.031	702	5.85	7.51	160	34	4.3	48,0	98,00	248	20
Controle	44	m	50	91	89	87	69	59	63	81	6.9	2.0	4.78	8.23	26.7	12.4	2.66	8.9	0.61	0.066	0.124	268	7.25	7.60	203	25	4.7	83,4	98,00	113	20
CEC	8	f	65	100	100	100	50	50	50	105	5.0	3.0	5.10	8.37	26.7	15.2	4.84	9.1	1.11	0.160	0.061	443	8.22	7.54	272	29	2.9	43,0	93,43	190	20
CEC	27	f	45	103	80	62	64	80	39	78	7.6	1.8	6.99	10.80	34.2	16.6	6.10	8.8	1.57	0.058	0.115	411	10.20	7.54	191	31	4.5	53,5	98,00	198	113
CEC	28	f	40	84	82	77	57	82	46	84	9.1	2.2	5.74	9.55	31.5	22.0	6.85	12.7	2.01	0.126	0.338	554	6.54	7.49	170	43	8.2	57,4	98,00	214	20
CEC	39	m	61	94	93	60	77	93	29	109	11.7	1.0	6.15	10.10	32.6	15.6	6.36	8.6	0.63	0.025	0.031	439	8.21	7.65	135	262	8.7	52,0	99,00	171	20
CEC	40	m	47	79	73	99	59	73	49	74	7.8	3.0	4.90	8.24	26.0	25.7	8.40	15.2	1.41	0.348	0.262	538	5.71	7.47	215	27	2.7	124,8	98,00	225	20
CEC	43	m	42	99	70	84	71	70	53	97	9.5	2.3	4.90	8.77	28.3	14.1	3.43	8.9	1.51	0.098	0.108	411	7.02	7.44	165	37	1.1	78,6	98,00	204	20
LIM	29	f	42	120	114	87	95	86	55	96	7.6	3.0	4.16	8.42	24.6	10.1	2.44	6.9	0.57	0.083	0.108	266	8.19	7.41	145	52	6.9	48,2	99,00	143	20
LIM	30	f	38	77	78	50	48	42	28	99	6.8	1.5	5.18	8.50	27.5	15.2	6.20	8.1	0.75	0.091	0.048	472	7.66	7.48	233	33	1.7	73,3	96,00	245	20
LIM	46	m	43	98	78	127	69	56	51	76	7.8	3.0	5.04	8.35	27.5	14.8	3.82	9.6	1.16	0.187	0.055	511	6.65	7.39	141	51	4.3	31,4	97,00	228	20
LIM	47	f	38	108	59	76	81	39	32	71	6.6	3.0	5.59	8.87	29.3	15.7	3.12	11.8	0.64	0.105	0.054	498	7.02	7.53	214	31	3.6	91,2	96,00	226	24
LIM	48	f	39	73	100	68	50	50	49	66	5.1	1.0	7.86	9.49	31.6	28.7	13.00	12.3	2.93	0.113	0.271	623	7.86	7.37	128	32	-6,0	121,5	92,00	239	51
LIM	49	m	36	81	61	82	47	36	27	65	7.2	1.6	5.22	9.27	30.1	13.0	3.74	8.4	0.68	0.121	0.087	399	7.28	7.39	151	31	-4,9	113,4	98,00	216	20

Tabela 3 - Dados relativos ao M2.

Grupos	Animais	Sexo	peso	PAM2	FCM2	VVM2	VCM2	HbM2	HtM2	leucM2	neutM2	linTm2	monM2	eosinM2	basM2	plaqM2	VPMM2	pHM2	pO2M2	pCO2M2	BEM2	IL6M2	DNAM2
Anestesia	32	f	31	76/54	88		5,23	9,38	30,8	24,8	7,76	15,1	1,62	0,138	0,116	608	7,62	7,403	112	45	2,5		28,9
Anestesia	34	f	39	78/53	97		5,44	9,72	31,4	24,0	10,80	11,2	1,71	0,130	0,179	447	7,49	7,389	122	48	2,9		62,1
Anestesia	45	f	41	86/67	94		4,85	8,56	27,9	14,0	6,45	6,3	1,00	0,106	0,690	305	5,88	7,594	101	24	3,1		12,4
Anestesia	51	f	45	113/79	108		4,82	8,22	26,3	14,8	9,32	4,1	1,29	0,035	0,038	401	6,70	7,561	101	32	6,6		101,9
Anestesia	52	f	35	104/65	96		4,67	7,72	24,9	13,5	10,00	2,2	0,98	0,008	0,238	367	6,08	7,515	104	35	5,3		87,0
Anestesia	53	m	43	100/78	73		5,41	8,90	28,6	17,3	13,30	2,1	1,62	0,008	0,260	502	6,64	7,439	111	36	4,2		98,1
Controle	10	f	38	100/58	92	5,8	4,74	8,70	27,3	14,4	9,38	3,8	0,97	0,024	0,212	433	7,65	7,473	203	34	-2,2		49,0
Controle	18	f	34	74/40	61	7,6	4,57	8,64	27,4	25,2	13,00	8,7	3,05	0,079	0,328	512	5,01	7,605	173	28	7,0		69,0
Controle	31	f	52	77/41	96	7,5	5,67	9,44	30,6	21,3	14,20	6,8	0,28	0,026	0,003	377	8,04	7,537	151	29	3,3		68,2
Controle	36	f	51	72/46	95	6,9	5,06	9,07	28,1	17,7	8,28	8,4	0,89	0,070	0,094	320	9,94	7,544	104	33	6,3	48,723	38,8
Controle	41	m	48	106/86	98	6,5	5,38	9,32	29,8	20,3	2,33	17,5	0,24	0,140	0,032	631	5,30	7,469	147	32	0,6		56,2
Controle	44	m	50	89/59	71	6,9	3,89	6,81	21,5	11,9	2,60	8,8	0,46	0,034	0,077	217	6,95	7,462	184	41	5,0		88,3
CEC	8	f	65	100/50	105	5,0	4,53	7,49	23,8	12,7	9,35	2,7	0,60	0,052	0,040	267	9,01	7,475	165	44	0,0		184,2
CEC	27	f	45	80/64	83	6,7	6,76	10,20	33,2	25,0	11,30	11,2	2,32	0,110	0,084	402	10,60	7,456	195	32	-0,5		144,2
CEC	28	f	40	82/67	56	9,1	5,23	8,63	28,5	18,7	5,16	12,4	1,03	0,021	0,085	508	7,38	7,507	162	37	6,4		52,9
CEC	39	m	61	93/70	104	11,4	5,72	9,37	30,1	11,4	5,60	4,6	0,95	0,213	0,099	354	7,31	7,396	96	38	-1,4		77,0
CEC	40	m	47	73/64	78	7,2	6,24	8,00	25,5	23,0	8,48	13,1	1,06	0,232	0,123	520	6,24	7,545	237	27	2,4		138,3
CEC	43	m	42	70/37	82	10,2	3,93	7,08	22,3	16,2	5,83	9,3	0,85	0,086	0,179	322	6,54	7,556	195	27	2,8		83,8
LIM	29	f	42	114/86	96	7,6	4,52	8,19	26,5	18,6	6,19	11,2	1,00	0,058	0,143	301	9,64	7,480	130	32	1,1		69,8
LIM	30	f	38	78/42	81	6,6	3,96	6,33	20,9	13,4	8,51	4,4	0,32	0,110	0,023	291	7,40	7,472	327	33	1,8		80,6
LIM	46	m	43	78/56	79	7,8	5,51	9,22	30,0	16,4	3,90	11,4	1,01	0,028	0,052	427	6,16	7,593	163	26	1,7		36,1
LIM	47	f	38	59/39	80	6,5	4,28	6,71	22,0	9,0	1,72	6,9	0,29	0,052	0,016	393	6,37	7,581	162	24	2,8		63,9
LIM	48	f	39	100/50	70	6,8	5,02	8,58	29,7	39,8	19,00	17,3	3,11	0,047	0,370	506	7,75	7,477	297	19	-7,1		193,5
LIM	49	m	36	61/36	98	5,4	5,63	10,10	32,4	22,7	7,96	13,7	0,71	0,034	0,260	345	6,67	7,366	196	38	-3,0		144,8

Tabela 4 - Dados relativos ao M3.

Grupos	Animais	Sexo	peso	PAM3	FCM3	VCMM3	HbM3	HtM3	leucM3	neutrM3	linfM3	monoM3	DNAM3	pHM3	pO2M3	pCO2M3	BEM3	IL6M3	plaqM3	VPMM3
Anestesia	32	f	31	72/50	92	5,17	9,43	30,3	29,7	18,7	7,71	2,85	49,3	7,412	98	46	1,8		575	7,9
Anestesia	34	f	39	74/49	86	5,87	10,00	34,1	36,8	17,3	16,40	2,73	62,3	7,397	100	43	5,0		515	7,3
Anestesia	45	f	41	96/65	96	4,82	8,69	27,8	14,2	8,9	2,50	1,57	19,7	7,594	101	24	3,1		305	6,6
Anestesia	51	f	45	134/95	108	4,83	8,09	26,1	14,8	8,1	4,30	1,51	95,4	7,538	100	32	5,2		369	7,1
Anestesia	52	f	35	90/56	104	4,43	7,37	23,6	17,6	13,6	2,40	1,19	87,3	7,521	104	35	5,6		365	6,3
Anestesia	53	m	43	98/76	84	5,06	8,23	26,7	14,7	12,4	0,82	1,12	98,1	7,495	111	34	3,7		348	5,8
Controle	10	f	38	50/30	89	5,69	10,00	31,9	17,6	12,5	2,34	2,28	66,0	7,453	215	34	-2,4		454	9,0
Controle	18	f	34	83/41	56	3,67	6,99	22,2	17,5	9,2	6,65	1,38	37,2	7,563	264	28	4,3		456	5,3
Controle	31	f	52	72/44	134	5,32	8,82	28,9	22,1	18,2	1,55	2,10	62,4	7,519	160	28	1,3		337	7,6
Controle	36	f	51	76/49	105	5,12	9,12	28,6	14,7	10,5	3,22	0,89	108,6	7,551	102	33	7,0	87,5947	312	7,7
Controle	41	m	48	106/86	97	5,31	9,14	29,2	18,8	5,2	12,60	0,85	58,3	7,505	151	32	2,9		577	5,2
Controle	44	m	50	97/61	77	3,76	6,61	20,8	9,8	5,0	4,16	0,48	88,7	7,440	176	43	4,2		186	6,6
CEC	8	f	65			3,30	4,79	15,8	8,7	6,4	1,68	0,60	235,2	7,499	164	32	2,4		267	9,0
CEC	27	f	45			4,87	7,44	23,7	16,6	9,5	5,70	1,34	105,4	7,563	299	23	0,7		259	7,1
CEC	28	f	40			3,11	5,28	16,9	9,8	5,5	3,58	0,61	137,0	7,532	276	26	0,6		259	7,5
CEC	39	m	61			3,65	6,14	19,3	17,7	13,1	3,18	1,14	141,0	7,542	229	34	7,0		196	7,1
CEC	40	m	47			2,34	3,88	12,7	10,9	5,7	4,54	0,61	111,0	7,397	104	31	-4,7		180	6,3
CEC	43	m	42			2,92	5,27	16,9	10,7	7,5	2,11	1,10	360,9	7,490	217	23	-3,8		411	7,0
LIM	29	f	42			2,94	5,36	17,5	3,2	1,6	1,45	0,07	197,7	7,403	280	33	-3,1		80	6,9
LIM	30	f	38			2,41	3,86	12,8	10,0	7,7	1,03	1,24	159,5	7,472	163	29	2,4		269	6,3
LIM	46	m	43			2,93	4,87	16,0	11,3	8,6	2,13	0,45	96,1	7,498	147	27	1,5		305	6,6
LIM	47	f	38			2,60	4,21	13,6	11,5	7,9	2,84	0,66	73,7	7,554	125	17	4,3		261	6,9
LIM	48	f	39			2,57	4,54	15,2	20,4	15,0	3,42	1,71	230,3	7,513	138	25	-3,3		280	8,0
LIM	49	m	36			6,82	5,29	16,5	17,9	14,2	2,35	1,14	139,4	7,424	149	24	-6,9		190	7,6

Tabela 5 - Dados relativos ao M4.

Grupos	Animais	Sexo	peso	PAM4	FC	VV	VCM	HbM4	HtM4	leuc	neut	linf	mon	eosM4	basM4	plaq	VPM	pHM4	pO2	pCO2	BE	IL6M4	DNA	diurM4	cor	cér	figM4	pullM4	baco	rim	musc	
																																M4
Anestesia	32	f	1	72/48	92	5,17	9,17	30,1	36,3	26	7,1	2,69	0,025	0,565	590	8,54	7,401	99	43	1,3	49,1242	64,1	800	8	1,6	127,6	347,7	412,2	76	2,3		
Anestesia	34	f	39	75/50	89	5,96	10,30	34,8	33,2	22	7,0	3,22	0,010	0,856	551	8,30	7,397	98	42	5,5	20,0000	73,4	700	7	2,0	138,4	160,2	891,4	63	1,6		
Anestesia	45	f	41	99/68	97	4,87	8,63	28,1	15,5	7	5,8	1,79	0,061	0,161	305	6,61	7,516	102	32	3,7	20,0000	16,5	1.000	12	3,9	318,9	380,3	214,1	12	1,5		
Anestesia	51	f	45	134/95	108	4,50	7,68	24,5	15,4	10	4,0	1,38	0,009	0,128	369	7,05	7,576	100	28	5,5	82,6000	89,7	500	12	2,1	143,0	380,2	337,7	76	2,1		
Anestesia	52	f	35	90/57	98	4,45	7,44	23,8	17,2	14	2,2	1,18	0,008	0,160	365	6,34	7,513	101	35	5,6	20,0000	162,5	600	12	4,3	103,4	50,2	118,1	88	3,9		
Anestesia	53	m	43	89/73	76	4,77	7,79	25,3	14,2	11	1,5	1,16	0,002	0,226	348	5,80	7,499	102	35	4,3	20,0000	223,8	400	7	1,4	236,0	553,9	329,6	176	1,7		
Controle	10	f	38	87/47	89	6,8	5,69	10,00	31,9	17,6	13	2,3	2,28	0,038	0,410	384	6,66	7,470	166	26	-1,8	33,0623	62,4	500	55	3,1	210,8	67,3	356,8	32	1,4	
Controle	18	f	34	81/39	56	7,3	2,43	4,41	13,8	9,0	6	1,8	0,68	0,012	0,063	140	8,13	7,500	264	31	4,3	30,3853	56,3	550	23	1,8	92,7	356,1	263,7	53	5,6	
Controle	31	f	52	90/53	132	7,8	5,66	9,61	30,9	24,4	18	5,3	1,42	0,004	0,089	349	8,24	7,509	146	24	-1,8	67,8632	53,3	700	13	0,4	112,7	175,6	526,7	47	1,0	
Controle	36	f	51	72/51	120	7,4	5,10	8,95	28,5	15,0	11	2,6	0,97	0,009	0,088	310	6,95	7,546	102	31	5,1	99,4310	125,8	600	16	1,9	202,1	252,0	752,4	102	1,1	
Controle	41	m	48	79/50	82	6,5	5,17	9,04	28,6	14,6	6	7,3	0,80	0,073	0,098	577	5,20	7,486	115	31	1,0	20,0000	56,1	500	8	2,0	139,3	229,4	617,8	82	2,8	
Controle	44	m	50	87/53	80	6,8	3,68	6,29	20,3	9,3	5	3,5	0,59	0,009	0,132	186	6,57	7,440	176	43	4,2	20,0000	84,2	500	48	1,0	163,7	118,4	328,0	91	1,6	
CEC	8	f	65	100/50	105	5,0	2,33	6,51	12,5	15,0	13	0,8	0,89	0,009	0,061	137	10,00	7,410	138	37	-4,0	128,0950	447,9	500	16	3,9	217,4	173,4	237,0	33	0,9	
CEC	27	f	45	62/39	66	5,6	4,06	6,19	19,9	10,7	5	4,8	0,54	0,035	0,063	111	7,26	7,387	98	31	-5,1	95,9715	61,1	800	31	3,3	102,0	538,7	666,1	25	1,4	
CEC	28	f	40	77/46	73	8,7	3,10	5,27	16,9	14,1	8	5,0	0,82	0,010	0,106	245	7,32	7,496	156	35	4,3	20,0000	74,8	650	49	1,5	77,7	247,7	751,7	27	3,0	
CEC	39	m	61	60/29	72	9,8	4,23	7,04	22,7	20,0	13	5,7	1,07	0,221	0,185	222	6,56	7,347	125	34	-6,2	94,6331	253,0	700	31	1,7	119,4	221,5	611,0	66	1,2	
CEC	40	m	47	99/49	187	7,5	3,48	5,78	19,1	16,5	8	8,1	0,69	0,041	0,076	229	6,38	7,255	172	27	14,2	34,4000	347,3	600	12	1,1	164,0	382,6	375,6	56	1,8	
CEC	43	m	42	84/53	118	9,8	2,52	4,54	14,6	9,1	5	2,7	0,98	0,006	0,132	230	6,52	7,465	198	25	-4,0	61,1707	220,4	700	43	2,9	197,4	167,4	533,3	57	0,8	
LIM	29	f	42	87/55	94	7,3	3,46	6,31	20,9	6,1	3	2,9	0,10	0,022	0,017	80	6,87	7,324	89	29	-9,8	20,0000	189,0	500	3	6,7	183,5	218,4	208,9	54	1,5	
LIM	30	f	38	50/28	98	5,8	2,90	4,70	15,7	12,9	9	2,5	0,89	0,075	0,140	185	8,67	7,472	327	33	1,0	75,8940	339,7	800	8	1,9	142,0	222,1	93,9	57	1,5	
LIM	46	m	43	127/51	103	6,5	3,04	5,08	16,7	8,6	6	1,8	0,67	0,001	0,056	305	6,62	7,461	131	24	-5,0	20,0000	98,4	1.800	45	1,8	123,8	235,7	616,9	63	2,4	
LIM	47	f	38	76/32	107	6,4	3,18	5,06	17,0	8,6	4	4,2	0,37	0,026	0,045	261	6,88	7,566	62	9	11,3	23,6928	76,9	700	131	2,7	198,0	461,0	550,1	91	2,3	
LIM	48	f	39	68/49	105	5,2	2,93	5,16	18,1	23,2	11	9,8	2,36	0,057	0,068	280	8,02	7,435	247	21	-8,7	86,6020	522,3	500	22	2 ⁶ ₅	187,2	247,8	542,1	98	3,4	
LIM	49	m	36	82/27	120	5,4	2,24	4,24	13,1	12,7	9	2,6	0,97	0,017	0,184	190	7,57	7,184	186	38	13,8	31,7238	138,4	700	31	6,7	181,9	217,3	777,2	66	1,6	

Tabela 6 – VHS.

Grupo	Média	DP	n
Anestesia	2.567	1.0614	6
Controle	1.800	.7483	6
CEC	2.217	.7600	6
LIM	2.183	.9174	6
Total	2.192	.8672	24

Tabela 7 – Peso.

Grupo	n	Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo
Anestesia	6	38.92	5.103	40.00	31	45
Controle	6	45.42	7.553	48.75	34	52
CEC	6	49.82	10.395	45.75	40	65
LIM	6	39.25	2.788	38.50	36	43
Total	24	43.35	8.049	42.20	31	65

Tabela 8 – Sexo.

		Grupo				Total
		Anestesia	Controle	CEC	LIM	
Sexo	f	5	4	3	4	16
	m	1	2	3	2	8
Total		6	6	6	6	24

Tabela 9 – Diurese.

	n	Média	DP	Erro padrão	95% Intervalo de confiança da média		Mínimo	Máximo
					Limite inferior	Limite superior		
Anestesia	6	666.67	216.025	88.192	439.96	893.37	400	1000
Controle	6	558.33	80.104	32.702	474.27	642.40	500	700
CEC	6	658.33	102.062	41.667	551.23	765.44	500	800
LIM	6	833.33	488.535	199.444	320.65	1346.02	500	1800
Total	24	679.17	275.411	56.218	562.87	795.46	400	1800

Tabela 10 - Resumo porcentagem de neutrófilos no concentrado.

Grupo	Mediana (Md)	Média	DP	n	Test Kruskal-Wallis
Anestesia	98,00	97.5000	.83666	6	p = 0,565
Controle	98,00	97.0000	2.44949	6	
CEC	98,00	97.4050	1.98800	6	
LIM	96,50	96.3333	2.42212	6	
Total		97.0596	1.95225	24	

Tabela 11 - Resumo número de granulócitos no concentrado.

Grupo	Média	DP	n	Test Kruskal-Waliis
Anestesia	329.0000	118.93696	6	p = 0,870
Controle	284.5000	96.99227	6	
CEC	303.1667	166.54419	6	
LIM	355.2000	114.57618	5	
Total	316.3478	121.46814	23	

Tabela 12 - Resumo da radiação total no concentrado.

Grupo	Mean	Std. Deviation	n	Test Kruskal-Waliis
Anestesia	207.38	26.628	6	p = 0,4920
Controle	173.82	72.956	6	
CEC	200.27	19.025	6	
LIM	216.03	37.276	6	
Total	199.38	44.178	24	

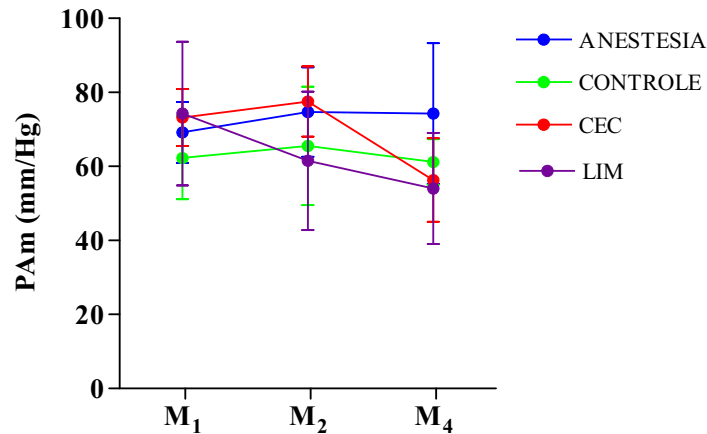


Figura 1 - Diagrama de perfil das médias da PAm segundo os momentos M1, M2 e M4, para os grupos anestesia, controle, CEC e LIM.

Tabela 13 - Resumo das médias da PAm, segundo o grupo, nos momentos M1, M2 e M4.

Grupo	Medidas repetidas	Média	DP	n
Anestesia	PAm_1	69,2	8,2	6
Controle		62,3	11,2	6
CEC		73,2	7,7	6
LIM		74,3	19,4	6
Total		69,8	12,7	24
Anestesia	PAm_2	74,7	12,1	6
Controle		65,5	16,0	6
CEC		77,5	9,5	6
LIM		61,5	18,7	6
Total		69,8	15,1	24
Anestesia	PAm_4	74,3	19,0	6
Controle		61,2	6,2	6
CEC		56,3	11,3	6
LIM		54,0	15,0	6
Total		61,5	15,1	24

Tabela 13a - Médias marginais dos grupos e da PAm do experimento.

Grupos	Média	EP	IC95%	
			LI	LS
Anestesia	72.722	4.001	64.376	81.069
Controle	63.000	4.001	54.653	71.347
CEC	69.000	4.001	60.653	77.347
CEC+LIM	63.278	4.001	54.931	71.624
Momentos				
M1	69.750	2.564	64.401	75.099
M2	69.792	2.968	63.601	75.982
M4	61.458	2.796	55.625	67.291

Tabela 13b - PAm: PAm: hipóteses testadas, estatísticas calculadas e comentários.

Hipótese	Estatística	Comentário
Interação entre momentos e grupos	F=2,280; p=0,110	Não existe interação significativa entre os momentos e os tratamentos. Os perfis dos grupos são similares.
Fator independente (grupos)	F=1,387; p=0,276	As médias marginais dos grupos não apresentaram diferenças significativas: G1=G2=G3=G4
Fator de medidas repetidas (momentos)	F= 4,115; p=0,056	As médias marginais dos momentos não apresentaram diferenças significativas: M1=M2=M4
Efeito do momento em cada grupo	G1: F=0,298; p=0,747 G2: F=0,215; p=0,809 G3: F _(Welch) =6,249; p=0,018 G4: F=1,996; P=0,170	As médias dos momentos em cada grupo não apresentaram diferenças significativas: M1=M2=M4 M1=M2=M4 M1=M2=M4 M1=M2=M4
Efeito de grupo em cada momento	M1: F=1,116; p=0,366 M2: F=1,612; p=0,218 M4: F=2,640; p=0,77	As médias dos grupos dentro dos momentos não apresentaram diferenças significativas: G1=G2=G3=G4 G1=G2=G3=G4 G1=G2=G3=G4

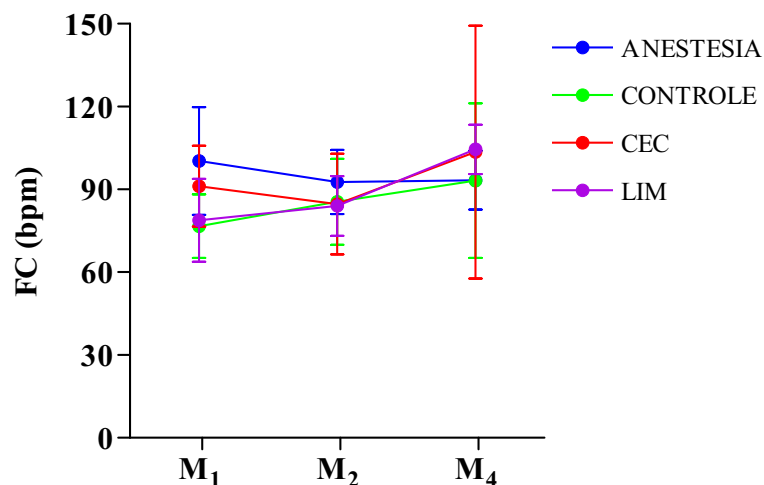


Figura 2 - Diagrama de perfil das médias da FC, segundo os momentos: M1, M2 e M4, para os grupos anestesia, controle, CEC, CEC+LIM.

Tabela 14 - Resumo das médias da FC, segundo o grupo, nos momentos M1, M2 e M4.

Medidas repetidas	Grupo	Média	DP	n
FCM1	Anestesia	100.33	19.459	6
	Controle	76.67	11.483	6
	CEC	91.17	14.580	6
	LIM	78.83	15.012	6
	Total	86.75	17.386	24
FCM2	Anestesia	92.67	11.622	6
	Controle	85.50	15.553	6
	CEC	84.67	18.239	6
	LIM	84.00	10.826	6
	Total	86.71	13.870	24
FCM4	Anestesia	93.33	10.690	6
	Controle	93.17	28.017	6
	CEC	103.50	45.855	6
	LIM	104.50	8.961	6
	Total	98.63	26.464	24

Tabela 14a - Médias marginais dos grupos e da FC do experimento.

Grupos	Média	EP	IC95%	
			LI	LS
Anestesia	95.444	5.490	83.992	106.897
Controle	85.111	5.490	73.658	96.564
CEC	93.111	5.490	81.658	104.564
CEC+LIM	89.111	5.490	77.658	100.564
Momentos				
M1	86.750	3.143	80.193	93.307
M2	86.708	2.935	80.587	92.830
M4	98.625	5.666	86.805	110.445

Tabela 14b - FC: hipóteses testadas, estatísticas calculadas e comentários.

Hipótese	Estatística	Comentário
Interação entre momentos e grupos	F=1,032; p=0,419	Não existe interação significativa entre os momentos e os tratamentos. Os perfis dos grupos são similares.
Fator independente (grupos)	F=0,687; p=0,571	As médias marginais dos grupos não apresentaram diferenças significativas: G1=G2=G3=G4
Fator de medidas repetidas (momentos)	F= 3,370; p=0,044	As médias marginais dos momentos não apresentaram diferenças significativas: M1=M2=M4
Efeito do momento em cada grupo	G1: F=0,411; p=0,670 G2: F=1,059; p=0,371 G3: F=0,622; p=0,550 G4: F=7,844; P=0,000	As médias dos momentos dentro dos grupos apresentaram diferenças significativas para o G4. M1=M2=M4 M1=M2=M4 M1=M2=M4 (M1=M2)<M4
Efeito de grupo em cada momento	M1: F=3,107; p=0,050 M2: F=0,469; p=0,707 M4: F=0,301; p=0,824	As médias dos grupos dentro dos momentos não apresentaram diferenças significativas: G1=G2=G3=G4 G1=G2=G3=G4 G1=G2=G3=G4

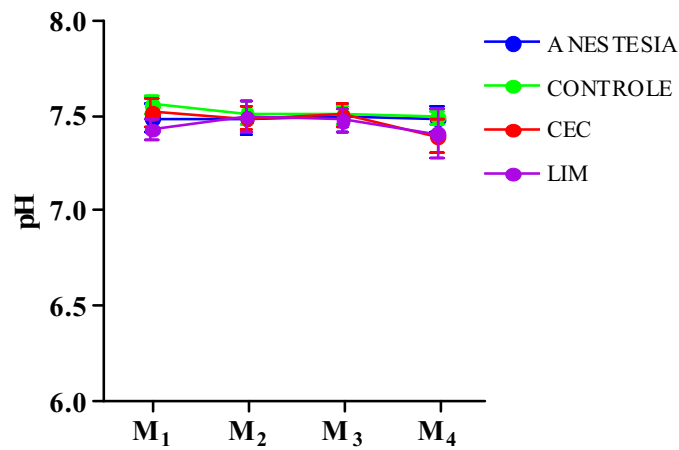


Figura 3 - Diagrama de perfil das médias de pH, segundo os momentos M1, M2, M3 e M4, para os grupos anestesia, controle, CEC e LIM.

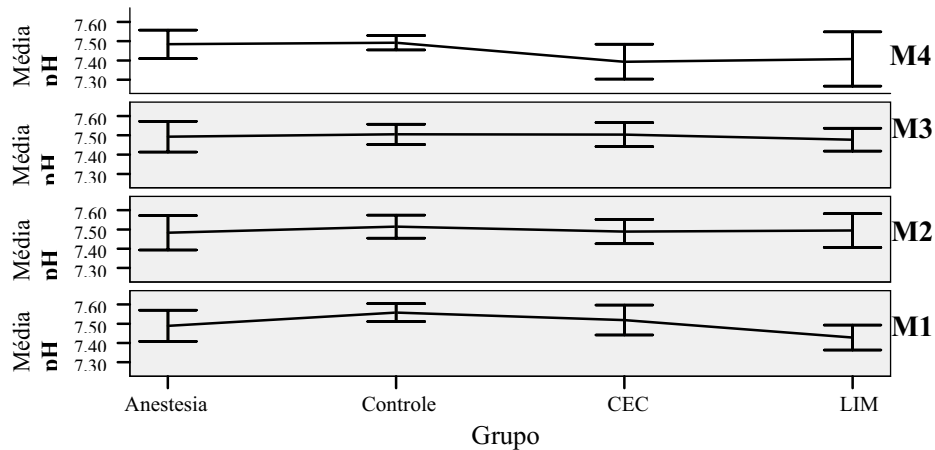


Figura 4 - Diagrama das médias do pH, segundo os grupos anestesia, controle, CEC, CEC+LIM, nos momentos M1, M2, M3 e M4.

Tabela 15 - Resumo das médias do pH, segundo o grupo, nos momentos M1, M2 e M4.

Medidas repetidas	Grupo	Média	DP	n
pH M1	Anestesia	7,489	0,077	6
	Controle	7,558	0,044	6
	CEC	7,520	0,074	6
	LIM	7,429	0,061	6
	Total	7,499	0,078	24
pH M2	Anestesia	7,484	0,086	6
	Controle	7,515	0,057	6
	CEC	7,489	0,060	6
	LIM	7,495	0,083	6
	Total	7,496	0,069	24
pH M3	Anestesia	7,493	0,076	6
	Controle	7,505	0,050	6
	CEC	7,504	0,059	6
	LIM	7,477	0,057	6
	Total	7,495	0,058	24
pH M4	Anestesia	7,484	0,071	6
	Controle	7,492	0,036	6
	CEC	7,393	0,086	6
	LIM	7,407	0,134	6
	Total	7,444	0,094	24

Tabela 15a. Resumo das médias do pH, EP, segundo o grupo, nos momentos M1, M2 e M4.

Grupo	momentos	Média	EP	IC95% - LI	IC95% - LS
Anestesia	1	7.489	.027	7.433	7.545
	2	7.484	.030	7.422	7.545
	3	7.493	.025	7.441	7.545
	4	7.484	.036	7.408	7.560
Controle	1	7.558	.027	7.502	7.614
	2	7.515	.030	7.453	7.577
	3	7.505	.025	7.453	7.557
	4	7.492	.036	7.416	7.568
CEC	1	7.520	.027	7.464	7.575
	2	7.489	.030	7.427	7.551
	3	7.504	.025	7.452	7.556
	4	7.393	.036	7.317	7.469
LIM	1	7.429	.027	7.373	7.484
	2	7.495	.030	7.433	7.557
	3	7.477	.025	7.425	7.529
	4	7.407	.036	7.331	7.483

Tabela 15b - pH: hipóteses testadas, estatísticas calculadas e comentários.

Hipótese	Estatística	Comentário
Interação entre momentos e grupos	F=2,051; p=0,139	Não existe interação significativa entre os momentos e os tratamentos. Os perfis dos grupos são similares.
Fator independente (grupos)	F=1,415; p=0,268	As médias marginais dos grupos não apresentaram diferenças significativas: G1=G2=G3=G4
Fator de medidas repetidas (momentos)	F=5,700; p=0,027	As médias marginais dos momentos não apresentaram diferenças significativas: M1=M2=M4
Efeito do momento em cada grupo	G1: F=0,021; p=0,996 G2: F=2,168; p=0,124 G3: F=3,865; p=0,025 G4: F=1,269; P=0,312	As médias dos momentos em cada grupo não apresentaram diferenças significativas: M1=M2=M3=M4 M1=M2=M3=M4 M1=M2=M3=M4 M1=M2=M3=M4
Efeito de grupo em cada momento	M1: F=4,151; p=0,019 M2: F=0,214; p=0,885 M3: F=0,267; p=0,849 M4: F=1,967; p=0,152	As médias dos grupos dentro dos momentos não apresentaram diferenças significativas: G1=G2=G3=G4 G1=G2=G3=G4 G1=G2=G3=G4 G1=G2=G3=G4

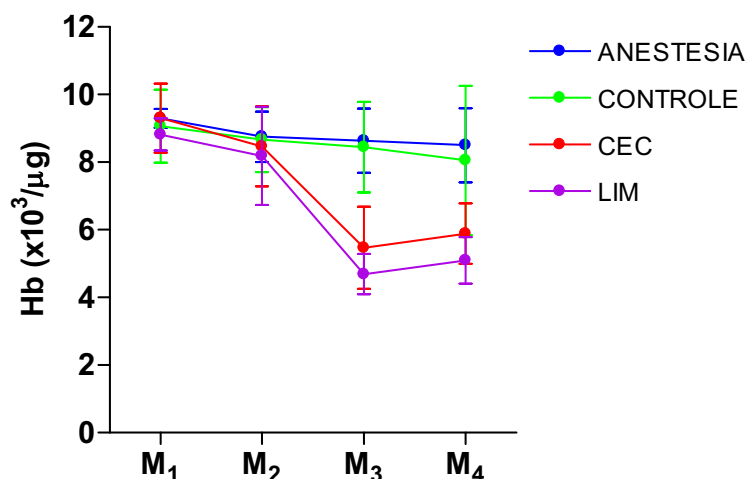


Figura 5 - Diagrama de perfil das médias de Hb, segundo os momentos M1, M2, M3 e M4, para os grupos anestesia, controle, CEC e LIM

Tabela 16 - Resumo das médias da Hb, segundo o grupo, nos momentos: M1, M2, M3 e grupo M4.

	Grupo	Média	DP	n
Hb M1	Anestesia	9.2967	.28048	6
	Controle	9.0617	1.07828	6
	CEC	9.3050	1.02193	6
	LIM	8.8167	.47689	6
	Total	9.1200	.76700	24
Hb M2	Anestesia	8.7500	.74003	6
	Controle	8.6633	.96297	6
	CEC	8.4617	1.17826	6
	LIM	8.1883	1.44990	6
	Total	8.5158	1.06215	24
Hb M3	Anestesia	8.6350	.95494	6
	Controle	8.4467	1.34026	6
	CEC	5.4667	1.21625	6
	LIM	4.6883	.59717	6
	Total	6.8092	2.04952	24
Hb M4	Anestesia	8.5017	1.09598	6
	Controle	8.0500	2.20787	6
	CEC	5.8883	.89620	6
	LIM	5.0917	.68831	6
	Total	6.8829	1.93194	24

Tabela 16a – Hb.

	Momentos	Média	EP	IC95%-LI	IC95%-LS
Anestesia	1	9.297	.324	8.622	9.972
	2	8.750	.455	7.801	9.699
	3	8.635	.435	7.727	9.543
	4	8.502	.554	7.347	9.656
Controle	1	9.062	.324	8.387	9.737
	2	8.663	.455	7.715	9.612
	3	8.447	.435	7.539	9.354
	4	8.050	.554	6.895	9.205
CEC	1	9.305	.324	8.630	9.980
	2	8.462	.455	7.513	9.410
	3	5.467	.435	4.559	6.374
	4	5.888	.554	4.734	7.043
LIM	1	8.817	.324	8.142	9.492
	2	8.188	.455	7.240	9.137
	3	4.688	.435	3.781	5.596
	4	5.092	.554	3.937	6.246

Tabela 16b - Hb: hipóteses testadas, estatísticas calculadas e comentários.

Hipótese	Estatística	Comentário
Interação entre momentos e grupos	F=10,276; p<0,01	Existe interação significativa entre os momentos e os tratamentos. Os perfis dos grupos não são similares.
Fator independente (grupos)	F=7,715; p<0,01	As médias marginais dos grupos apresentaram diferenças significativas: (G3=G4) < (G1=G2)
Fator de medidas repetidas (momentos)	F=58,022; p<0,01	As médias marginais dos momentos apresentaram diferenças significativas: (M3=M4) < (M1=M2)
Efeito do momento em cada grupo	G1: F=1,067; p = 0,385 G2: F=1,070; p = 0,211 G3: F=18,192; p < 0,01 G4: F=33,744; p < 0,01	As médias dos momentos apresentaram diferenças significativas para o G4: M1=M2=M3=M4 M1=M2=M3=M4 M3=M4 < M1=M2 M3=M4 < M2=M1
Efeito de grupo em cada momento	M1: F=0,512; p=0,679 M2: F=0,321; p=0,824 M3: F=21,681; p < 0,01 M4: F=8,900; p < 0,01	As médias dos grupos dentro dos momentos apresentaram diferenças significativas para os momentos M3 e M4: G1 = G2 = G3 = G4 G1 = G2 = G3 = G4 G4 = G3 ≤ G2 = G1 G4 = G3 ≤ G2 = G1

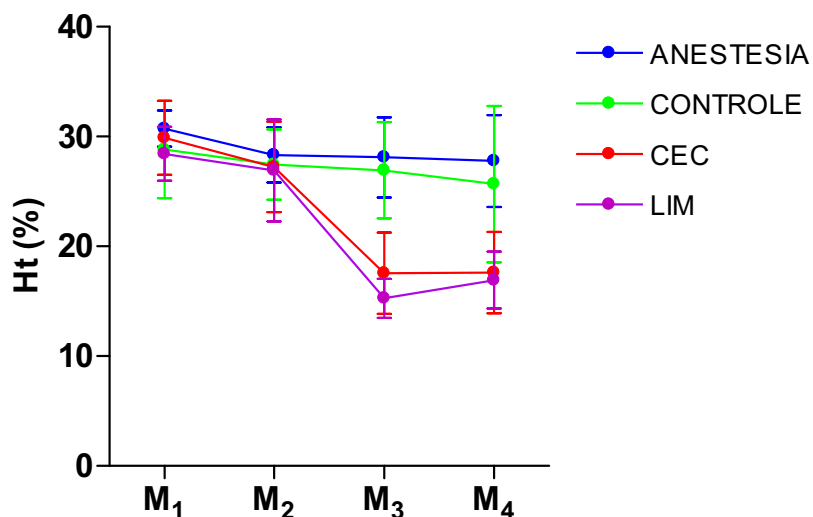


Figura 6 - Diagrama de perfil das médias de Ht, segundo os momentos M1, M2, M3 e M4, para os grupos anestesia, controle, CEC e LIM.

Tabela 17 - Resumo das médias da Ht, segundo o grupo, nos momentos: M1, M2, M3 e M4.

	Grupo	Média	DP	n
Ht M1	Anestesia	30.733	1.6573	6
	Controle	28.817	4.4350	6
	CEC	29.883	3.3570	6
	LIM	28.433	2.4492	6
	Total	29.467	3.0789	24
Ht M2	Anestesia	28.317	2.5167	6
	Controle	27.450	3.2030	6
	CEC	27.233	4.1123	6
	LIM	26.917	4.6447	6
	Total	27.479	3.5007	24
Ht M3	Anestesia	28.100	3.6644	6
	Controle	26.933	4.3926	6
	CEC	17.550	3.6963	6
	LIM	15.267	1.7840	6
	Total	21.963	6.6199	24
Ht M4	Anestesia	27.767	4.1836	6
	Controle	25.667	7.1062	6
	CEC	17.617	3.7161	6
	LIM	16.917	2.5833	6
	Total	21.992	6.5705	24

Tabela 17a - Ht.

Grupo	Momentos	Média	EP	IC95%-LI	IC95%-LS
Anestesia	1	30.733	1.286	28.051	33.416
	2	28.317	1.515	25.157	31.477
	3	28.100	1.437	25.102	31.098
	4	27.767	1.920	23.761	31.772
Controle	1	28.817	1.286	26.134	31.499
	2	27.450	1.515	24.290	30.610
	3	26.933	1.437	23.936	29.931
	4	25.667	1.920	21.661	29.672
CEC	1	29.883	1.286	27.201	32.566
	2	27.233	1.515	24.073	30.393
	3	17.550	1.437	14.552	20.548
	4	17.617	1.920	13.611	21.622
LIM	1	28.433	1.286	25.751	31.116
	2	26.917	1.515	23.757	30.077
	3	15.267	1.437	12.269	18.264
	4	16.917	1.920	12.911	20.922

Tabela 17b - Ht: hipóteses testadas, estatísticas calculadas e comentários.

Hipótese	Estatística	Comentário
Interação entre momentos e grupos	F=10,201; p<0,01	Existe interação significativa entre os momentos e os tratamentos. Os perfis dos grupos não são similares.
Fator independente (grupos)	F=6,465; p<0,01	As médias marginais dos grupos apresentaram diferenças significativas: (G1=G2) > (G3=G4)
Fator de medidas repetidas (momentos)	F=57,178; p<0,01	As médias marginais dos momentos apresentaram diferenças significativas: (M1=M2) > (M3=M4)
Efeito do momento em cada grupo	G1: F=1,102; p=0,372 G2: F=0,409; p=0,748 G3: F=17,820; p < 0,01 G4: F=29,215; p < 0,01	As médias dos momentos em cada grupo não apresentaram diferenças significativas: M1=M2=M3=M4 M1=M2=M3=M4 M3 = M4 < M2 = M1 M3 = M4 < M2 = M1
Efeito de grupo em cada momento	M1: F=0,512; p=0,679 M2: F=0,154; p=0,924 M3: F=20,446; p < 0,01 M4: F=8,295; p < 0,01	As médias dos grupos dentro dos momentos não apresentaram diferenças significativas: G1 = G2 = G3 = G4 G1 = G2 = G3 = G4 G4 ≤ G3 ≤ G2 = G1 G4 ≤ G3 ≤ G2 = G1

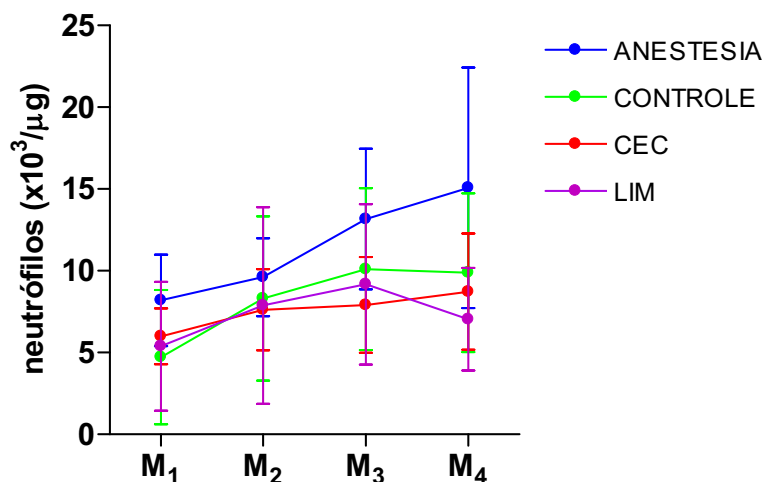


Figura 7 - Diagrama de perfil das médias de neutrófilos, segundo os momentos M1, M2, M3 e M4, para os grupos anestesia, controle, CEC e LIM.

Tabela 18 - Resumo das médias dos neutrófilos, segundo o grupo, nos momentos M1, M2, M3 e M4.

	Grupo	Média	DP	n
Neutrófilos M1	Anestesia	8.1900	2.80944	6
	Controle	4.7283	4.10421	6
	CEC	5.9967	1.70719	6
	LIM	5.3867	3.93982	6
	Total	6.0754	3.33930	24
Neutrófilos M2	Anestesia	9.6050	2.39484	6
	Controle	8.2983	5.02390	6
	CEC	7.6200	2.47431	6
	LIM	7.8800	6.01165	6
	Total	8.3508	4.06562	24
Neutrófilos M3	Anestesia	13.163	4.3025	6
	Controle	10.103	4.9398	6
	CEC	7.915	2.9324	6
	LIM	9.173	4.9044	6
	Total	10.089	4.5105	24
Neutrófilos M4	Anestesia	15.07	7.356	6
	Controle	9.89	4.856	6
	CEC	8.73	3.558	6
	LIM	7.04	3.137	6
	Total	10.18	5.582	24

Tabela 18a - Neutrófilos.

Grupo	Momentos	Média	EP	IC95%-LI	IC95%-LS
Anestesia	1	8.190	1.341	5.392	10.988
	2	9.605	1.747	5.961	13.249
	3	13.163	1.774	9.462	16.865
	4	15.067	2.043	10.805	19.329
Controle	1	4.728	1.341	1.931	7.526
	2	8.298	1.747	4.654	11.942
	3	10.103	1.774	6.402	13.805
	4	9.888	2.043	5.626	14.150
CEC	1	5.997	1.341	3.199	8.794
	2	7.620	1.747	3.976	11.264
	3	7.915	1.774	4.214	11.616
	4	8.727	2.043	4.465	12.989
LIM	1	5.387	1.341	2.589	8.184
	2	7.880	1.747	4.236	11.524
	3	9.173	1.774	5.472	12.875
	4	7.037	2.043	2.775	11.299

Tabela 18b - Neutrófilos: hipóteses testadas, estatísticas calculadas e comentários.

Hipótese	Estatística	Comentário
Interação entre momentos e grupos	F=1,044; p=0,416	Não existe interação significativa entre os momentos e os tratamentos. Os perfis dos grupos são similares.
Fator independente (grupos)	F=2,059; p=0,138	As médias marginais dos grupos não apresentaram diferenças significativas: G1=G2=G3=G4
Fator de medidas repetidas (momentos)	F= 8,965; p<0,01	As médias marginais dos momentos apresentaram diferenças significativas: (M1) < (M2=M3=M4)
Efeito do momento em cada grupo	G1: F=2,786; p=0,067 G2: F=1,645; p=0,211 G3: F=1,039; p=0,397 G4: F=0,707; p=0,559	As médias dos momentos em cada grupo não apresentaram diferenças significativas: M1=M2=M3=M4 M1=M2=M3=M4 M1=M2=M3=M4 M1=M2=M3=M4
Efeito de grupo em cada momento	M1: F=1,254; p=0,317 M2: F=0,255; p=0,857 M3: F=1,590; p=0,223 M4: F=2,871; p=0,062	As médias dos grupos dentro dos momentos não apresentaram diferenças significativas: G1=G2=G3=G4 G1=G2=G3=G4 G1=G2=G3=G4 G1=G2=G3=G4

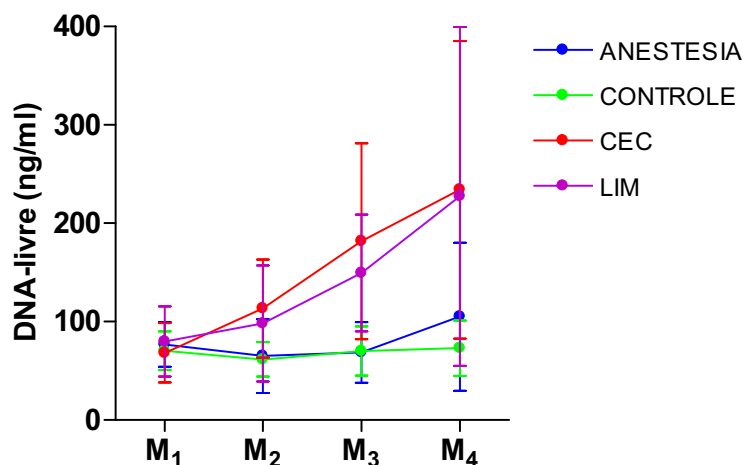


Figura 8 - Diagrama de perfil das médias de DNA, segundo os momentos M1, M2, M3 e M4, para os grupos anestesia, controle, CEC e LIM.

Tabela 19 – DNA.

Grupo	Momentos	Média	DP	IC95% - LI	IC95% - LS
Anestesia	1	76.767	11.339	53.115	100.419
	2	65.067	17.885	27.760	102.374
	3	68.683	24.995	16.545	120.821
	4	105.000	49.563	1.614	208.386
Controle	1	70.417	11.339	46.765	94.069
	2	61.583	17.885	24.276	98.890
	3	70.200	24.995	18.062	122.338
	4	73.017	49.563	-30.369	176.403
CEC	1	68.217	11.339	44.565	91.869
	2	113.400	17.885	76.093	150.707
	3	181.750	24.995	129.612	233.888
	4	234.083	49.563	130.697	337.469
LIM	1	79.833	11.339	56.181	103.485
	2	98.117	17.885	60.810	135.424
	3	149.450	24.995	97.312	201.588
	4	227.450	49.563	124.064	330.836

Tabela 19a - Resumo e comparações das medidas de DNA-livre, segundo os grupos, nos momentos M1, M2 e M4.

	Grupo	Mediana	Média	DP	n
DNA-livre M1	Anestesia	65,80	76.767	22.6913	6
	Controle	72,20	70.417	19.6469	6
	CEC	54,45	68.217	30.1394	6
	LIM	82,25	79.833	35.7244	6
	Total		73.808	26.3377	24
DNA-livre M2	Anestesia	74,55	65.067	37.4688	6
	Controle	62,20	61.583	17.4297	6
	CEC	111,05	113.400	49.8852	6
	LIM	75,20	98.117	58.9963	6
	Total		84.542	46.5901	24
DNA-livre M3	Anestesia	74,80	68.683	30.7946	6
	Controle	64,20	70.200	25.0036	6
	CEC	139,00	181.750	99.4481	6
	LIM	149,45	149.450	59.4156	6
	Total		117.521	76.2101	24
DNA-livre M4	Anestesia	81,55	105.000	75.0432	6
	Controle	59,35	73.017	28.2072	6
	CEC	236,700	234.083	151.2449	6
	LIM	163,70	227.450	172.1999	6
	Total		159.888	134.8990	24

Tabela 19b - Hipóteses testadas, estatísticas calculadas e comentários (DNA-livre).

Hipótese	Estatística	Comentário
Comparação de momentos	G1: $p = 0,458^1$	M1=M2=M3=M4
	G2: $p = 0,829^1$	M1=M2=M3=M4
	G3: $p = 0,021^1$	M1=M2=M3=M4
	G4: $p = 0,042^1$	M1=M2=M3=M4
Comparação de grupos	M1: $p = 0,829^2$	G1= G2=G3=G4
	M2: $p = 0,272^2$	G1= G2=G3=G4
	M3: $p < 0,01^2$	G1= G2 < G3=G4
	M4: $p < 0,01^2$	G1= G2 < G3=G4

¹ p-valor para o teste de Friedmann; ² p-valor para o teste de Kruskal-Wallis

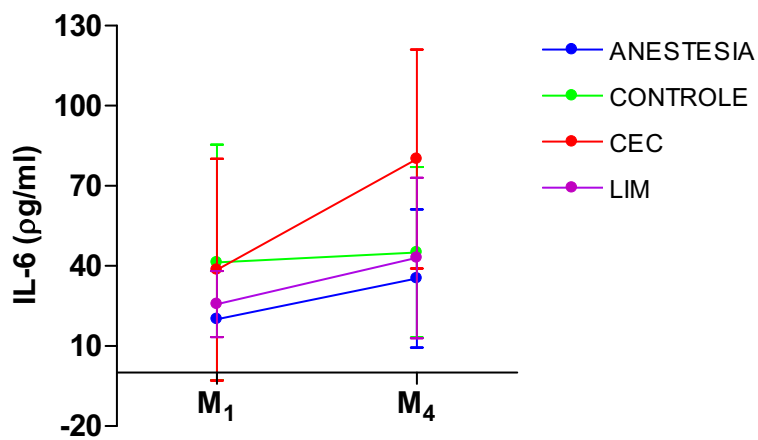


Figura 9 - Diagrama de perfil das médias da IL6, segundo os momentos M1 e M4, para os grupos anestesia, controle, CEC e LIM.

Tabela 20 - Interleucina-6.

	Grupo	Mediana (Md)	Média	DP	n
IL-6 M1	Anestesia	20,0	20,0	0,0	6
	Controle	20,0	41,3	44,1	6
	CEC	20,0	38,6	41,6	6
	LIM	20,0	25,7	12,4	6
	Total			31,1	29,6
IL-6 M4	Anestesia	20,0	35,3	25,9	6
	Controle	31,72	45,1	31,9	6
	CEC	77,90	80,0	41,0	6
	LIM	27,71	43,0	30,1	6
	Total			49,6	34,4

Tabela 20a - Hipóteses testadas, estatísticas calculadas e comentários (IL-6).

Hipótese	Estatística	Comentário
Comparação de momentos	$p = 0,500^1$	Ao longo do experimento não houve variação estatisticamente significativa da IL_6: M1=M4
Comparação de grupos	M1: $p = 0,476^2$	G1= G2=G3=G4
	M4: $p = 0,240^2$	G1= G2=G3=G4

¹ p-valor para o teste de Wilcoxon ; ² p-valor para o teste de Kruskal-Wallis

Tabela 21 - Média da quantidade de radiação presente nas biópsias dos seguintes órgãos: baço, cérebro, coração, fígado, músculo, pulmão e rim ao término do experimento, nos diferentes grupos.

Órgão	Grupo	n	Mediana	Média	DP	EP	IC95%-LI	IC95%-LS	Mínimo	Máximo	Kruskal-Wallis p-valor
Baço	Anestesia	6		383.845	269.4159	109.9886	101.110	666.580	118.1	891.4	0,698
	Controle	6	333,64	474.233	189.8631	77.5113	274.984	673.482	263.7	752.4	
M4	CEC	6	441,75	529.117	191.7966	78.3006	327.838	730.395	237.0	751.7	
	LIM	6	572,15	464.850	259.6271	105.9923	192.388	737.312	93.9	777.2	
	Total	24	546,10	463.011	221.5287	45.2194	369.468	556.555	93.9	891.4	
Cérebro	Anestesia	6	2,04	2.547	1.2356	.5044	1.250	3.843	1.4	4.3	0,195
	Controle	6	1,85	1.695	.9233	.3770	.726	2.664	.4	3.1	
M4	CEC	6	2,30	2.400	1.1225	.4583	1.222	3.578	1.1	3.9	
	LIM	6	4,70	7.717	9.4751	3.8682	-2.227	17.660	1.8	26.5	
	Total	24		3.590	5.1323	1.0476	1.422	5.757	.4	26.5	
Coração	Anestesia	6	9,75	9.55	2.582	1.054	6.84	12.26	7	12	0,059
	Controle	6	19,75	27.20	19.485	7.955	6.75	47.65	8	55	
M4	CEC	6	31,00	30.37	14.537	5.935	15.11	45.62	12	49	
	LIM	6	26,55	39.92	47.031	19.200	-9.44	89.27	3	131	
	Total	24		26.76	27.141	5.540	15.30	38.22	3	131	
Fígado	Anestesia	6	140,68	177.878	82.6042	33.7230	91.191	264.566	103.4	318.9	0,832
	Controle	6	151,50	153.550	47.5651	19.4184	103.633	203.467	92.7	210.8	
M4	CEC	6	141,70	146.317	55.4469	22.6361	88.129	204.505	77.7	217.4	
	LIM	6	182,70	169.400	29.3938	12.0000	138.553	200.247	123.8	198.0	
	Total	24		161.786	54.7189	11.1695	138.680	184.892	77.7	318.9	
Músculo	Anestesia	6	1,88	2.175	.8965	.3660	1.234	3.116	1.5	3.9	0,304
	Controle	6	1,50	2.250	1.7638	.7201	.399	4.101	1.0	5.6	
M4	CEC	6	1,30	1.517	.8110	.3311	.666	2.368	.8	3.0	
	LIM	6	1,95	2.117	.7468	.3049	1.333	2.900	1.5	3.4	
	Total	24		2.015	1.0972	.2240	1.551	2.478	.8	5.6	
Pulmão	Anestesia	6	363,95	312.083	179.2700	73.1867	123.951	500.216	50.2	553.9	0,710
	Controle	6	202,50	199.800	102.7604	41.9518	91.960	307.640	67.3	356.1	
M4	CEC	6	234,60	288.550	145.2733	59.3076	136.095	441.005	167.4	538.7	
	LIM	6	228,90	267.050	95.7417	39.0864	166.575	367.525	217.3	461.0	
	Total	24		266.871	133.0115	27.1509	210.705	323.037	50.2	553.9	
Rim	Anestesia	6	75,94	81.68	53.323	21.769	25.72	137.64	12	176	0,228
	Controle	6	67,40	67.85	27.914	11.396	38.56	97.14	32	102	
M4	CEC	6	44,55	44.15	17.623	7.195	25.66	62.64	25	66	
	LIM	6	64,65	71.50	18.274	7.460	52.32	90.68	54	98	
	Total	24		66.30	33.541	6.847	52.13	80.46	12	176	

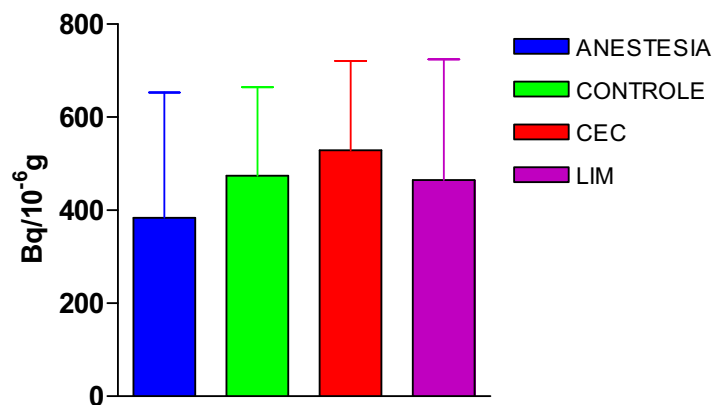


Figura 10 - Medida da radiação de biópsia esplênica.

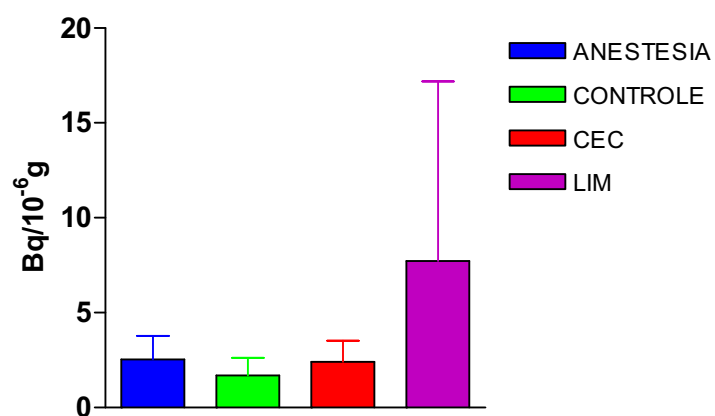


Figura 11 - Medida da radiação de biópsia cerebral.

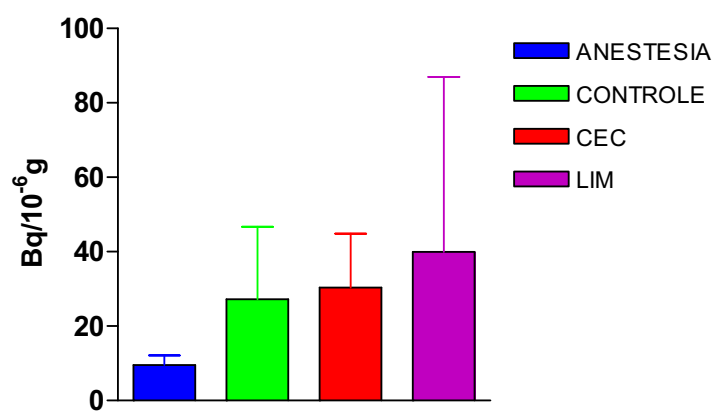


Figura 12 - Medida da radiação de biópsia cardíaca.

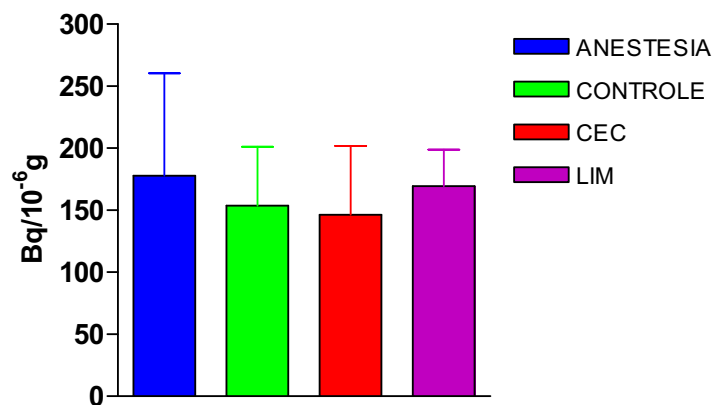


Figura 13 - Medida da radiação de biópsia hepática.

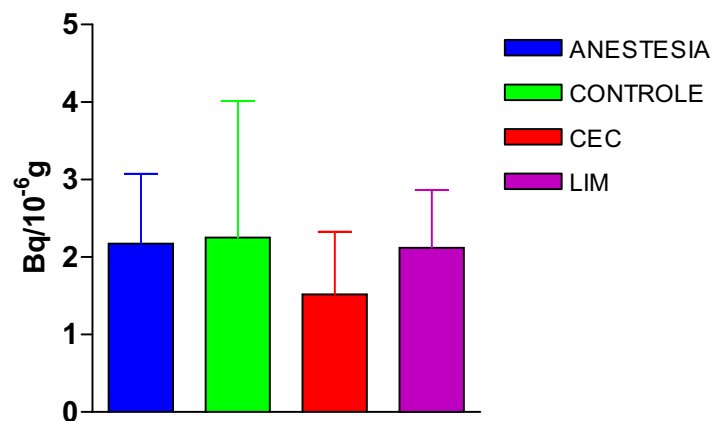


Figura 14 - Medida da radiação de biópsia muscular.

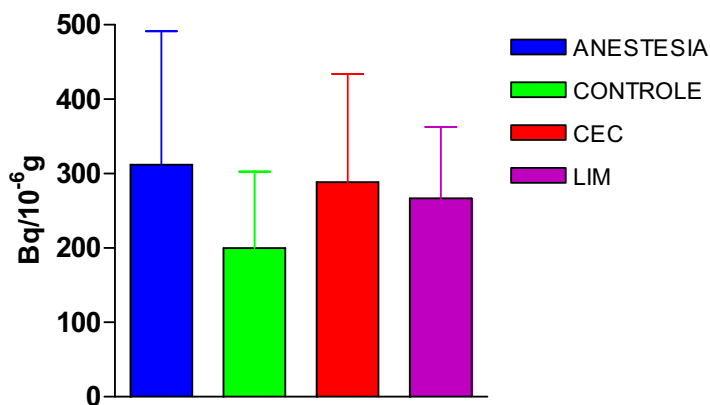


Figura 15 - Medida da radiação de biópsia pulmonar.

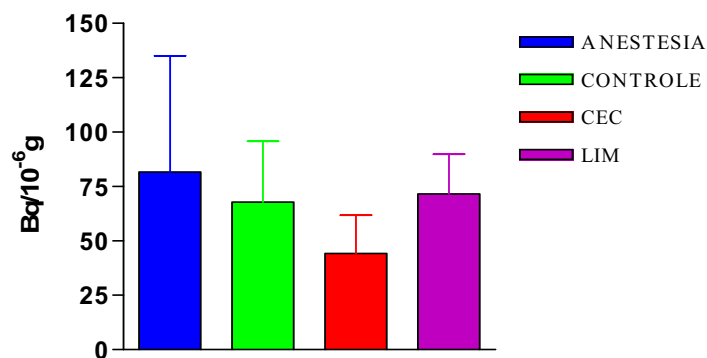


Figura 16 - Medida da radiação de biópsia renal.

Tabela 22 - Conversão da análise histológica semi-quantitativa em quantitativa.

grupos	baço	cérebro	coração	fígado	músculo	pulmão	rim
G1	2.00	0.00	1.00	2.00	0.00	2.00	0.00
	2.00	0.00	0.00	2.00	0.00	2.00	0.00
	2.00	1.00	0.00	2.00	0.00	2.00	1.00
	3.00	0.00	1.00	2.00	0.00	2.00	0.00
	2.00	0.00	0.00	2.00	0.00	2.00	1.00
	2.00	0.00	0.00	2.00	0.00	2.00	1.00
Media 1	2.17	0.17	0.33	2.00	0.00	2.00	0.50
DP1	0.41	0.41	0.52	0.00	0.00	0.00	0.55
G2	2.00	0.00	0.00	2.00	0.00	3.00	0.00
	2.00	0.00	0.00	2.00	1.00	2.00	1.00
	2.00	0.00	0.00	2.00	0.00	2.00	1.00
	2.00	0.00	0.00	2.00	0.00	2.00	0.00
	2.00	0.00	1.00	3.00	0.00	3.00	1.00
	2.00	0.00	0.00	2.00	0.00	2.00	0.00
Media 2	2.00	0.00	0.17	2.17	0.17	2.33	0.50
DP2	0.00	0.00	0.41	0.41	0.41	0.52	0.55
G3	3.00	1.00	1.00	3.00	1.00	3.00	2.00
	2.00	0.00	0.00	3.00	0.00	3.00	1.00
	2.00	0.00	1.00	3.00	0.00	2.00	0.00
	3.00	0.00	0.00	2.00	0.00	3.00	1.00
	2.00	1.00	1.00	2.00	0.00	3.00	2.00
	3.00	1.00	0.00	3.00	1.00	3.00	2.00
Media 3	2.50	0.50	0.50	2.67	0.33	2.83	1.33
DP3	0.55	0.55	0.55	0.52	0.52	0.41	0.82
G4	3.00	0.00	1.00	2.00	0.00	2.00	1.00
	2.00	1.00	0.00	3.00	0.00	3.00	1.00
	3.00	0.00	0.00	3.00	0.00	2.00	2.00
	2.00	1.00	0.00	3.00	1.00	3.00	1.00
	2.00	0.00	1.00	2.00	0.00	3.00	0.00
	3.00	0.00	1.00	2.00	0.00	3.00	2.00
Media 4	2.50	0.33	0.50	2.50	0.17	2.67	1.17
DP4	0.55	0.52	0.55	0.55	0.41	0.52	0.75

Tabela 23 - Análise quantitativa de granulócitos presentes nos cortes histológicos.

Média baço	DP	Média cérebro	DP	Média coração	DP	Média fígado	DP	Média músculo	DP	Média pulmão	DP	Média rim	DP
2.17	0.41	0.17	0.41	0.33	0.52	2.00	0.00	0.00	0.00	2.00	0.00	0.50	0,55
2	0	0	0	0.17	0.41	2.17	0.41	0.17	0.41	2.33	0.52	0.5	0,55
2.5	0.55	0.5	0.55	0.5	0.55	2.67	0.52	0.33	0.52	2.83	0.41	1.33	0,82
2.5	0.55	0.33	0.52	0.5	0.55	2.5	0.55	0.17	0.41	2.67	0.52	1.17	0,75

Utilizando-se ANOVA de uma via, para análise de mais de 2 grupos, de somente uma variável entre eles, sem medidas repetidas.

Os valores de p foram:

baço: $p = 0,1570$

cérebro: $p = 0,2482$

coração: $p = 0,6366$

fígado: $p = 0,0543$

músculo: $p = 0,5526$

pulmão: $p = 0,0130$

rim: $p = 0,0887$