

ANA TEREZA DE MAGALHÃES DANTAS

**CINÉTICA DE SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS EM PACIENTES
SUBMETIDOS À CIRURGIA DE REVASCULARIZAÇÃO MIOCÁRDICA
COM CIRCULAÇÃO EXTRACORPÓREA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, do Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas.

Orientador: Professora Dra. Songeli Menezes Freire

Co-orientador: Professor Dr. André Ney M. Freire

Salvador
2011

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de Saúde, SIBI - UFBA.

D192 Dantas, Ana Tereza de Magalhães
Cinética de subpopulações linfocitárias em pacientes submetidos à cirurgia cardíaca de revascularização miocárdica com circulação extracorpórea / Ana Tereza de Magalhães Dantas. – Salvador, 2011.
80 f.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Songeli Menezes Freire

Co-orientador: Prof. Dr. André Ney Menezes Freire

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde, 2011.

1. Coração - Doenças. 2. Miocárdio. 3. Cirurgia Cardíaca. 4. Imunologia. I. Freire, Songeli Menezes. II. Freire, André Ney Menezes III. Universidade Federal da Bahia. IV. Título.
CDU: 612.17

TERMO DE APROVAÇÃO

ANA TEREZA DE MAGALHÃES DANTAS

**CINÉTICA DE SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS EM PACIENTES
SUBMETIDOS À CIRURGIA DE REVASCULARIZAÇÃO MIOCÁRDICA
COM CIRCULAÇÃO EXTRACORPÓREA**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, Universidade Federal da Bahia.

Banca examinadora

Prof. Dr. Álvaro Luiz Bertho dos Santos

Profa. Dra. Maria Fernanda Rios Grassi

Profa. Dra. Songeli Menezes Freire

Salvador
2011

Dedico este trabalho a todos que
caminharam ao meu lado durante sua
construção.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, fonte de amor e força para lutar pelos meus objetivos.

Aos meus irmãos e à minha família, por caminharem sempre ao meu lado.

À Dra. Songeli Menezes Freire, pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa, pelos conhecimentos compartilhados, pelos anos de orientação pessoal e profissional.

Ao Dr. André Ney Menezes Freire, idealista do projeto, pelo exemplo de profissional, e a todos os outros maravilhosos profissionais do SENEP – Hospital Santa Izabel pela inestimável ajuda na execução do projeto.

Ao Dr. Roberto Meyer, por conduzir de forma tão humana as atividades do Labimuno.

À Darci Malaquias, por ter sido tão presente, atenciosa, colaboradora e paciente desde a primeira até a última atividade deste projeto.

Ao querido biomédico Geraldo Pedral, por todos esses anos de amizade, me ensinando a executar e entender a citometria de fluxo com inesgotável tranquilidade.

À minha companheira de projeto Élide, por todo o apoio prestado desde sua época de Iniciação Científica e pela amizade.

À professora Dra. Maria Teresita Bendicho, pelo auxílio na execução do projeto, na compreensão dos dados e, principalmente, pelas sábias palavras de força dadas na reta final.

Às queridas Marilda Casela, Valdirene Leão e Rosa Guedes, por todos os momentos de discussão de dados e força para seguir em frente.

A todos os estudantes de iniciação científica, pós-graduandos e demais profissionais do Labimuno, pelo convívio diário e conhecimentos divididos.

A todos os docentes do Programa de Pós-graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas.

À Dra. Soraya Trindade pelo auxílio imprescindível nas análises estatísticas.

À Dra. Andréa Cavalcanti pela ajuda e orientação nas análises estatísticas e no tirocínio docente.

Aos meus amigos de turma do Mestrado, por dividirem esta difícil jornada e pelo incentivo nos dias mais difíceis.

Aos meus amados amigos pelos infinitos momentos de alegrias.

Ao suporte financeiro dado pelo CNPq, CAPES e FAPEX.

“A felicidade não está em viver, mas em saber viver. Não vive mais o que mais vive, mas o que melhor vive.”

Mahatma Gandhi

DANTAS, Ana Tereza de Magalhães. Cinética de subpopulações linfocitárias em pacientes submetidos à cirurgia de revascularização miocárdica com circulação extracorpórea. 80 f. il. 2011. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2011.

RESUMO

Em processos inflamatórios, a resposta do organismo baseia-se na ativação de células do tecido conjuntivo e na migração de células provenientes do sangue aos tecidos envolvidos na lesão tecidual. Na inflamação aguda, como no período perioperatório, as células de defesa migram do sangue para o tecido por ativação de mediadores inflamatórios. O principal tratamento para doença arterial coronária é a cirurgia de revascularização do miocárdio com circulação extracorpórea (CRM+CEC), que resulta em perturbação do equilíbrio fisiológico do organismo, ativando uma resposta inflamatória sistêmica, aumentando a susceptibilidade às complicações em pacientes sob estas condições. No presente estudo, foi avaliado o impacto da CRM+CEC na cinética de leucócitos totais e subpopulações linfocitárias e sua associação com o tempo de internação pós-cirúrgica em unidade de terapia intensiva (UTI). Neste estudo longitudinal, foram selecionados 37 pacientes submetidos eletivamente à CRM+CEC. Após concordância em participar do estudo, com assinatura do TCLE, amostras de sangue periférico foram coletadas em diferentes tempos, durante o procedimento cirúrgico e, diariamente, durante o pós-operatório em UTI, até a alta desta unidade. Em todas as amostras foram realizados leucograma e imunofenotipagem por citometria de fluxo para quantificação dos linfócitos T totais (CD3⁺), T auxiliares (CD4⁺), T citotóxicos (CD8⁺), linfócitos B (CD19⁺) e células *natural killer* (CD56⁺). Dados clínicos complementares dos pacientes foram obtidos dos prontuários médicos. A amostra foi composta por 27 homens e 10 mulheres, com idade média de 59 anos. Os indivíduos foram classificados em dois grupos: Grupo 1 (G1) – melhor tempo de evolução pós-cirúrgica (alta de UTI em até 48h pós-cirurgia) e Grupo 2 (G2) – pior tempo de evolução pós-cirúrgica (alta da UTI após 48h pós-cirurgia). Os resultados observados no intra-operatório indicaram uma diminuição das células T CD3⁺ e CD19⁺, enquanto as células T CD4⁺ e T CD8⁺ oscilaram sem uma tendência particular durante este tempo, e as células CD56⁺ aumentaram. Os leucócitos totais apresentaram aumento gradual. No pós-operatório, os linfócitos T CD3⁺, CD4⁺ e CD8⁺ apresentaram menor concentração no tempo de 24h pós-cirurgia, as células CD19⁺ e os leucócitos totais aumentaram progressivamente, enquanto que as CD56⁺ diminuíram. As subpopulações estudadas apresentaram tendência à menor concentração no G2, em relação ao G1. Somente os linfócitos B apresentaram diferença entre os dois grupos, nos primeiros minutos do início da cirurgia e após 30 minutos da instalação de CEC. Os dados indicam que os pacientes que permaneceram mais tempo em UTI (G2) iniciavam a cirurgia com menor concentração destas células.

Palavras-chave: revascularização miocárdica, circulação extracorpórea, linfócitos T, linfócitos T auxiliares, linfócitos T citotóxicos, linfócitos B, células *natural killer*, leucócitos.

DANTAS, Ana Tereza de Magalhães. Kinetics of lymphocyte subsets in patients undergoing myocardial revascularization with extracorporeal circulation. 80 pp. ill. 2011. Master Dissertation – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2011.

ABSTRACT

In inflammatory processes, the body's response is based on the connective tissue cells activation and cells migration from the blood to tissues involved in tissue injury. In acute inflammation such as the perioperative period, the immune cells migrate from blood to tissue by inflammatory mediators activation. The main treatment for coronary artery disease is performed by myocardial revascularization with cardiopulmonary bypass (RM+CBP) which results in disturb of the physiological balance of the body, triggering a systemic inflammatory response, leading to increased complications susceptibility in patients under these conditions. In this study was investigated the impact of RM+CBP in total leukocyte counts and lymphocyte phenotypes and their association with length of stay in postoperative intensive care unit (ICU). A total of 37 patients submitted to elective RM+CBP were included in this longitudinal study. After agreeing to participate in the study and informed consent obtained, peripheral blood samples were collected at different times during surgery and daily during the postoperative ICU, until discharge of this unit. In all samples were performed WBC and immunophenotyping by flow cytometry for T lymphocytes (CD3⁺), T helper (CD4⁺), T cytotoxic (CD8⁺), B lymphocytes (CD19⁺) and natural killer cells (CD56⁺) quantification. Additional clinical data were obtained from patients' medical records. The sample consisted of 27 men and 10 women, mean age 59 years. Subjects were classified into two groups: Group 1 – faster recovery post-surgical (ICU discharge up to 48 hours post-surgery) and Group 2: slower recovery post-surgical (ICU discharge after 48 hours post-surgery). The results observed intraoperatively indicated a decrease of CD3⁺ and CD19⁺ while CD4⁺ and CD8⁺ oscillate without a trend during this particular time, and CD56⁺ increased levels. The total leukocyte count showed gradual increase in individuals. Postoperatively, CD3⁺, CD4⁺ and CD8⁺ cells had lower concentrations 24 hours after surgery, the CD19⁺ cells and total leukocytes gradually increased, while CD56⁺ decreased levels. The cell subpopulations studied showed a tendency to lower concentrations in the group with slower recovery time post-surgical compared the group with faster recovery time post-surgery. Only the B-lymphocyte count indicated difference between the two groups in the first minutes of the start of surgery and after 30 minutes of cardiopulmonary bypass. These data indicate that patients who stayed longer in ICU (G2) had the lowest concentration of these cells at the beginning of surgery.

Keywords: myocardial revascularization, cardiopulmonary bypass, T-lymphocyte, helper T-lymphocyte, cytotoxic T-lymphocyte, B-lymphocyte, natural killer cells, leukocytes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Fluxograma da estratégia de coleta das amostras sanguíneas dos indivíduos submetidos à cirurgia de revascularização do miocárdio com circulação extracorpórea.....	35
Figura 2	Gráfico em <i>dot plot</i> para seleção da população de interesse para o estudo (tamanho – FSC <i>versus</i> complexidade – SSC).....	37
Figura 3	Gráfico de purificação/identificação.....	38
Figura 4	Identificação e caracterização das subpopulações linfocitárias por citometria de fluxo.....	39
Figura 5	Representação da distribuição e localização das microesferas PerfecCount (Cytognos).....	40
Figura 6	Representação de valores relativos das subpopulações linfocitárias e número de microesferas adquiridos em FACSCalibur (BD Biosciences) contadas obtidos a partir do modelo fornecido pelo <i>software</i> CellQuest™.....	41
Figura 7	Cinética dos leucócitos totais em amostras sangue periférico obtidas de indivíduos submetidos à cirurgia eletiva de revascularização do miocárdio com circulação extracorpórea.....	48
Figura 8	Cinética dos linfócitos T (CD3 ⁺) em amostras sangue periférico obtidas de indivíduos submetidos à cirurgia eletiva de revascularização do miocárdio com circulação extracorpórea.....	49
Figura 9	Cinética dos linfócitos T auxiliares (CD4 ⁺) em amostras sangue periférico obtidas de indivíduos submetidos à cirurgia eletiva de revascularização do miocárdio com circulação extracorpórea.....	50
Figura 10	Cinética dos linfócitos T citotóxicos (CD8 ⁺) em amostras sangue periférico obtidas de indivíduos submetidos à cirurgia eletiva de revascularização do miocárdio com circulação extracorpórea.....	51

Figura 11	Cinética dos linfócitos B (CD19 ⁺) em amostras sangue periférico obtidas de indivíduos submetidos à cirurgia eletiva de revascularização do miocárdio com circulação extracorpórea.....	52
Figura 12	Cinética das células <i>natural killer</i> (CD56 ⁺) em amostras sangue periférico obtidas de indivíduos submetidos à cirurgia eletiva de revascularização do miocárdio com circulação extracorpórea.....	54
Figura 13	Cinética dos linfócitos B (CD19 ⁺) de acordo com o tempo de evolução pós-cirúrgica.....	55
Figura 14	Distribuição da contagem de linfócitos T totais (CD3 ⁺), linfócitos T <i>helper</i> (CD4 ⁺), linfócitos T citotóxicos (CD8 ⁺), células NK (CD56 ⁺) e linfócitos B (CD19 ⁺), por citometria de fluxo, e contagem de leucócitos totais em amostras sangue periférico obtidas de indivíduos submetidos à cirurgia eletiva de revascularização do miocárdio com circulação extracorpórea.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Valores das subpopulações linfocitárias de sangue periférico de indivíduos adultos obtidos em diferentes estudos.....	22
Tabela 2	Dados clínicos e cirúrgicos dos pacientes submetidos à cirurgia de revascularização miocárdica com circulação extracorpórea...	44
Tabela 3	Tempo de internamento em unidade de terapia intensiva pós-cirurgia cardíaca.....	45
Tabela 4	Composição dos grupos de melhor e pior tempo de evolução pós-CRM.....	46
Tabela 5	Dados clínicos e cirúrgicos dos Grupo 1 e Grupo 2.....	46
Tabela 6	Medidas de tendência central e dispersão da contagem de leucócitos totais de indivíduos submetidos à cirurgia de revascularização do miocárdio com circulação extracorpórea.....	47
Tabela 7	Quantificação dos linfócitos T totais de todos os indivíduos.....	49
Tabela 8	Quantificação dos linfócitos T auxiliares de todos os indivíduos..	50
Tabela 9	Quantificação dos linfócitos T citotóxicos de todos os indivíduos	51
Tabela 10	Quantificação dos linfócitos B de todos os indivíduos.....	52
Tabela 11	Quantificação das células <i>natural killer</i> de todos os indivíduos....	53
Tabela 12	Quantificação dos linfócitos B (CD19 ⁺) de acordo com a evolução pós-cirúrgica.....	55
Tabela 13	Quantificação linfocitária do Grupo 1 e Grupo 2.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH	Hormônio adrenocorticotropina
CD	Diferenciação de grupo, do inglês, <i>cluster of differentiation</i>
CEC	Circulação extracorpórea
CF	Citometria de fluxo
CRH	Hormônio liberador de corticotropina
DAC	Doença arterial coronária
DPO	Dia pós-operatório
FSC	Dispersão frontal, do inglês, <i>forward scatter</i>
HHA	Hipotálamo-hipófise-adrenal
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetraacético
LB	Linfócito B
LT	Linfócito T
NK	Células <i>natural killer</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
RM	Revascularização do miocárdio
SIRS	Síndrome de resposta inflamatória sistêmica, do inglês, <i>Systemic Inflammatory Response Syndrome</i>
SNA	Sistema nervoso autônomo
SNC	Sistema nervoso central
SSC	Dispersão lateral, do inglês, <i>side scatter</i>
UTI	Unidade de terapia intensiva

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	15
1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE	20
2.2 CITOMETRIA DE FLUXO PARA QUANTIFICAÇÃO DE LINFÓCITOS	23
2.3 RESPOSTA IMUNE APÓS REVASCULARIZAÇÃO MIOCÁRDICA COM CIRCULAÇÃO EXTRACORPÓREA	26
2.3.1 Estresse e seus efeitos no sistema imune	28
3 OBJETIVOS	31
3.1 OBJETIVO GERAL	32
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
4 MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 ASPECTOS ÉTICOS	34
4.2 TIPO DE ESTUDO	34
4.3 SELEÇÃO DE PACIENTES	34
4.3.1 Critérios de inclusão	34
4.3.2 Critérios de exclusão	35
4.4 COLETA DAS AMOSTRAS	35
4.5 LEUCOGRAMA	36
4.6 IMUNOMARCAÇÃO PARA CITOMETRIA DE FLUXO	36
4.7 COLETA DE DADOS CLÍNICOS	41
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
5 RESULTADOS	43
5.1 COMPOSIÇÃO DA AMOSTRA	44
5.1.1 Divisão da amostra em grupos	45
5.1.1.1 Composição dos grupos	45
5.2 CINÉTICA DOS LEUCÓCITOS TOTAIS	47
5.3 CINÉTICA DAS SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS	48
5.3.1 Linfócitos T (CD3⁺)	48
5.3.2 Linfócitos T auxiliares (CD4⁺)	49

5.3.3 Linfócitos T citotóxicos (CD8 ⁺).....	51
5.3.4 Linfócitos B (CD19 ⁺).....	52
5.3.5 Células <i>natural killer</i> (CD56 ⁺).....	53
5.4 COMPARAÇÃO DA CINÉTICA DAS SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS ENTRE O GRUPO 1 E GRUPO 2.....	54
6 DISCUSSÃO.....	59
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	66
REFERÊNCIAS.....	68
APÊNDICES E ANEXOS.....	75
APÊNDICE A.....	76
ANEXO A.....	77
ANEXO B.....	78
ANEXO C.....	80

Este estudo foi realizado em colaboração bem sucedida entre o Serviço de Nutrição Enteral e Parenteral (SENEP) e equipes de cirurgia cardíaca, chefiadas pelos doutores Ricardo Eloy e Nilzo Ribeiro do Hospital Santa Izabel e o Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular, da Universidade Federal da Bahia, sob orientação do Professor Doutor André Ney Menezes Freire, livre docente da Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia, cirurgião geral e especialista em nutrologia.

Os resultados preliminares deste projeto foram apresentados, sob a forma de pôster, no IV Congresso Brasileiro de Nutrição Integrada e Ganepão 2011, em São Paulo, e o trabalho foi premiado como melhor trabalho clínico (ANEXO A).

A cirurgia de revascularização miocárdica (CRM) é um recurso eficaz no tratamento das manifestações clínicas da doença arterial coronária (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2004). Este procedimento pode ser realizado com ou sem a utilização de circulação extracorpórea (CEC), ferramenta segura e rotineira que permite a realização de uma variedade de intervenções no coração pelo desvio do sangue por um circuito artificial de natureza não-fisiológica. A CRM com CEC culmina em perturbação do equilíbrio fisiológico do organismo, ativando uma resposta inflamatória sistêmica gerada pela exposição do sangue à superfície não endotelial, trauma cirúrgico, isquemia-reperusão e hipotermia, havendo, conseqüentemente, um grau de disfunção orgânica. Defeitos na imunidade mediada por células pós-cirurgia exercem o potencial de promover infecções (RINDER et al., 1997), aumentando a susceptibilidade às complicações em pacientes sob estas condições, o que leva a necessidade de identificação de fatores preditores ou biomarcadores para estas complicações.

A quantificação linfocitária desde o período pré-cirúrgico e seu acompanhamento durante a unidade de terapia intensiva (UTI), pode fornecer um dado extra para avaliação pré-operatória e conduta pós-operatória, possibilitando uma estratégia-alvo para melhora dos resultados clínicos pós-operatórios através do reforço do sistema imune durante o período perioperatório. Nenhum estudo foi encontrado com o relato pouco conhecido sobre associação do perfil linfocitário e morbi-mortalidade após cirurgia de revascularização miocárdica com circulação extracorpórea.

Dessa forma, o presente trabalho objetivou contribuir para o tema em tela, avaliando o impacto da cirurgia cardíaca de revascularização miocárdica com circulação extracorpórea na distribuição dos leucócitos totais e subpopulações linfocitárias com a finalidade de associar a contagem de leucócitos com o tempo de internação pós-cirúrgica em UTI.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE

O sistema imunológico é composto por uma rede de células e fatores solúveis que cooperam na formação de uma resposta efetiva do hospedeiro contra microorganismos e outras substâncias estranhas. As células progenitoras linfóides, provenientes da medula óssea, dão origem aos linfócitos T, B e células NK. Durante sua maturação, passam por estágios de expressão de genes e de proteínas de membranas que servem como marcadores fenotípicos dos diferentes estágios de desenvolvimento. São importantes nas respostas imunes inatas e adaptativas e sua quantificação geralmente é realizada para o estudo da imunidade em diversas patologias. A imunidade inata inclui as células NK e fagócitos com produção de peptídeos antimicrobianos, citocinas e complemento. Enquanto a imunidade adaptativa gera respostas diretas envolvendo os linfócitos T e B e uma série de citocinas e quimiocinas (FLEISHER; OLIVEIRA, 2004; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

Os linfócitos T representam aproximadamente 75% dos linfócitos circulantes, possuem papel central na resposta imune adaptativa, exercendo atividade auxiliar, regulatória, secreção de citocinas pró-inflamatórias e inibitórias e função efetora de citotoxicidade. Estas células se diferenciam das demais pela presença do receptor de células T (TCR, do inglês, *T-cell receptor*) e o complexo CD3 em sua superfície, e são divididas em dois subgrupos principais, de acordo com a expressão de co-receptores, os linfócitos T citotóxicos (CD8⁺) e T auxiliares (ou *helper*, do inglês) (CD4⁺) (MARKETON; GLASER, 2008; URRÁ et al., 2009). Além disso, as células T auxiliares são denominadas em diferentes subpopulações, incluindo T *helper* 1 (Th1) e T *helper* 2 (Th2), a depender do perfil de produção de citocinas (FLEISHER; OLIVEIRA, 2004). As células do tipo Th1, envolvidas na imunidade contra vírus e outros patógenos intracelulares, eliminação de células cancerosas e estimulação de reações de hipersensibilidade do tipo tardia, produzem citocinas pró-inflamatórias como interferon-gama (IFN- γ), interleucina-12 (IL-12), fator de necrose tumoral (TNF). Os linfócitos Th2 participam da imunidade humoral e regulam a produção de anticorpos contra organismos extracelulares, produzindo citocinas anti-inflamatórias

como interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5), interleucina-10 (IL-10), interleucina-13 (IL-13) (KIMURA et al., 2010; MARCIANAK-SROKA et al., 2011; URRÁ et al., 2009).

As células *natural killer* (NK) são linfócitos granulares que compõem cerca de 5 a 15% dos linfócitos circulantes em indivíduos normais. Esta subpopulação compõe a imunidade inata e tem papel importante na primeira linha de defesa, com atividade citotóxica, apresentando função de lisar células-alvo tumorais ou infectadas por vírus através de reconhecimento, formação do conjugado célula NK/célula-alvo e sua ativação que leva ao dano e lise das células-alvo. O estado de ativação destas células depende de alguns fatores como os níveis de citocinas e hormônios (GREISEN, 1999), como interferon-gama (IFN- γ) e interleucina-2 (IL-2). A avaliação destas células, com exceção das células NKT (CD3⁺CD56⁺), inclui a identificação, por citometria, da expressão das moléculas CD56, CD16, ou ambos, nas células que não possuam o complexo CD3.

Os linfócitos B possuem como marcador expresso de forma mais precoce e presente em todas as etapas da sua maturação até sua diferenciação em plasmócitos a molécula de superfície CD19. Essa proteína forma um complexo com CD21, CD81 e CD225 na superfície de células maduras e, junto com o receptor de células B (BCR, do inglês, *B-cell receptor*) diminuem o limiar de ativação das células B por antígenos. Estas células são responsáveis pela imunidade humoral, têm seus valores relativos e absolutos aumentados durante os cinco primeiros meses de vida, permanecem constantes até os dois anos de idade e reduzem, gradualmente, aos valores encontrados em adultos, compreendendo cerca de 10 a 20% dos linfócitos totais (FLEISHER; OLIVEIRA, 2004).

Os valores de referência podem ser definidos a partir de livros de hematologia e manuais técnicos laboratoriais ou pela determinação da faixa de normalidade por meio de resultados obtidos de amostras da população em questão. Outra opção possível é a elaboração de valores de referência individuais, obtidos através da comparação de exames laboratoriais anteriores do mesmo indivíduo (NAOUM, F.; NAOUM, P., 2006). Atualmente, os intervalos de referência linfocitários são obtidos através de livros e protocolos internacionais padronizados, geralmente por análises

de amostras de populações americanas e europeias. No entanto, considerando a variabilidade dos níveis de leucócitos e linfócitos entre populações devido à ação de fatores como idade, gênero, etnia, fatores ambientais, condição clínica, cada laboratório deve estabelecer valores de referência, referidos como faixa ou valor normal, para as diferentes populações (CHNG; TAN; KUPERAN, 2004; JENTSCH-ULLRICH et al., 2005; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2007). Estudos, principalmente internacionais, realizados em diferentes centros têm referido números absolutos de linfócitos, em populações saudáveis, na intenção de estabelecer faixas de valores normais (Tabela 1).

Tabela 1: Valores das subpopulações linfocitárias de sangue periférico de indivíduos adultos obtidos em diferentes estudos.

	Marcadores de diferenciação celular analisados					Local do estudo	Referências
	CD3	CD4	CD8	CD56	CD19		
	1581 ^b	943 ^b	549 ^b	-	-	Brasil	TORRES et al., 2009
	1505 ^a (1431 ^b)	843 ^a (833 ^b)	548 ^a (499 ^b)	374 ^a (346 ^b)	287 ^a (253 ^b)	Tanzânia	URASSA et al., 2003
	780- 2240 ^c	490- 1640 ^c	170- 880 ^c	80- 690 ^c	80-490 ^c	Alemanha	JENTSCH-ULLRICH et al., 2005
Valores absolutos (células/ μ L)	540- 1790 ^c	310- 1140 ^c	140- 820 ^c	80- 430 ^c	70-460 ^c	Suíça	BISSET et al., 2003
	600- 2460 ^c	490- 1670 ^c	220- 1110 ^c	70- 650 ^c	70-520 ^c	Itália	SANTAGOSTINO et al., 1999
	700- 2100 ^c	300- 1400 ^c	200- 900 ^c	90- 600 ^c	100- 500 ^c	Holanda	COMANS-BITTER et al., 1997
	800- 2680 ^c	400- 1450 ^c	240- 1210 ^c	120- 1010 ^c	130- 710 ^c	Singapura	CHNG et al., 2004
	850- 2560 ^c	370- 1240 ^c	310- 1620 ^c	80- 580 ^c	50-420 ^c	Etiópia	TSEGAYE et al., 1999

Nota: ^amédia, ^bmediana, ^cpercentil 2,5-97,5.

A avaliação do sistema imune tem sido realizada graças a avanços nas técnicas imunológicas. A fim de estudar a relação entre o número absoluto das subpopulações linfocitárias e o tempo de evolução pós-cirúrgica, no presente estudo, estas células foram quantificadas pela técnica de citometria de fluxo.

2.2 CITOMETRIA DE FLUXO PARA QUANTIFICAÇÃO DE LINFÓCITOS

O método de imunofenotipagem por citometria de fluxo permite a análise de populações heterogêneas de células (ou análises intracelulares de organelas). Pode oferecer dados baseados nas diferenças estruturais e funcionais das células, classificando-as por diferentes características fenotípicas como grau de diferenciação celular, linhagem celular, expressão de proteínas, ploidia, dentre outros (QUIXABEIRA; SADDI, 2008). Este procedimento pode ser realizado com material de variados compartimentos do organismo como amostras de sangue, de medula óssea, fluidos de cavidade serosa, fluidos cerebrospinal, urina e células de tecidos sólidos preparados em suspensão (BROWN; WITTNER, 2000).

A citometria de fluxo é uma técnica que tem como princípio a excitação de fluorocromos conjugados a anticorpos, por uma fonte luminosa (*laser*). Os raios *laser* incidem sobre células em um fluido corrente no qual as células passam alinhadas, uma a uma, em frente a um conjunto de detectores de luz. A interação do feixe de *laser* com as células gera sinais de dois diferentes tipos: aqueles gerados pela dispersão frontal da luz (FSC, do inglês, *forward scatter*), relacionados ao tamanho celular, dispersão lateral da luz (SSC, do inglês, *side scatter*), relacionados à complexidade interna, e aqueles relacionados à emissão da luz por fluorocromos conjugados ou não a anticorpos. Os fluorocromos são excitados para um estado de maior energia, causando emissão de luz em determinados comprimentos de onda. Os sinais de luz gerados são captados e direcionados por um sistema óptico constituído por uma série de filtros e espelhos que isolam os sinais de comprimento de onda de interesse. Por fim, sensores eletrônicos transformam os fótons (luz) em impulsos elétricos que são amplificados e registrados como sinais digitais a serem

processados pelo computador (DE ROSA, 2000; HAWLEY, T.; HAWLEY, R., 2004; HERZENBERG; WEDEMEYER; PÖTTER, 2001).

Esta ferramenta possibilita a avaliação de parâmetros como espectro de cores e identificação de características celulares diferentes por dispersão de luz, incluindo tamanho e granulosidade, além de intensidade de fluorescência. É amplamente útil, por exemplo, na morfologia complementar, citoquímica e estudo de cariótipo fornecendo diagnóstico e classificação precisos de leucemias mielóides agudas (CHANG et al., 2004). Segundo revisão feita por Orfao et al., em 1999, a imunofenotipagem das células hematológicas, por citometria de fluxo, tem sido útil no diagnóstico, classificação, prognóstico e detecção de doenças residuais em pacientes com doenças hematológicas malignas, sendo considerada, por exemplo, a primeira modalidade diagnóstica para desordens linfoproliferativas crônicas, incluindo linfoma não-Hodgkin, assim como em leucemias agudas, desordem mieloproliferativa crônica e síndrome mielodisplásica. Além disso, tem sido utilizada para avaliar número e proporções de linfócitos periféricos bem como os estágios de maturação e diferenciação destas células, tendo evoluído como a ferramenta mais importante na avaliação do estado imunológico, principalmente, para a contagem de células T CD4⁺ em pacientes infectados pelo HIV. Assim como tem sido utilizada na caracterização de imunodeficiências primárias, doenças auto-imunes, avaliação da reconstituição do sistema imune após transplante de células-tronco e monitoração da terapia imunossupressora em pacientes submetidos a transplante de órgãos sólidos (CHNG; TAN; KUPERAN, 2004; FLEISHER; OLIVEIRA, 2004; THALHAMMER-SCHERRER et al., 2000).

A fenotipagem por imunomarcagem tornou-se possível devido ao desenvolvimento de equipamentos especializados além da utilização de anticorpos de alta especificidade. Esta técnica pode ser realizada com base na expressão de diferentes subconjuntos de proteínas de superfície, por células de diferentes linhagens ou diferentes fases de maturação, identificadas, por exemplo, pelas moléculas de diferenciação de grupo celular ou antígenos CD, do inglês, *cluster of differentiation* (HERZENBERG; DE ROSA, 2000). Estas moléculas são associadas a uma variedade de funções, como capacidade de interações celulares, receptores celulares, receptores de citocinas, canais de íons, transportadores, ou

imunoglobulinas, e são elas que serão reconhecidas pelo anticorpo específico. Além disso, a expressão destas proteínas é usada para definir a população de linfócitos, uma vez que estes são indistintos morfológicamente em esfregaços sangüíneos. Por exemplo, moléculas CD3 permitem a classificação dos linfócitos T totais; CD4, dos linfócitos T *helper*; CD8, linfócitos T citotóxicos; CD19, linfócitos B e CD56, células *natural killer* (NK).

A imunomarcção pode ser realizada pela utilização de anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos disponíveis comercialmente, de acordo com o que se pretende estudar. Estes anticorpos estão disponíveis separadamente ou em combinações duplas ou triplas, com diversos tipos de fluorocromos. O que delimita o número de fluorocromos são o modelo e a capacidade do citômetro de fluxo.

Um tipo de marcação de subtipos linfocitários pode ser executada por kits comerciais como os TriTEST™/TruCount (BD Biosciences), os quais combinam análises de três cores utilizando *softwares* específicos para a quantificação, por exemplo, de células CD4⁺ e CD8⁺ e para estabelecer a razão entre linfócitos CD4⁺/CD8⁺, sendo úteis no monitoramento da infecção e tratamento para HIV. Nesta infecção, as células CD4⁺ são o marcador mais robusto de imunocompetência, uma vez que a perda destas células desregula a resposta imune aos patógenos, aumentando a susceptibilidade às infecções oportunistas, características da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS). No caso de infecção por HIV, a quantificação das células T CD4⁺ é fundamental, particularmente, para a decisão de início do tratamento antiretroviral, assim como para o monitoramento da progressão da doença e eficácia do tratamento (CHNG; TAN; KUPERAN, 2004; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2007).

No presente estudo, a imunomarcção para citometria de fluxo foi utilizada para avaliar a resposta imune celular, no período perioperatório, de pacientes submetidos ao trauma e ao estresse cirúrgico da revascularização miocárdica com circulação extracorpórea, observando-se a distribuição das subpopulações de linfócitos T totais, T auxiliares, T citotóxicos, células *natural killer* e linfócitos B.

2.3 RESPOSTA IMUNE APÓS REVASCULARIZAÇÃO MIOCÁRDICA COM CIRCULAÇÃO EXTRACORPÓREA

A cirurgia de revascularização do miocárdio (CRM) tem sido considerada um método efetivo para o tratamento da Doença Arterial Coronária, pois consiste na restauração do fluxo sanguíneo na área ameaçada por infarto conseqüente da obstrução coronária, por meio da substituição vascular do local obstruído com enxertos autólogos ou sintéticos, equilibrando a perfusão e as necessidades do miocárdio (KASPER et al., 2006; KUMAR et al., 2005).

Este procedimento pode ser executado com ou sem a utilização de circulação extracorpórea (CEC), ferramenta segura e rotineira que permite a realização de uma variedade de intervenções no coração pelo desvio do sangue por um circuito artificial. Relatos desde 1812, feitos por Le Gallois, discutem a necessidade de um aparato artificial capaz de exercer a função do coração e pulmões para que cirurgia com o coração parado pudesse ser realizada. Somente no final da década de 50, em 1959, foi realizada, com sucesso, a primeira cirurgia arterial coronariana utilizando a circulação extracorpórea (GREASON; SCHAFF, 2011).

No ato cirúrgico, a circulação extracorpórea, indispensável em muitos procedimentos, executa a função outrora realizada pelos pulmões e coração por meio de um equipamento específico que drena o retorno venoso e bombeia o sangue oxigenado de volta para o sistema arterial, mantendo a perfusão tecidual (AULER; CHIARONI, 2000; MOTA et al., 2008), enquanto o coração permanece em cardioplegia para o reparo cirúrgico. A CEC exerce importante influência no aumento da repercussão orgânica durante o pós-operatório, pois esta interfere, dentre outros, na série leucocitária, levando a alterações no número destas células e, conseqüentemente, alterações imunológicas (VASCONCELOS FILHO; CARMONA; AULER JÚNIOR, 2004). As alterações inflamatórias subjacentes à cirurgia cardíaca com circulação extracorpórea vêm sendo relatadas desde a década de 70, conforme estudo de Parker et al. (1972).

A resposta inflamatória sistêmica decorrente de grandes procedimentos cirúrgicos é, freqüentemente, associada à cirurgia cardíaca em virtude de esta ser para o organismo um agente agressor e ser interpretada como “perigo” aos sinais resultantes de inúmeras modificações simultâneas de mecanismos fisiológicos como trauma cirúrgico, exposição do sangue a superfícies e condições não-fisiológicas, efeitos mecânicos da manipulação tecidual intra-operatória, isquemia-reperfusão, mudanças na temperatura corporal, geração de espécies reativas de oxigênio e pela liberação de endotoxinas, podendo causar grande estresse orgânico (ASIMAKOPOULOS; GOURLAY, 2003; BUTLER; ROCKER; WESTABY, 1993; CIOCA; WATANABE; ISOBE, 2000; LAFFEY; BOYLAN; CHENG, 2002; LUYTEN et al., 2005; WAN; LECLERC; VINCENT, 1997).

A Síndrome de Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS, do inglês, *systemic inflammatory response syndrome*), também denominada de síndrome pós-perfusão, caracteriza-se por leucocitose, aumento da permeabilidade vascular com acúmulo de líquido intersticial, associada a lesões de isquemia e perfusão com manifestações clínicas complexas em diversos órgãos, como lesão pulmonar aguda, choque, insuficiência renal e síndrome de disfunção de múltiplos órgãos, sangramento, resultando em febre, infecção, hipotensão, vasodilatação, sendo importante causa de morbidade e mortalidade nos pacientes submetidos à cirurgia cardíaca com CEC (BUTLER; ROCKER; WESTABY, 1993; LAFFEY; BOYLAN; CHENG, 2002; LUYTEN et al., 2005).

A cascata do complemento é ativada durante a circulação extracorpórea, isquemia-reperfusão dos órgãos e neutralização da heparina com o uso de protamina. Tem sido demonstrado que o bloqueio das vias de ativação do complemento atenua a resposta inflamatória resultante de cirurgia cardíaca. Assim, o desenvolvimento de estratégias para aumentar a biocompatibilidade do circuito da CEC pode reduzir o índice de ativação do complemento, levando à diminuição da morbidade pós-cirúrgica. Além do complemento, a elevação da concentração de citocinas pró-inflamatórias tem sido associada com efeitos adversos no pós-operatório (LAFFEY; BOYLAN; CHENG, 2002; WAN et al., 1997).

Apesar da repercussão sistêmica no pós-operatório de cirurgia cardíaca, os avanços nas técnicas cirúrgicas e anestésicas, circulação extracorpórea, monitoramento cardiovascular, terapia intensiva têm contribuído para a diminuição da morbimortalidade na população submetida a este procedimento. Além de serem influenciadas pela CEC, as repercussões metabólica, hormonal e eletrolítica são, também, influenciadas pelo estresse cirúrgico e anestésico aos quais os pacientes são submetidos.

2.3.1 ESTRESSE E SEUS EFEITOS NO SISTEMA IMUNE

Em revisão feita por Marketon e Glaser, em 2008, é referido que o estresse ocorre em diversas formas: física ou psicológica, aguda ou crônica, e essas diferentes formas podem ter diversos efeitos nos hormônios neuroendócrinos e aspectos celulares das respostas imunes.

O estresse cirúrgico, um dos tipos de estresse, é definido como o conjunto de lesões e desafios associados a uma operação, que vão desde o período pré-operatório ao pós-operatório, levando a respostas adaptativas, as quais envolvem a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenais, sistema nervoso autônomo e respostas de fase aguda (MEYER; SILVA, 1999).

A comunicação entre os sistemas imune e neuro-endócrino é evidenciada pelo aumento de secreções hipotálamo-hipofisárias em função de processos que alteram a homeostase do organismo, como estresse, inflamação e infecção, sugerindo que a imunocompetência pode ser regulada pelo sistema nervoso e endócrino (RODRIGUEZ, 2005).

Sternberg et al. (1997) apresentaram as interações neuro-imunes sob o ponto de vista das citocinas liberadas pelo sistema imune com ação no sistema nervoso, por diversas formas. As citocinas periféricas, liberadas por células imunes durante a inflamação, podem estimular o sistema nervoso central (SNC) a produzir respostas

fisiológicas, neuroendócrinas e funcionais, resultando, por exemplo, em febre, sono, ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e outros comportamentos. Há, também, regulação do sistema imune por diferentes rotas, incluindo as vias neuroendócrinas e os sistemas nervoso periférico e autônomo.

As células submetidas ao estresse podem sobreviver ou morrer, dependendo do tipo celular, intensidade e forma de estresse e de outros fatores. Os estressores podem ativar respostas neurais e endócrinas por meio da ativação de diferentes vias, como o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) e sistema nervoso autônomo (SNA), que afetam a resposta imune. Além disso, há a liberação de outros fatores em resposta ao estresse, como prolactina, hormônio do crescimento e fator de crescimento neural. Na ativação do eixo HHA, há secreção de hormônio liberador de corticotropina (CRH) pelo hipotálamo, que estimula a hipófise anterior a secretar o hormônio adrenocorticotropina (ACTH) na circulação sistêmica, a qual induz a síntese e secreção de glicocorticóides pelas glândulas adrenais e estes últimos quando em níveis fisiológicos, apresentam atividade imunomodulatória. Quando em níveis de estresse, os glicocorticóides são imunossupressores. O outro mecanismo pelo qual o estresse age no sistema neuro-endócrino é pela ativação do sistema nervoso simpático, ação resultante da secreção de acetilcolina na medula adrenal, que induz a secreção de adrenalina na circulação, além de haver, também, liberação de noradrenalina pelos nervos terminais (MARKETON; GLASER, 2008; STERNBERG, 1997).

Pacientes sob ansiedade devido à espera prolongada por procedimentos cirúrgicos têm efeitos psicológicos e físicos adversos, pior recuperação após cirurgia, afetando negativamente no tempo de hospitalização (ARTHUR et al., 2000).

O estresse exerce efeito prejudicial na função imunológica. A resposta neuro-imune-endócrina é mediada por hormônios do estresse, incluindo cortisol e catecolaminas, e citocinas inflamatórias como interleucina-6 e TNF- α , os quais levam ao desequilíbrio entre os fatores pró- e anti-apoptóticos, resultando na redução de linfócitos (DELOGU et al., 2000). Em situações de estresse, os números das células *natural killer*, linfócitos T totais, T auxiliares e citotóxicos são reduzidos e a produção de imunoglobulinas é afetada (MARKETON; GLASER, 2008).

Estudos têm mostrado que o bloqueio epidural da atividade dos nervos aferentes é capaz de modificar a resposta imune. Assim, têm-se sugerido que a dor (situação estressante), mesmo na ausência de dano tecidual, pode estimular, via neuroendócrina, o aumento da atividade citotóxica das células NK, além do aumento da concentração plasmática de adrenalina e cortisol sérico, caracterizando a interligação entre os sistemas endócrino e imune (GREISEN et al., 1999).

Nesta revisão, foram encontrados diversos trabalhos acerca da resposta imune após cirurgia de revascularização miocárdica com circulação extracorpórea. No entanto, nenhum dos estudos relacionou o perfil linfocitário de pacientes submetidos a este procedimento ao tempo de evolução pós-cirúrgica. A proposta da quantificação de linfócitos realizada neste estudo foi válida para estudar a cinética linfocitária durante o procedimento cirúrgico e no pós-operatório em unidade de terapia intensiva, além de associar a contagem absoluta linfocitária com tempo de permanência em unidade de terapia intensiva pós-cirurgia.

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a cinética da distribuição das subpopulações linfocitárias no sangue periférico de pacientes submetidos à cirurgia de revascularização miocárdica com circulação extracorpórea.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a cinética das subpopulações linfocitárias CD3⁺ (células T), CD4⁺ (linfócitos T auxiliares), CD8⁺ (linfócitos T citotóxicos), CD56⁺ (células *natural killer*) e CD19⁺ (linfócitos B) e leucócitos totais no período perioperatório.
- Associar a contagem das subpopulações linfocitárias e leucócitos totais ao tempo de evolução pós-cirúrgica.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto do presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Professor Dr. Celso Figuerôa, da Santa Casa de Misericórdia da Bahia/Hospital Santa Izabel (Salvador-BA), em dezembro de 2008 (ANEXO B), com número de Protocolo 54/2008 (ANEXO C).

4.2 TIPO DE ESTUDO

Estudo longitudinal, com amostras obtidas em momentos distintos, para investigação da cinética da distribuição linfocitária.

4.3 SELEÇÃO DE PACIENTES

Participaram voluntariamente do estudo 37 indivíduos de ambos os gêneros submetidos eletivamente à cirurgia de revascularização miocárdica com circulação extracorpórea na Santa Casa de Misericórdia da Bahia/Hospital Santa Izabel, Salvador-BA, entre julho de 2009 e junho de 2011. Todos os indivíduos assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE A).

4.3.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos, sequencialmente, pacientes submetidos à cirurgia eletiva de revascularização miocárdica com circulação extracorpórea, entre 45 a 75 anos, com valores de leucócitos dentro da faixa de referência estabelecida pelo Hospital Santa Izabel.

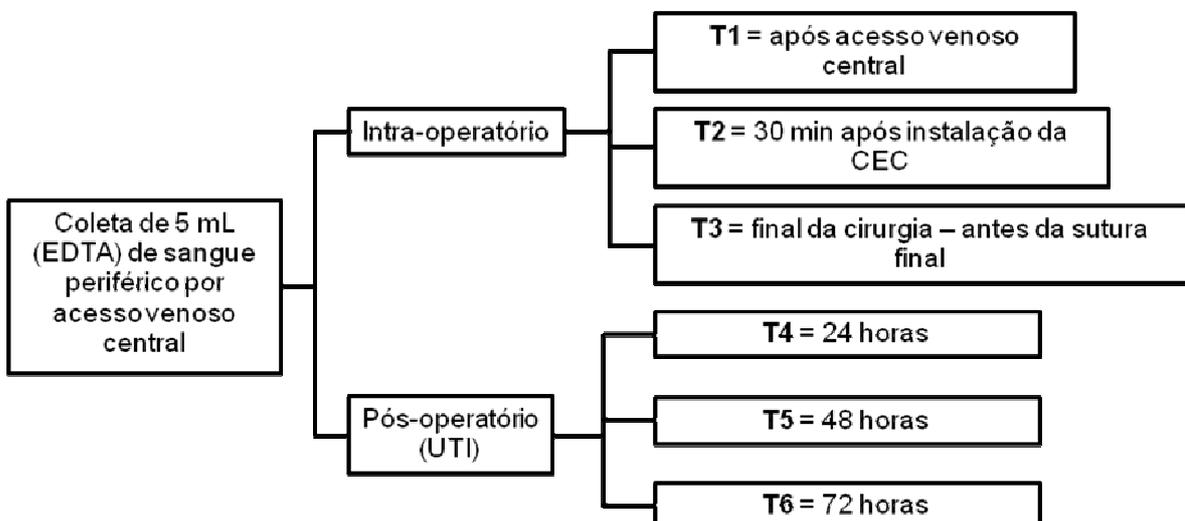
4.3.2 Critérios de exclusão

Não houve critérios de exclusão.

4.4 COLETA DAS AMOSTRAS

Amostras de sangue periférico de cada voluntário foram coletadas em tubos de coleta a vácuo de 5mL com EDTA (BD Vacutainer), por meio de acesso venoso central, em três momentos distintos durante o processo cirúrgico e, também, diariamente, durante o período pós-cirúrgico, na unidade de terapia intensiva (UTI), sendo identificados os tempos como T1 (após acesso venoso central), T2 (30 minutos após entrar em CEC), T3 (antes da sutura do osso esterno), T4 (24h pós-cirurgia), T5 (48h pós-cirurgia) e T6 (72h pós-cirurgia), sendo T4, T5 e T6 coletadas sempre no mesmo horário no período da manhã (Figura 1). O valor absoluto de cada subpopulação linfocitária obtido no tempo T1 foi considerado como controle de cada indivíduo.

Figura 1 - Fluxograma da estratégia de coleta das amostras sanguíneas dos indivíduos submetidos à cirurgia de revascularização do miocárdio com circulação extracorpórea.



4.5 LEUCOGRAMA

O leucograma foi realizado em aparelho semi-automatizado modelo CC-530/500 (CellM), seguindo as instruções do fabricante. Para a lise dos eritrócitos, foi utilizada solução hemolisante para contagem de glóbulos brancos (CellM).

4.6 IMUNOMARCAÇÃO PARA CITOMETRIA DE FLUXO

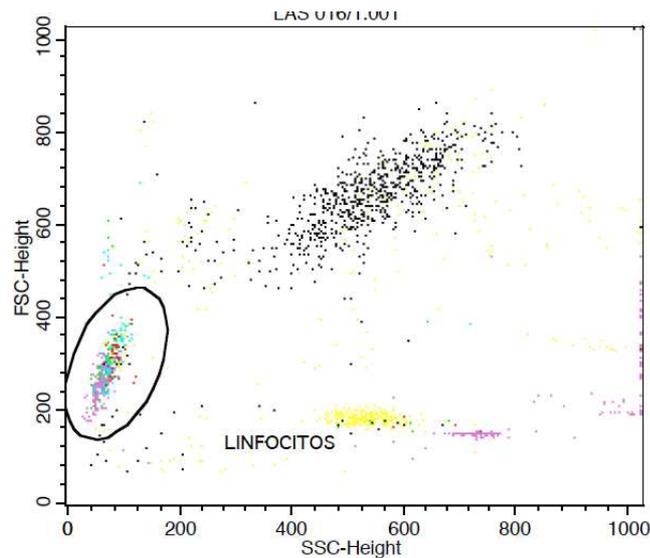
Os fenótipos linfocitários foram quantificados por ensaio citofluorimétrico utilizando o kit comercialmente disponível Lymphogram e microesferas PerfectCount (ambos Cytognos – Salamanca - Espanha). Com o kit foi realizada a contagem absoluta, simultaneamente, dos linfócitos T totais (CD3⁺), linfócitos T auxiliares (CD4⁺), linfócitos T citotóxicos (CD8⁺), células *natural killer* (CD56⁺) e linfócitos B (CD19⁺). A vantagem de utilizar esta técnica está relacionada à rapidez e facilidade, capacidade de fazer a contagem de grande quantidade de células, além de apresentar baixo custo em relação a outras técnicas.

Para a imunomarcção das células, foram misturados, em um tubo, 5µL do reagente monoclonal com 20µL de sangue, e incubados durante 15 minutos, à temperatura ambiente, no escuro. Foram adicionados 475µL de solução de lise de eritrócitos e, em seguida, houve nova incubação nas mesmas condições anteriores. Após a lise, foram adicionados 1000µL de solução salina a 0,9% à mistura para centrifugação a 3500 rpm, durante 3 minutos, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi reconstituído com 400µL de solução salina a 0,9%, acrescentando-se 40 µL de *beads* PerfectCount, para o cálculo do valor absoluto. As amostras marcadas foram adquiridas imediatamente após a marcação ou até um período máximo de 24h no citômetro FACSCalibur (BD Biosciences) equipado com um *laser* de argônio com emissão de comprimento de onda 488nm. Foram feitas regiões eletrônicas, denominadas *gates*, na população de linfócitos baseando-se em suas características de dispersão e fluorescência. A

aquisição de cada amostra, pelo *software* CellQuest (BD), foi finalizada após 10000 eventos terem sido processados, segundo recomendações do fabricante do kit. As análises das aquisições foram feitas pelo *software* Summit (Dako).

Foram coletadas informações referentes aos aspectos como tamanho e granulosidade, identificados por gráficos com eixo de dispersão de luz frontal (FSC – *Forward Scatter*) e eixo de dispersão de luz lateral (SSC – *Side Scatter*), respectivamente, para seleção da população de interesse, como representado pela Figura 2. Esta seleção, denominada “estratégia de *gate*”, possibilita que as análises sejam realizadas, principalmente, baseadas na população incluída nesta delimitação. Para a identificação das subpopulações de linfócitos T, linfócitos B e células NK, por citometria de fluxo, são consideradas suas propriedades morfológicas e a fluorescência conseqüente à presença de anticorpos monoclonais específicos para cada molécula: anti-CD8-FITC (isotiocianato de fluoresceína), anti-CD19-FITC, anti-CD3-PE (ficoeritrina), anti-CD56-PE e anti-CD4-PE/Cy5 (ficoeritrina-cianina 5).

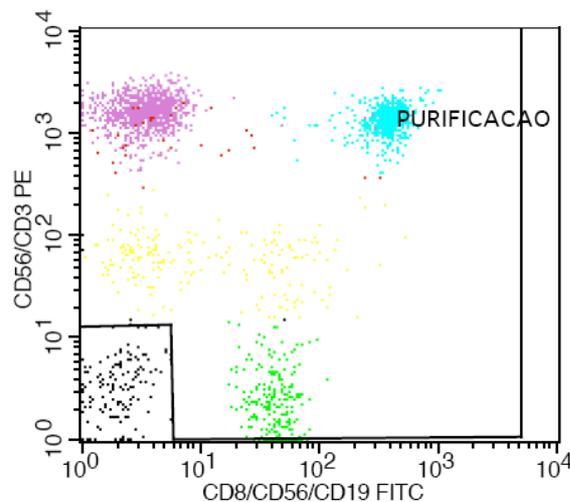
Figura 2 - Gráfico em *dot plot* para seleção da população de interesse para o estudo (tamanho – FSC versus granulosidade – SSC).



Nota: A região circulada compreende a população de linfócitos. Imunomarcagem com Lymphogram (Cytogenos) e aquisição no citômetro FACSCalibur (BD Biosciences).

O gráfico no qual se registra a população selecionada que distingue as subpopulações linfocitárias, identificadas pela ligação dos anticorpos monoclonais específicos e diferenciadas de acordo com a intensidade de fluorescência, é, neste kit, denominado de Gráfico de purificação (Figura 3).

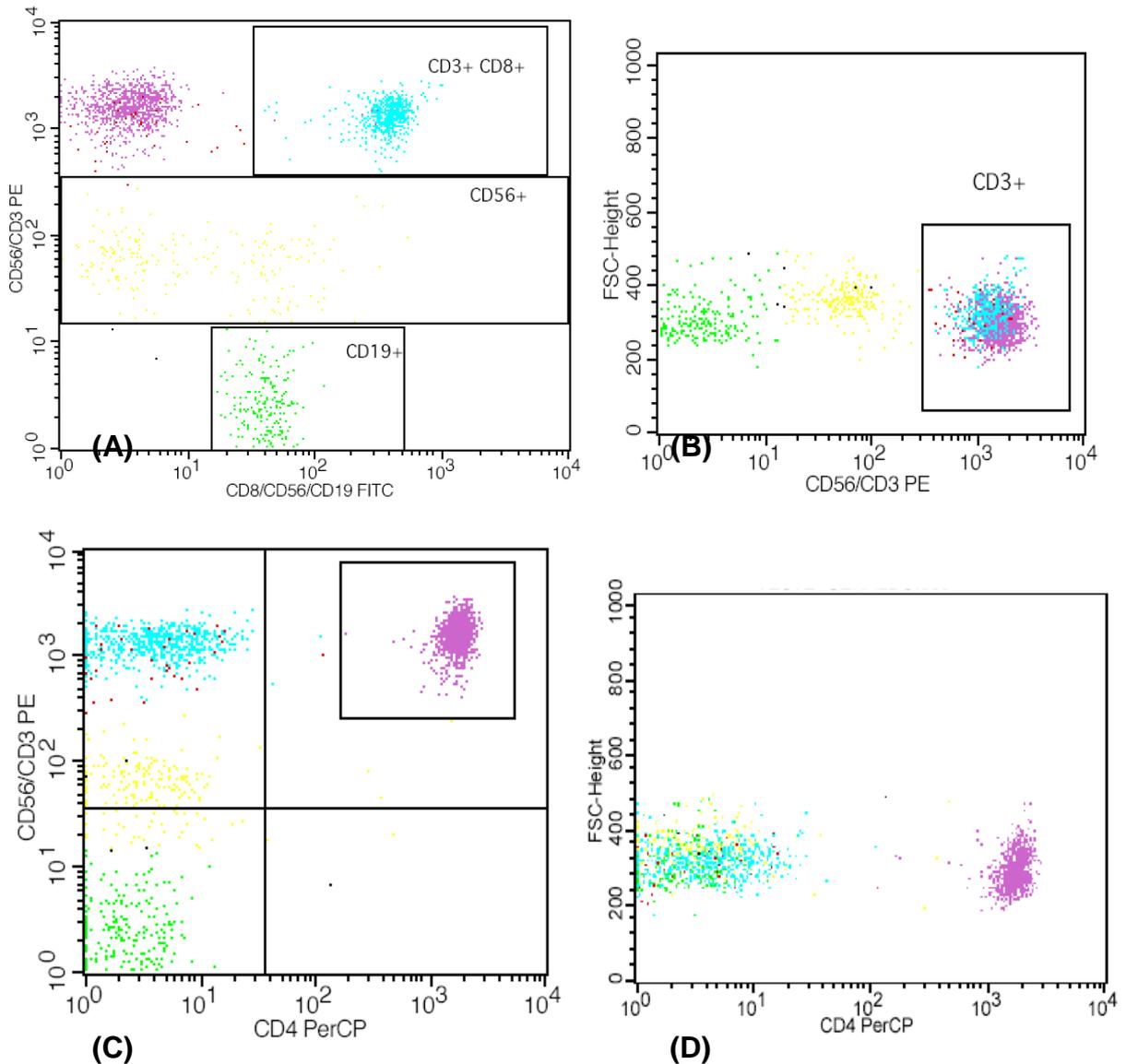
Figura 3 - Gráfico de purificação/identificação.



Nota: Distribuição das subpopulações linfocitárias com base no *gate* de seleção da figura 1. A região que compreende a escala entre 10^0 e 10^1 (quadro interno menor) em ambos os eixos, corresponde às células não marcadas pelos monoclonais. As células marcadas por cada monoclonal exibem, em escala logarítmica, cores e intensidade de fluorescência distintos, permitindo a discriminação das subpopulações linfocitárias no histograma. Imunomarcagem com Lymphogram (Cytognos) e aquisição no citômetro FACSCalibur (BD Biosciences)

Nos gráficos subseqüentes encontram-se delimitadas as populações purificadas na figura 3, para a contagem relativa de cada subpopulação (Figura 4).

Figura 4 - Estratégia de identificação das subpopulações linfocitárias por citometria de fluxo.

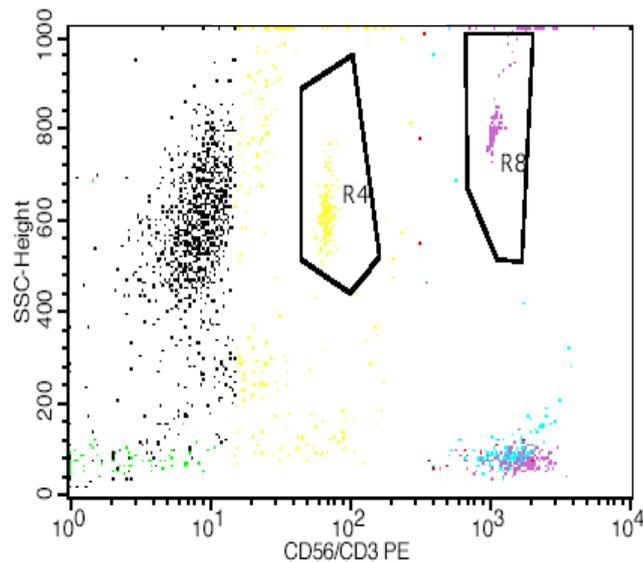


Nota: Nos gráficos A e C encontra-se representada a distribuição das células de acordo com intensidades de fluorescência emitidas pela ligação dos anticorpos monoclonais específicos, em ambos os eixos. Nos gráficos B e D, o tamanho celular *versus* padrão de fluorescência (CD56/CD3-PE e CD4-PerCP, respectivamente). Imunomarcação com Lymphogram (Cytognos) e aquisição no citômetro FACSCalibur (BD Biosciences)

Este kit utilizado para quantificação permite somente a avaliação relativa das subpopulações linfocitárias, sendo necessária a utilização do reagente PerfectCount Microspheres™ (Cytognos, Salamanca, Espanha) para o cálculo dos valores absolutos das subpopulações por microlitro de sangue. Este método é um sistema de plataforma simples baseado em microesferas (*beads*), composto de uma combinação de anticorpos monoclonais conjugados a diferentes fluorocromos. As microesferas apresentam densidades acima e abaixo das células sanguíneas e

apresentam diferentes características de dispersão de luz, fluorescência e flutuação, sendo classificadas em *beads* A e B, – representadas na Figura 5 como regiões R4 e R8, respectivamente. O fabricante fornece o número de *beads* por microlitro para servir de controle interno da quantificação das células.

Figura 5 - Representação da distribuição e localização das microesferas PerfecCount (Cytognos).



Nota: Aquisição em FACSCalibur (BD Biosciences). Gráfico em *dot plot* CD56/CD3 x SSC com *gate* nas duas subpopulações de microesferas (R4 e R8).

No programa de leitura para os componentes do kit comercial processados no FACSCalibur (BD Biosciences), os resultados finais da quantificação relativa de cada subpopulação e das microesferas contadas são expressos em tabelas, como o exemplo a seguir (Figura 6).

Figura 6 - Representação de valores relativos das subpopulações linfocitárias e número de microesferas.

Region	Events	% Gated	% Total
LINFOCITOS	2001	100.00	20.01
CD3+	1597	79.81	15.97
CD3+ CD4+	961	48.03	9.61
PURIFICACAO	2001	100.00	20.01
CD3+ CD8+	599	29.94	5.99
CD56+	202	10.09	2.02
CD19+	197	9.85	1.97
R4	764	7.64	7.64
R8	775	7.75	7.75

Nota: Aquisição em FACSCalibur (BD Biosciences). Modelo fornecido pelo *software* CellQuest™.

O cálculo para obtenção do valor absoluto é feito pela divisão de cada subpopulação detectada (coluna “Events”) pelo número total de microesferas quantificadas (R4+R8), multiplicada pela concentração de microesferas fornecida no prospecto do kit, resultando na quantidade de células/microlitro de amostra, representado abaixo.

$$\text{Contagem absoluta (Células/}\mu\text{L)} = \frac{\text{Número eventos de cada subpopulação}}{\text{Número total de microesferas contadas (R4 e R8)}} \times \text{Número de microesferas/}\mu\text{L (fornecido pelo fabricante)}$$

4.7 COLETA DE DADOS CLÍNICOS

Informações clínicas dos pacientes como sexo, idade, peso, altura, diagnóstico, doenças associadas, tipo de cirurgia, medicamentos utilizados no perioperatório, duração de CEC, duração de cirurgia, dados do hemograma, foram obtidos a partir dos prontuários médicos (APÊNDICE B).

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para verificação de normalidade dos dados, foi aplicado o teste de Kolmogorov-Smirnov. A verificação da diferença entre todos os tempos de coleta foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis. A verificação da existência de diferença entre pares de tempos foi feita pelo teste de Mann-Whitney, o qual também foi utilizado para avaliar a existência de diferença entre os dois grupos de prognóstico (melhor tempo de evolução pós-cirúrgica e pior tempo de evolução pós-cirúrgica). O teste de qui-quadrado foi aplicado para verificação da associação entre as características clínicas, cirúrgicas, comorbidades e tempo de evolução pós-cirúrgica. Todas as análises foram feitas pelos *softwares* SPSS 14.0 (Statistical Package for Social Sciences) e GraphPad Prism 5.0 para Windows. O intervalo de confiança para os testes estatísticos foi definido em 95% ($p < 0,05$).

5.1 COMPOSIÇÃO DA AMOSTRA

Foram incluídos no estudo 27 homens (73%) e 10 mulheres (27%). A mediana da idade dos participantes foi 59 anos (45 a 75 anos), da altura foi 165 cm (150 a 179 cm), do peso foi 74 kg (faixa de 48 a 116) e as medianas da duração da cirurgia e da CEC foram 264 minutos (140 a 405 minutos) e 83 minutos (25 a 120 minutos), respectivamente (Tabela 2). A presença de comorbidades nos indivíduos também foi registrada, sendo a hipertensão arterial a mais prevalente (78,4% dos pacientes), seguida de dislipidemia (54,1%). Foi encontrada a mesma frequência para diabetes e tabagismo (ambos 29,7%) e, por último, etilismo em seis pacientes (16,2%) (Tabela 2). Doze (32,4%) pacientes apresentavam índice de massa corporal (IMC) menor que 25 contra 25 (67,56%) pacientes com IMC acima de 25.

Tabela 2: Dados clínicos e cirúrgicos dos pacientes submetidos a cirurgia de revascularização miocárdica com circulação extracorpórea (n=37).

Variável	Média ± DP	n	%
Idade (anos)	59±8	-	-
Altura (cm)	165±8	-	-
Peso (kg)	74±14	-	-
Duração cirurgia (min)	249±60	-	-
Duração CEC (min)	82±27	-	-
IMC	26,8±4,0	-	-
Diabetes	-	11	29,7
Dislipidemia	-	20	54,1
Hipertensão arterial	-	29	78,4
Etilismo	-	6	16,2
Tabagismo	-	11	29,7

Nota: DP = desvio padrão

Os dados dos indivíduos deste estudo não foram comparados a indivíduos controles saudáveis em virtude de a função imune sofrer alterações no perioperatório. Portanto, os valores obtidos durante e após o procedimento cirúrgico (T2 a T5) comparados aos valores basais (T1) serviram para documentar os efeitos do trauma cirúrgico na população estudada.

5.1.1 DIVISÃO DA AMOSTRA EM GRUPOS

Os pacientes que permaneceram até, no máximo, 48h na unidade de terapia intensiva (n=22, 59,5%), foram considerados com melhor tempo de evolução pós-cirúrgica (GRUPO 1). Aqueles que estiveram internados por mais de 48h após o procedimento (até 41 dias) foram classificados como pacientes com pior tempo de evolução (n=15) (GRUPO 2) (Tabela 3). Dois destes últimos indivíduos (5,4%) apresentaram complicações pós-cirúrgicas e foram a óbito entre 9 e 15 dias após o procedimento.

Tabela 3: Tempo de internamento em unidade de terapia intensiva pós-cirurgia cardíaca.

Tempo em UTI (dias)	n	%
2	22	59,5
3	5	13,5
4	2	5,4
5	2	5,4
8	1	2,7
9	2	5,4
15	1	2,7
16	1	2,7
41	1	2,7
Total	37	100

5.1.1.1 COMPOSIÇÃO DOS GRUPOS

De um total de 10 mulheres, 60% (n=6) apresentaram pior tempo de evolução pós-cirúrgica, enquanto os homens, de um total de 27, representaram 33,3% (n=9) para esta mesma condição (Tabela 4).

Tabela 4: Composição dos grupos de melhor e pior tempo de evolução pós-CRM.

Grupo	CRM n=37	
	Mulheres (n=10)	Homens (n=27)
Melhor evolução (Grupo 1)		
n	4	18
%	40	66,7
Pior evolução (Grupo 2)		
n	5	8
%	50	29,6
Pior evolução com óbito (Grupo 2)		
n	1	1
%	10	3,7

Nota: CRM = Cirurgia de Revascularização do Miocárdio

No Grupo 1, sete indivíduos apresentaram IMC<25 contra 14 acima de 25 (sobrepeso ou obesidade) e, no Grupo 2, quatro tinham IMC<25 contra onze com IMC>25, não houve diferença entre os dois grupos, assim como não foram encontradas diferenças nas demais características clínicas e cirúrgicas analisadas entre os dois grupos ($p>0,05$) (Tabela 5).

Tabela 5: Dados clínicos e cirúrgicos do Grupo 1 e Grupo 2.

Variável	Grupo 1 (n=22)		Grupo 2 (n=15)		p-valor
	Média ± DP	n (%)	Média ± DP	n (%)	
Idade (anos)	59±8	-	60±8	-	NS
Altura (cm)	167±7	-	163±9	-	NS
Peso (kg)	74±14	-	74±14	-	NS
Duração cirurgia (min)	243±59	-	258±64	-	NS
Duração CEC (min)	80±22	-	85±33	-	NS
IMC	26,1±3,5	-	27,3±4,4	-	NS
Diabetes	-	5 (22,7)	-	6 (40,0)	NS
Dislipidemia	-	12 (54,5)	-	8 (53,3)	NS
Hipertensão arterial	-	17 (77,3)	-	12 (80,0)	NS
Etilismo	-	2 (9,1)	-	4 (26,7)	NS
Tabagismo	-	7 (31,8)	-	4 (26,7)	NS

Nota: DP = desvio padrão/ NS = não significante ($p>0,05$ entre Grupo 1 e Grupo 2)

5.2 CINÉTICA DOS LEUCÓCITOS TOTAIS

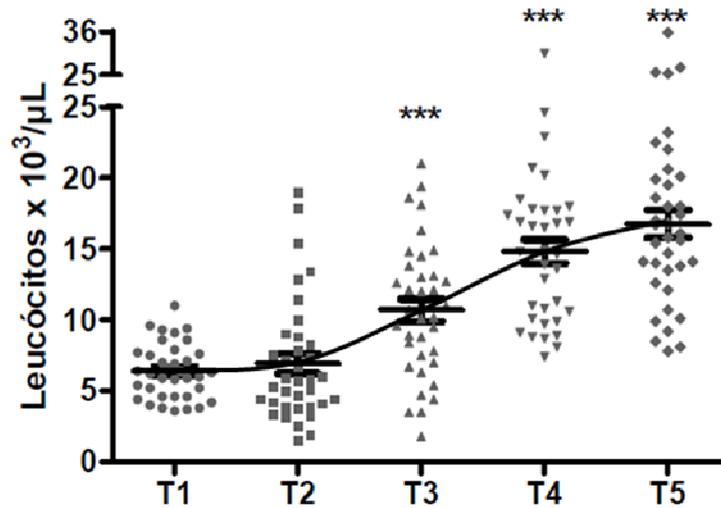
A média dos leucócitos totais dos pacientes, ao entrarem no estudo, foi $6,4 \times 10^3$ (amplitude: $3,6$ a $11,0 \times 10^3$ células/ μL), indicando que todos tinham valores de leucócitos dentro da faixa normal estabelecida pelo Hospital Santa Izabel que varia entre $3,5$ a $11,0 \times 10^3$ células/ μL . A contagem leucocitária aumentou em T2 (meia hora após instalação da CEC) ($p > 0,05$) e, a partir de T3, houve aumento significativo ($p < 0,001$ em relação à T1), ocorrendo leucocitose em T4 e T5 (24h e 48h pós-cirurgia) (Tabela 6 e Figura 7).

Tabela 6: Medidas de tendência central e dispersão da contagem de leucócitos totais de indivíduos submetidos à cirurgia de revascularização miocárdica com circulação extracorpórea. $n=37$, leucócitos $\times 10^3/\mu\text{L}$.

Tempos de coleta	Leucócitos $\times 10^3/\mu\text{L}$ ($n=37$)	
	Média \pm DP	Mediana
T1	$6,4 \pm 1,9$	6,3
T2	$6,6 \pm 3,9$	5,7
T3***	$10,8 \pm 4,7$	10,7
T4***	$15,0 \pm 4,9$	14,8
T5***	$16,9 \pm 5,9$	16,4

Nota: DP=desvio padrão (T1: após acesso venoso central; T2: 30 min após CEC; T3: antes da sutura final; T4: 24h pós-cirurgia; T5: 48h pós-cirurgia). *** $p < 0,001$.

Figura 7 - Cinética dos leucócitos totais em amostras de sangue periférico obtidas de indivíduos submetidos à cirurgia eletiva de revascularização do miocárdio com circulação extracorpórea.



Nota: T1: após acesso venoso central; T2: 30 min após CEC; T3: antes da sutura final; T4: 24h pós-cirurgia; T5: 48h pós-cirurgia. Resultados expressos em média \pm desvio padrão. *** $p \leq 0,001$ em relação a T1. (n=37)

5.3 CINÉTICA DAS SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS (n=37)

5.3.1 LINFÓCITOS T (CD3⁺)

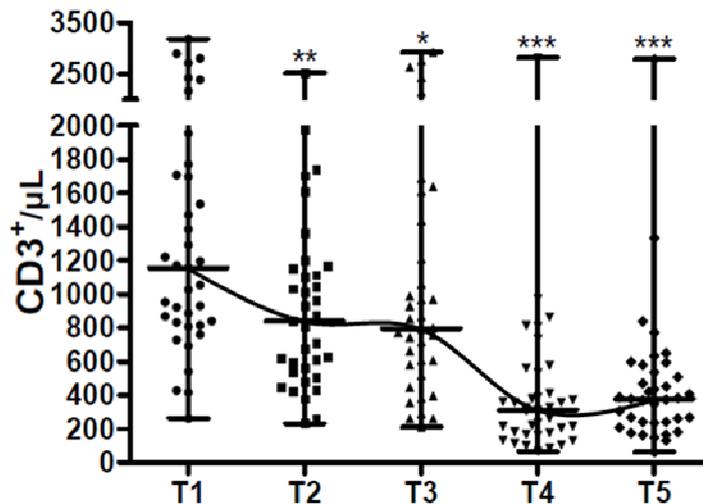
Os linfócitos T diminuíram gradualmente no intra-operatório ($p < 0,01$ e $p < 0,05$, em T2 e T3 em relação a T1, respectivamente). No pós-operatório houve queda acentuada dos níveis destas células, sendo observada a menor concentração em T4 (24h pós-cirurgia) ($p < 0,001$ em relação a T1) e, em T5, houve um leve aumento em relação a T4, porém permaneceu reduzido em relação a T1 ($p < 0,001$) (Tabela 7 e Figura 8).

Tabela 7: Quantificação dos linfócitos T totais de todos os indivíduos. Medidas de tendência central e de dispersão (n=37. Células/ μ L).

Todos (n=37)		
Tempo de coleta	Média \pm DP	Mediana (interquartil 25%-75%)
CD3⁺ T1	1347 \pm 754	1157 (832-1706)
T2	919 \pm 514	837 (546-1130)
T3	1033 \pm 738	795 (564-1265)
T4	415 \pm 468	311 (178-412)
T5	468 \pm 460	378(241-535)

Nota: DP=desvio padrão (T1: após acesso venoso central; T2: 30 min após CEC; T3: antes da sutura final; T4: 24h pós-cirurgia; T5: 48h pós-cirurgia).

Figura 8 - Cinética dos linfócitos T CD3⁺ em amostras de sangue periférico obtidas de indivíduos submetidos à cirurgia eletiva de revascularização do miocárdio com circulação extracorpórea.



Nota: T1: após acesso venoso central; T2: 30 min após CEC; T3: antes da sutura final; T4: 24h pós-cirurgia; T5: 48h pós-cirurgia. Resultados expressos em mediana \pm intervalo interquartil. * $p \leq 0,05$ em relação a T1; ** $p \leq 0,01$ em relação a T1; *** $p \leq 0,001$ em relação a T1. (n=37)

5.3.2 LINFÓCITOS T AUXILIARES (CD4⁺)

A concentração das células T CD4⁺ oscilou no período intra-operatório, permanecendo significativamente diminuída em T2 e T3 ($p < 0,001$ em relação a T1).

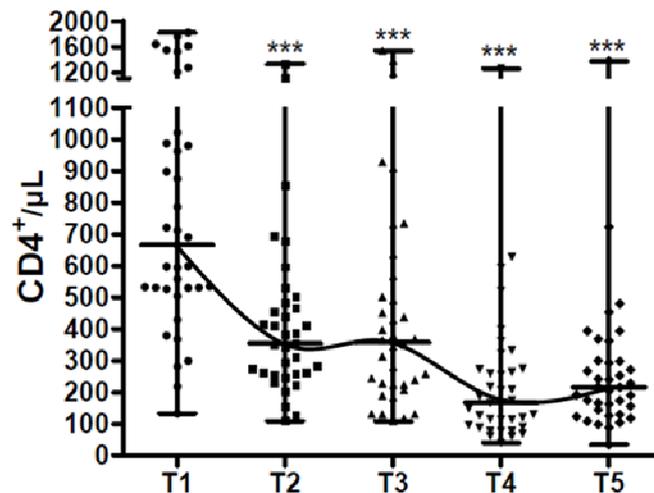
No pós-operatório, houve aumento gradual de T4 para T5, porém a concentração nestes dois momentos permaneceu reduzida em relação a T1 ($p < 0,001$). Em T4, houve a menor concentração quando comparado a todos os outros momentos (Tabela 8 e Figura 9).

Tabela 8: Quantificação dos linfócitos T auxiliares de todos os indivíduos. Medidas de tendência central e de dispersão (n=37. Células/ μ L).

Todos (n=37)		
Tempo de coleta	Média \pm DP	Mediana (interquartil 25%-75%)
CD4⁺ T1	806 \pm 457	665 (529-986)
T2	418 \pm 259	354 (259-474)
T3	453 \pm 352	358 (222-518)
T4	235 \pm 227	167 (96-273)
T5	267 \pm 231	216 (144-298)

Nota: DP=desvio padrão (T1: após acesso venoso central; T2: 30 min após CEC; T3: antes da sutura final; T4: 24h pós-cirurgia; T5: 48h pós-cirurgia).

Figura 9 - Cinética dos linfócitos T auxiliares (CD4⁺) em amostras de sangue periférico obtidas de indivíduos submetidos à cirurgia eletiva de revascularização do miocárdio com circulação extracorpórea.



Nota: T1: após acesso venoso central; T2: 30 min após CEC; T3: antes da sutura final; T4: 24h pós-cirurgia; T5: 48h pós-cirurgia. Resultados expressos em mediana \pm intervalo interquartil. *** $p \leq 0,001$ em relação a T1. (n=37)

5.3.3 LINFÓCITOS T CITOTÓXICOS (CD8⁺)

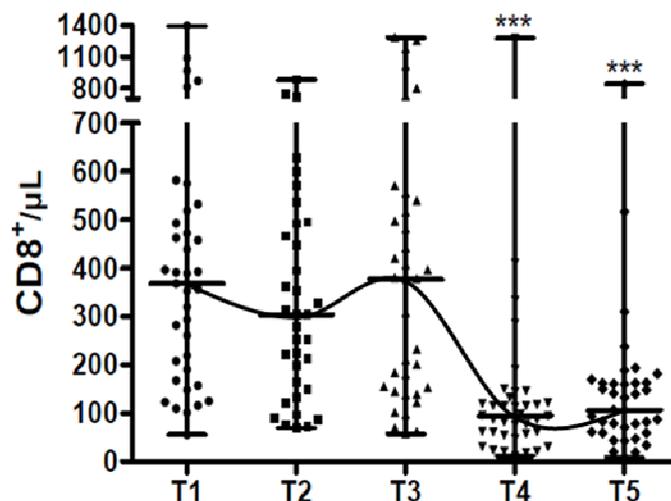
Os linfócitos T CD8 tiveram oscilação na sua concentração no intra-operatório, diminuindo em T2 e aumentando em T3 em comparação a T1 (ambos, $p > 0,05$). No pós-operatório, foi observada redução significativa em T4 e T5 ($p < 0,001$ em relação a T1), com a menor concentração destas células em T4 (Tabela 9 e Figura 10).

Tabela 9: Quantificação dos linfócitos T citotóxicos de todos os indivíduos. Medidas de tendência central e de dispersão (n=37. Células/ μ L).

Todos (n=37)		
Tempo de coleta	Média \pm DP	Mediana (interquartil 25%-75%)
CD8⁺ T1	410 \pm 296	368 (190-493)
T2	333 \pm 215	304 (157-479)
T3	410 \pm 338	378 (151-522)
T4	138 \pm 210	95 (58-122)
T5	144 \pm 150	107 (61-162)

Nota: DP=desvio padrão (T1: após acesso venoso central; T2: 30 min após CEC; T3: antes da sutura final; T4: 24h pós-cirurgia; T5: 48h pós-cirurgia).

Figura 10 - Cinética dos linfócitos T citotóxicos (CD8⁺) em amostras de sangue periférico obtidas de indivíduos submetidos à cirurgia eletiva de revascularização do miocárdio com circulação extracorpórea.



Nota: T1: após acesso venoso central; T2: 30 min após CEC; T3: antes da sutura final; T4: 24h pós-cirurgia; T5: 48h pós-cirurgia. Resultados expressos em mediana \pm intervalo interquartil. *** $p \leq 0,001$ em relação a T1. (n=37)

5.3.4 LINFÓCITOS B (CD19⁺)

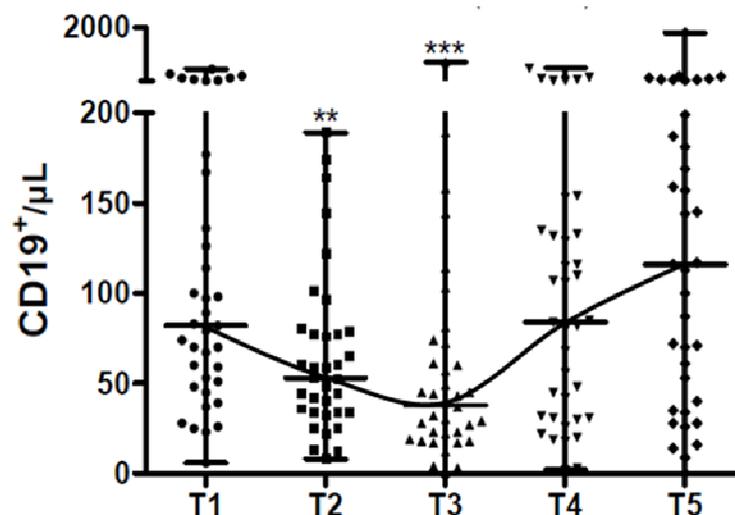
Os linfócitos B tiveram redução gradual na sua concentração no intra-operatório, atingindo seu mínimo em T3 ($p < 0,001$ em relação a T1). Houve aumento progressivo no pós-operatório, em que as concentrações em T4 e T5 foram maiores do que T1, porém sem diferença significativa ($p > 0,05$) (Tabela 10 e Figura 11).

Tabela 10: Quantificação dos linfócitos B de todos os indivíduos. Medidas de tendência central e de dispersão (n=37. Células/ μ L).

Todos (n=37)			
	Tempo de coleta	Média \pm DP	Mediana (interquartil 25%-75%)
CD19 ⁺	T1	129 \pm 128	82 (51-167)
	T2	65 \pm 46	53 (34-78)
	T3	71 \pm 137	38 (21-64)
	T4	112 \pm 118	84 (31-133)
	T5	175 \pm 294	116 (40-199)

Nota: DP=desvio padrão (T1: após acesso venoso central; T2: 30 min após CEC; T3: antes da sutura final; T4: 24h pós-cirurgia; T5: 48h pós-cirurgia).

Figura 11 - Cinética dos linfócitos B (CD19⁺) em amostras de sangue periférico obtidas de indivíduos submetidos à cirurgia eletiva de revascularização do miocárdio com circulação extracorpórea.



Nota: T1: após acesso venoso central; T2: 30 min após CEC; T3: antes da sutura final; T4: 24h pós-cirurgia; T5: 48h pós-cirurgia. Resultados expressos em mediana \pm intervalo interquartil. ** $p \leq 0,01$ em relação a T1; *** $p \leq 0,001$ em relação a T1. (n=37)

5.3.5 CÉLULAS NATURAL KILLER (CD56⁺)

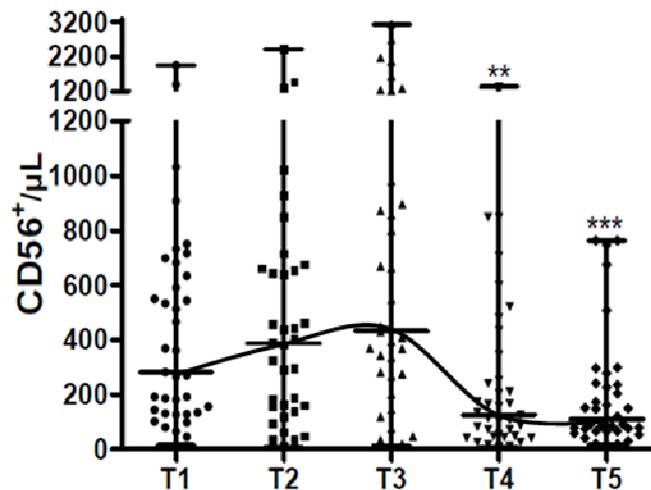
Durante o período intra-operatório (T2 e T3), as células *natural killer* apresentaram aumento progressivo na sua contagem, sem diferença significativa ($p > 0,05$ em relação a T1). Após o procedimento cirúrgico, a concentração destas células diminuiu gradualmente em T4 ($p < 0,01$ em relação a T1) e T5 ($p < 0,001$ em relação a T1), apresentando menor concentração em T5, quando comparado a todos os outros momentos (Tabela 11 e Figura 12).

Tabela 11: Quantificação das células *natural killer* de todos os indivíduos. Medidas de tendência central e de dispersão (n=37. Células/ μ L).

Todos (n=37)			
Tempo de coleta	Média\pmDP	Mediana (interquartil 25%-75%)	
T1	438 \pm 409	282 (134-634)	
T2	491 \pm 491	387 (159-656)	
CD56⁺	T3	434 (272-916)	
	T4	125 (49-253)	
	T5	110 (66-235)	

Nota: DP=desvio padrão (T1: após acesso venoso central; T2: 30 min após CEC; T3: antes da sutura final; T4: 24h pós-cirurgia; T5: 48h pós-cirurgia).

Figura 12 - Cinética das células *natural killer* (CD56⁺) em amostras de sangue periférico obtidas de indivíduos submetidos à cirurgia eletiva de revascularização do miocárdio com circulação extracorpórea



Nota: T1: após acesso venoso central; T2: 30 min após CEC; T3: antes da sutura final; T4: 24h pós-cirurgia; T5: 48h pós-cirurgia. Resultados expressos em mediana \pm intervalo interquartil. ** $p \leq 0,01$ em relação a T1; *** $p \leq 0,001$ em relação a T1. (n=37)

5.4 COMPARAÇÃO DA CINÉTICA DAS SUBPOPLUAÇÕES LINFOCITÁRIAS ENTRE O GRUPO 1 E GRUPO 2

Após observações feitas no conjunto completo das amostras (n=37), sem distinção de grupos, foram comparados os dados obtidos da divisão dos pacientes nos grupos de melhor (n=22) e pior (n=15) tempo de evolução pós-cirúrgica, com a finalidade de verificar a existência de diferença na cinética das células entre estes grupos.

Nos dois grupos, a contagem dos linfócitos CD19⁺ foi semelhante no período intra-operatório, diminuindo de T1 a T3. No Grupo 1, o valor de T1 foi superado em T4, seguindo com aumento em T5 ($p > 0,05$ em relação a T1), enquanto no Grupo 2, o valor de T4 foi menor do que T1, superando este último somente em T5 ($p > 0,05$). O fenótipo CD19⁺, de ambos os grupos, teve sua contagem mínima em T3 (Tabela 12 e Figura 13).

O principal achado deste estudo está na diferença da concentração dos linfócitos B (CD19⁺) nos tempos T1 e T2 entre o Grupo 1 e 2, indicando que os pacientes do

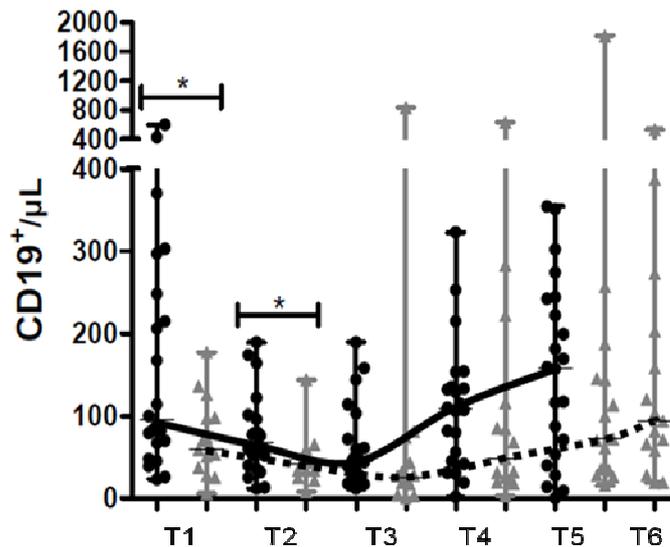
Grupo 2, aqueles que permaneceram mais tempo na unidade de terapia intensiva, iniciaram o processo cirúrgico com menor concentração de linfócitos B quando comparados ao Grupo 1 ($p < 0,05$) (Tabela 12 e Figura 13).

Tabela 12: Quantificação dos linfócitos B (CD19⁺) de acordo com a evolução pós-cirúrgica. Medidas de tendência central e de dispersão (Células/ μ L).

	Grupo 1 (n=22)		Grupo 2 (n=15)	
	Média \pm DP	Mediana (interquartil 25%-75%)	Média \pm DP	Mediana (interquartil 25%-75%)
CD19⁺				
T1*	168 \pm 151	95 (68-240)	73 \pm 46	60 (44-98)
T2*	76 \pm 49	68 (43-92)	46 \pm 33	42 (34-48)
T3	62 \pm 49	45 (29-69)	86 \pm 215	25 (18-40)
T4	111 \pm 78	109 (48-135)	112 \pm 163	48 (24-101)
T5	154 \pm 110	158 (58-237)	207 \pm 450	72 (35-145)

Nota: DP=desvio padrão/Grupo 1=melhor tempo de evolução pós-cirúrgica/Grupo 2=piores tempo de evolução pós-cirúrgica (T1: após acesso venoso central; T2: 30 min após CEC; T3: antes da sutura final; T4: 24h pós-cirurgia; T5: 48h pós-cirurgia). * $p < 0,05$ – entre T1 do Grupo 1 *versus* T1 do Grupo 2 e entre T2 do Grupo 1 *versus* T2 do Grupo 2.

Figura 13 - Cinética dos linfócitos B (CD19⁺) de acordo com o tempo de evolução pós-cirúrgica.



Nota: Amostras de sangue periférico obtidas de indivíduos submetidos à cirurgia eletiva de revascularização do miocárdio com circulação extracorpórea. Grupo 1 (melhor tempo de evolução pós-cirúrgica): Círculos/barras pretas/linha sólida preta e Grupo 2 (piores tempo de evolução pós-cirúrgica): Triângulos/barras cinzas/linha pontilhada preta. Resultados expressos em mediana e intervalo interquartil para as subpopulações linfocitárias. * $p \leq 0,05$. T1: após acesso venoso central; T2: 30 min após CEC; T3: antes da sutura final; T4: 24h pós-cirurgia; T5: 48h pós-cirurgia, T6: 72h pós-cirurgia.

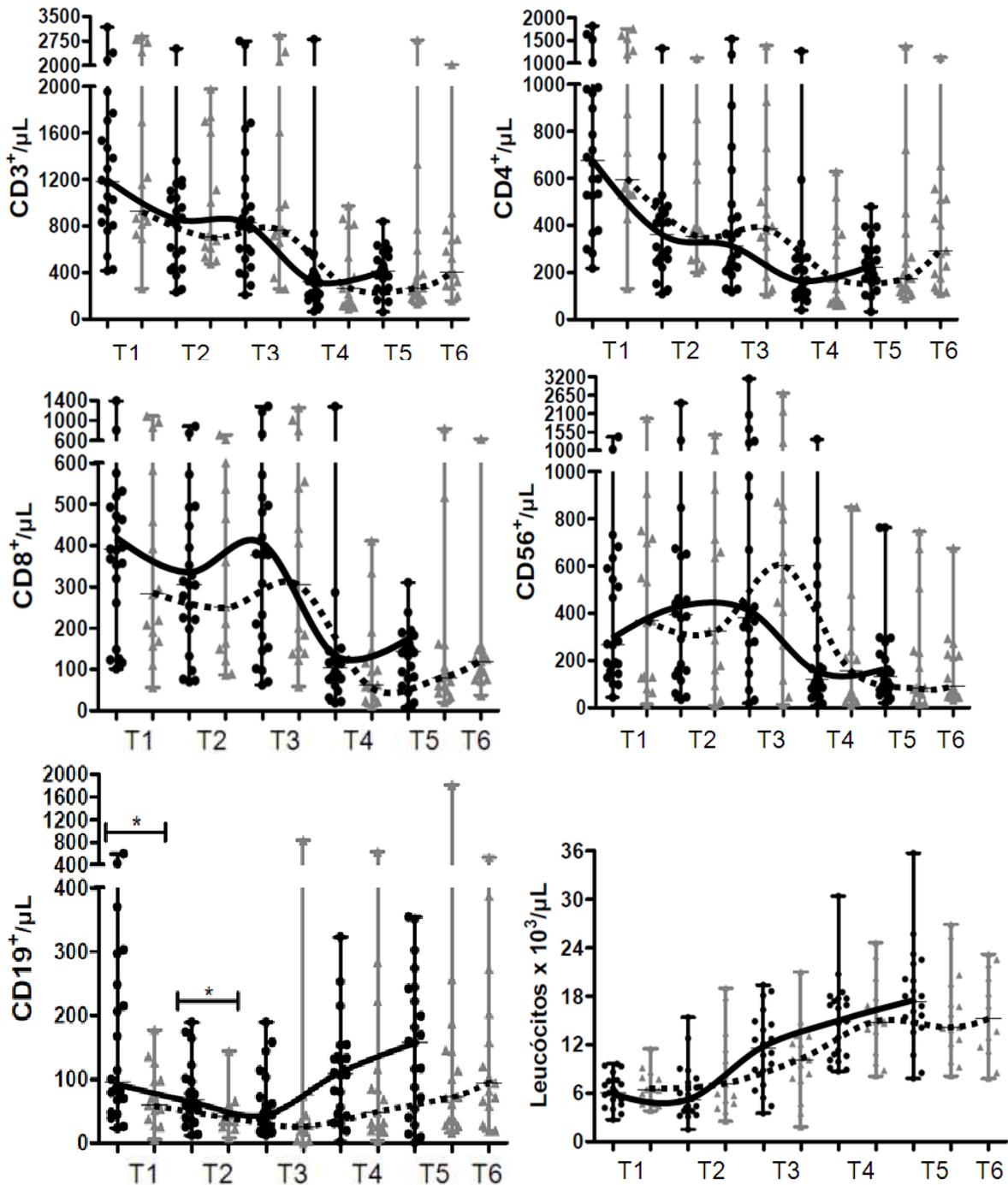
Os linfócitos analisados, com exceção do CD4⁺ e CD56⁺, apresentaram tendência a menores níveis durante todo o período perioperatório. As células CD3⁺, CD4⁺ e CD8⁺ de ambos os grupos tiveram concentração mínima em T4. As células NK do grupo 1 tiveram menor concentração em T4, enquanto no grupo 2, apresentaram o nível mínimo em T5. Em nenhum dos grupos, os valores basais das subpopulações (T1) foram alcançados em T5. Os leucócitos totais de ambos os grupos mantiveram aumento desde o intra-operatório até o pós-operatório, havendo leucocitose nos dois últimos tempos analisados (Tabela 13 e Figura 14).

Tabela 13: Quantificação linfocitária do Grupo 1 e Grupo 2. Medidas de tendência central e de dispersão (n=37. Células/ μ L).

		Grupo 1 (n=22)		Grupo 2 (n=15)	
		Média \pm DP	Mediana (interquartil 25%-75%)	Média \pm DP	Mediana (interquartil 25%-75%)
CD3⁺	T1	1315 \pm 677	1182 (854-1663)	1394 \pm 878	930 (827-2057)
	T2	859 \pm 496	855 (474-1088)	1021 \pm 547	710 (610-1607)
	T3	984 \pm 686	825 (533-1171)	1111 \pm 835	764 (675-1454)
	T4	430 \pm 554	319 (208-387)	394 \pm 319	263 (132-672)
	T5	415 \pm 185	413 (288-528)	544 \pm 694	268 (195-491)
CD4⁺	T1	774 \pm 435	678 (527-975)	853 \pm 499	594 (530-1241)
	T2	393 \pm 254	360 (259-463)	461 \pm 273	354 (260-595)
	T3	439 \pm 364	312 (222-477)	476 \pm 345	388 (261-551)
	T4	239 \pm 257	167 (115-259)	230 \pm 182	175 (78-348)
	T5	237 \pm 108	223 (168-297)	311 \pm 340	174 (128-317)
CD8⁺	T1	416 \pm 280	390 (276-488)	403 \pm 328	282 (179-520)
	T2	330 \pm 213	304 (204-434)	337 \pm 226	252 (150-537)
	T3	398 \pm 324	378 (160-493)	429 \pm 370	304 (143-551)
	T4	154 \pm 257	105 (77-122)	115 \pm 116	63 (43-132)
	T5	135 \pm 71	145 (85-168)	158 \pm 223	79 (53-133)
CD56⁺	T1	402 \pm 343	268 (162-579)	493 \pm 498	368 (129-708)
	T2	486 \pm 526	394 (158-597)	501 \pm 447	324 (161-714)
	T3	708 \pm 766	381 (276-958)	796 \pm 785	604 (302-867)
	T4	243 \pm 312	119 (75-233)	241 \pm 281	157 (44-294)
	T5	193 \pm 201	134 (75-221)	206 \pm 241	85 (61-238)
Leucócitos totais (x10³)	T1	6,3 \pm 2,0	6,1 (5,1-7,5)	6,6 \pm 2,1	6,4 (5,0-7,8)
	T2	6,1 \pm 3,4	5,2 (3,8-7,4)	8,4 \pm 5,0	7,1 (4,9-10,7)
	T3	11,4 \pm 4,7	11,6 (8,4-14,6)	10,0 \pm 4,8	10,1 (7,7-12,6)
	T4	14,9 \pm 5,2	14,9 (10,6-17,7)	15,2 \pm 4,8	14,8 (12,3-17,3)
	T5	17,8 \pm 6,1	17,4 (14,7-20,1)	15,7 \pm 5,5	14,1 (12,4-18,3)

Nota: DP=desvio padrão/Grupo 1=melhor tempo de evolução pós-cirúrgica/Grupo 2=pior tempo de evolução pós-cirúrgica. T1: após acesso venoso central; T2: 30 min após CEC; T3: antes da sutura final; T4: 24h pós-cirurgia; T5: 48h pós-cirurgia.

Figura 14 - Distribuição da contagem de linfócitos T totais (CD3⁺), linfócitos T auxiliares (CD4⁺), linfócitos T citotóxicos (CD8⁺), células NK (CD56⁺) e linfócitos B (CD19⁺), por citometria de fluxo, e contagem de leucócitos totais em amostras sangue periférico obtidas de indivíduos submetidos à cirurgia eletiva de revascularização do miocárdio com circulação extracorpórea.



Nota: Grupo 1 (melhor tempo de evolução pós-cirúrgica): Círculos/barras pretas/linha sólida preta e Grupo 2 (pior tempo de evolução pós-cirúrgica): Triângulos/barras cinzas/linha pontilhada preta. Resultados expressos em mediana e intervalo interquartil para as subpopulações linfocitárias e em média e desvio padrão para os leucócitos totais. *p<0,05. T1: após acesso venoso central; T2: 30 min após CEC; T3: antes da sutura final; T4: 24h pós-cirurgia; T5: 48h pós-cirurgia, T6: 72h pós-cirurgia.

Desde os anos 70, têm sido estudadas as alterações imunológicas decorrentes de cirurgias de grande porte, sendo a magnitude da resposta imune proporcional à disfunção orgânica pós-operatória (BANZ; JAKOB; INDERBITZIN, 2011). A inflamação caracteriza-se pela resposta sistêmica a todos os tipos de danos, incluindo procedimentos cirúrgicos. Acredita-se que a resposta imune pós-operatória seja, inicialmente, pró-inflamatória, ativando a imunidade no local da lesão, e esta resposta induz uma resposta antiinflamatória sistêmica, causando supressão da atividade celular, influenciando na susceptibilidade às infecções virais, bacterianas e fúngicas, além da síndrome de disfunção de múltiplos órgãos e morte (BARTAL et al., 2009; MARCINIAK-SROKA et al., 2011). Há anos vem sendo discutida a diminuição da função e do número de linfócitos circulantes em pacientes submetidos à cirurgia de revascularização miocárdica com circulação extracorpórea (BRODY et al., 1987; CIOCA; WATANABE; ISOBE, 2000; DELOGU et al., 2000; RINDER et al., 1997; ROTH et al., 1981; UTLEY, 1993).

A leucometria acima de 12×10^3 células/ μL , associada a outras condições, compõe o quadro clínico da síndrome da resposta inflamatória sistêmica, segundo o *American College of Chest Physicians* (1992 apud RIBEIRO, 2004). No presente estudo, foi encontrada elevação do número de leucócitos durante e após procedimento cirúrgico, provavelmente pela resposta inflamatória gerada pelo aumento dos fatores pró-inflamatórios, como a exposição sanguínea a superfície não-fisiológica da CEC, diminuição do fluxo sanguíneo pulmonar durante o pinçamento da aorta, hipotermia, além do trauma à cirurgia de grande porte (HABERMEHL et al., 2003; MARCINIAK-SROKA et al., 2011; MCBRIDE et al., 1995; RUDENSKY et al., 2010). O aumento dos leucócitos pode ser explicado pelo aumento do número polimorfonucleares, principalmente de neutrófilos, já que estas células são rapidamente desmarginalizadas em situações de estresse, além de apresentarem atividade apoptótica reduzida após o procedimento cirúrgico ou durante a síndrome inflamatória sistêmica, enquanto os linfócitos apresentam diminuição do seu número e aumento da indução de apoptose e outros fatores descritos a seguir (CIOCA; WATANABE; ISOBE, 2000; PELLEGRINI et al., 2000).

Com exceção das células *natural killer*, o número absoluto de todos os linfócitos estudados diminuiu nos trinta minutos após instalação da CEC. Alguns autores

sugerem que a diminuição dos linfócitos circulantes após instalação da CEC pode ou não sofrer influência da hemodiluição, além disso, tanto a redistribuição de células entre o sangue periférico e medula óssea quanto o seqüestro tecidual destas, assim como a perda de células por sangramento, adesão ao sistema da CEC, apoptose ou combinação destes são fatores para a menor concentração no pós-operatório imediato (BRODY et al., 1987; CIOCA; WATANABE; ISOBE, 2000; DELOGU et al., 2000; RINDER et al., 1997; ROTH et al., 1981; UTLEY, 1993). Outra possível explicação deve-se à ativação celular que causa aumento da expressão de receptores de adesão nos linfócitos e células endoteliais, podendo promover a saída daquelas células da circulação (DELOGU et al., 2000; RINDER et al., 1997).

A redução na contagem absoluta de linfócitos em pacientes submetidos ao trauma cirúrgico pode estar relacionada ao estresse fisiológico de pacientes nessas condições, o que leva ao aumento da liberação de glicocorticóides endógenos e produção de cortisol, os quais induzem a apoptose linfocitária e diminuem a diferenciação e proliferação destas células (BIAN et al., 2010; MARCINIAK-SROKA et al., 2011; SULIMAN et al., 2010; URRÁ, et al., 2009).

A resposta Th apropriada apresenta participação fundamental na reação imunológica após trauma cirúrgico. Tem sido relatado que a função desta resposta sofre alteração após cirurgia cardíaca, havendo desequilíbrio entre as respostas Th1 e Th2, com aumento da atividade das células Th2 e atraso na recuperação da atividade das células Th1, o que pode predispor os pacientes a complicações e pior recuperação pós-cirurgia. A elevação da contagem de linfócitos B pode ser explicada, segundo Marcianak-Sroka et al. (2011), pela ação dos glicocorticóides endógenos e catecolaminas que levam à mudança da resposta Th1 (celular) para resposta Th2 (humoral). Bartal et al. (2009) avaliaram o número de leucócitos e observaram diminuição do número de linfócitos circulantes seguinte às cirurgias de grande porte, exceto o número de células B que permaneceu inalterado.

Urra et al. (2009) pesquisaram o papel das diferentes subpopulações linfocitárias em pacientes com imunodepressão induzida por acidente vascular cerebral (AVC). Seus resultados corroboraram com outros autores no que diz respeito à linfocitopenia após AVC agudo, estando esta diminuição altamente correlacionada com o aumento

da apoptose. Nos pacientes deste estudo, os linfócitos B já estavam diminuídos na admissão hospitalar havendo tendência estatística da associação entre níveis mais baixos de células CD19⁺ na admissão e pior recuperação pós-AVC. Foi especulado que esta associação se deu em virtude da redução da sinalização antiinflamatória (neuroprotetora) pelas células B ao cérebro lesado. De acordo com os nossos achados, os pacientes que permaneceram mais tempo internados na unidade de terapia intensiva (Grupo 2) já tinham menores valores de linfócitos B no início da cirurgia, sugerindo que os pacientes do Grupo 2 estavam mais susceptíveis à complicações pós-cirúrgicas, neste caso, representado pelo tempo de internação em UTI.

O aumento da resposta endócrina, acompanhado do aumento nas concentrações de adrenalina e cortisol como resultado de estresse físico (como cirurgia e exercício) e estresse mental agudo, causa aumento instantâneo na atividade das células NK, principalmente (GREISEN et al., 1999). Akbas et al. (2002) observaram diminuição dos valores absolutos das células NK após CEC, acompanhada do aumento da sua atividade, sugerindo a possibilidade da ativação da imunidade não-específica após CEC.

De acordo com outros estudos (NGUYEN; MULDER; SHENNIB, 1992; TAJIMA et al., 1993), neste trabalho, as células T CD8⁺ mostraram oscilação no intra-operatório. Os fenótipos CD3⁺, CD4⁺ e CD8⁺ apresentaram a menor concentração por mL de sangue após 24h do procedimento cirúrgico em relação a todos os períodos observados, estando de acordo com os dados obtidos no estudo de Franke et al. (2006). Porém, em oposição ao estudo citado, no qual foram encontrados valores aumentados, em sangue periférico, de linfócitos T (CD3⁺) e linfócitos T helper (CD4⁺) imediatamente após a cirurgia, os valores encontrados no presente estudo estavam diminuídos ao final da cirurgia. Por outro lado, corroborando com os achados de Franke et al. (2006), as células T citotóxicas e *natural killer* aumentaram neste momento, embora este crescimento não tenha apresentado diferença estatisticamente significativa.

Delogu et al. (2000) avaliaram a atividade de alguns fatores apoptóticos nos linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ em pacientes submetidos a estresse cirúrgico e em

indivíduos controles normais, não sendo encontrado aumento dos fatores de apoptose nos controles e nas amostras obtidas no pré-operatório (valores basais). Ao contrário, 24h após a cirurgia, os pacientes apresentaram elevada taxa de apoptose (aumento da expressão de sistemas de sinalização pró-apoptótica – Fas e FasL e ICEp20/caspase-1 – e *down-regulation* dos sinais anti-apoptóticos – Bcl-2) das células CD4⁺ e CD8⁺, retornando aos valores basais somente 96 horas após o procedimento. Essas variações na atividade apoptótica dos linfócitos foram acompanhadas pela diminuição linfócitos CD4 24h pós-cirurgia e recuperação dos níveis basais após 96h, enquanto as células CD8⁺ não mudaram em nenhum momento quando comparadas aos níveis basais. Ainda, puderam estabelecer um nível de *cut-off* de 12% na frequência de apoptose das células CD8⁺ sendo os valores iguais ou maiores do que este *cut-off* preditores de infecção pós-cirúrgica.

Rinder et al. (1997), ao avaliarem alterações nas subpopulações de linfócitos e monócitos em indivíduos com menos de 65 anos e com mais de 75 anos em cirurgia cardíaca, encontraram redução significativa da contagem das mesmas subpopulações, deste estudo, no 1ºDPO. Com exceção do fenótipo CD56⁺, todas as células aumentaram no 3ºDPO (72h), mas somente o fenótipo CD19⁺ retornou ao nível basal (pré-operatório) neste momento. As células NK (CD56⁺) permaneceram com contagem diminuída no 3ºDPO. Nossos dados são concordantes no que diz respeito à menor concentração destas células no 1ºDPO, com exceção das células B, que atingem os níveis basais nesse momento, superando esses valores no 2ºDPO. Rudensky et al., 2010, também encontraram valores dos linfócitos T totais, auxiliares, citotóxicos, linfócitos B e células NK diminuídos significativamente no 1ºDPO.

Tem sido sugerido que o equilíbrio entre as citocinas pró- e antiinflamatórias tem papel fundamental no prognóstico clínico após cirurgia cardíaca. Holmes et al. (2002), avaliaram o perfil de TNF- α , IL-6, IL-8, C3a, C5a, histamina e elastase e concluíram que a elevação da IL-6, IL-8 e C3a pode ser correlacionada com mau prognóstico em cirurgia cardíaca. Dessa forma, a magnitude da resposta inflamatória age de forma negativa sobre a evolução clínica.

Bian et al. (2010) avaliaram a contagem relativa de linfócitos como fator preditivo de doença cardíaca coronária, observando que a redução da porcentagem de linfócitos tem associação com pior prognóstico para síndrome coronária aguda. Nossos dados corroboram com seus achados, em virtude de todas as subpopulações analisadas tenderam a estar diminuídas nos pacientes com pior tempo de evolução pós-cirúrgica.

Ao avaliar variáveis imunológicas no perioperatório de cirurgias cardíacas de troca valvar e revascularização do miocárdio com CEC, Rudensky et al. (2010), dividiram os pacientes em dois grupos, de acordo com a presença ou ausência de infecção da ferida cirúrgica no pós-operatório. Não foram encontradas diferenças nos parâmetros analisados: CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD56⁺, CD19⁺, monócitos, granulócitos, tanto em valores relativos quanto absolutos, entre os dois grupos. Portanto, estes parâmetros não foram preditivos de infecção.

Na tentativa de associar a contagem linfocitária com gravidade da sarcoidose, Sweiss et al. (2010) quantificaram os linfócitos CD4⁺, CD8⁺ e CD19⁺ em 28 indivíduos com sarcoidose e 100 indivíduos controles. A maioria dos pacientes com sarcoidose exibiu valores menores das três subpopulações estudadas quando comparados aos controles. Ainda, os pacientes com comprometimento severo dos órgãos (forma de manifestação da doença), apresentaram menor concentração das subpopulações do que aqueles indivíduos que não manifestaram a doença, sugerindo que os linfócitos são reduzidos no sangue periférico devido à infiltração aos órgãos-alvo. Além disso, a linfocitopenia pode representar a supressão da linfogênese sob influência de citocinas e outros fatores ou pelo aumento da destruição periférica decorrente da morte celular por ativação e outros mecanismos. Estas hipóteses podem explicar a tendência à menor concentração de todos os linfócitos avaliados neste estudo.

Os fatores de risco para doenças cardiovasculares são classificados em não-modificáveis, como idade, gênero, etnia e histórico familiar de aterosclerose, e fatores modificáveis, dislipidemia, hipertensão arterial, diabetes, tabagismo, etilismo, estresse, uso de drogas, obesidade e sedentarismo, dentre outros (BERLEZI, 2007; KUMAR et al., 2005). Neste estudo, não houve associação entre idade, gênero,

dislipidemia, hipertensão arterial, diabetes, tabagismo, obesidade com tempo de evolução pós-cirúrgica.

No presente estudo somente se avaliou quantitativamente as subpopulações linfocitárias, sendo encontradas diferenças na cinética das subpopulações analisadas. Contudo, existe possibilidade de haver diferenças qualitativas na resposta imune, medidas pela concentração de citocinas, hormônios do estresse e fatores pró- e antiinflamatórios, sendo necessárias novas investigações que contemplem as limitações apresentadas neste estudo. Entre a perspectiva deste grupo de pesquisa está a dosagem destes fatores para que possam fornecer dados para corroborar com os achados atuais e, possivelmente, auxiliar na prática clínica.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi encontrada variação da distribuição linfocitária (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD56⁺ e CD19⁺) no decorrer do período perioperatório de cirurgia de revascularização com circulação extracorpórea. No intra-operatório houve diminuição das células CD3⁺ e CD19⁺, enquanto as células CD4⁺ e CD8⁺ oscilaram sem uma tendência particular durante este tempo, e as CD56⁺ aumentaram. Os leucócitos totais apresentaram aumento gradual neste período. No pós-operatório, as células CD3⁺, CD4⁺ e CD8⁺ apresentaram menor concentração no primeiro dia após o procedimento, as células CD19⁺ e os leucócitos totais aumentaram progressivamente, enquanto as CD56⁺ diminuíram. As subpopulações celulares estudadas apresentaram tendência à menor distribuição no grupo com pior tempo de evolução pós-cirúrgica, em relação ao grupo com melhor tempo de evolução. Somente os linfócitos B apresentaram-se significativamente diminuídos no grupo com pior evolução nos estágios iniciais da cirurgia, indicando que os pacientes deste grupo iniciavam a cirurgia com menor concentração destas células.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

AKBAS, H. et al. Effects of coronary artery bypass grafting on cellular immunity with or without cardiopulmonary bypass: changes in lymphocytes subsets. **Cardiovascular Surgery**, Kocaeli, v. 10, n. 6, p. 586-589, dez. 2002.

ARTHUR, H. M. et al. Effect of a Preoperative Intervention on Preoperative and Postoperative Outcomes in Low-Risk Patients Awaiting Elective Coronary Artery Bypass Graft Surgery. **Annals of Internal Medicine**, West Haven, v. 133, n. 4, p. 153-262, 15 ago. 2000.

ASIMAKOPOULOS, G.; GOURLAY, T. A review of anti-inflammatory strategies in cardiac surgery. **Perfusion**, London, v. 18, p. 7-12, 2003.

AULER, J. O. C. J.; CHIARONI, S. Circulação Extracorpórea: Prevenção e manuseio de complicações. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, São Paulo, v. 50, n. 6, p. 464-469, 2000.

BANZ, V. M.; JAKOB, S. M.; INDERBITZIN, D. Improving Outcome After Major Surgery: Pathophysiological Considerations. **Anesthesia & Analgesia**, Bern, v. 112, n. 5, p. 1147-1155, maio 2011.

BARTAL, I. et al. Immune perturbations in patients along the perioperative period: Alterations in cell surface markers and leukocyte subtypes before and after surgery. **Brain, Behavior, And Immunity**, Tel Aviv, v. 24, p. 376-386, 28 fev. 2009.

BERLEZI, E. M. **Estudo dos fatores de risco para doenças cardiovasculares em indivíduos hipertensos adscritos a uma unidade de saúde da família**. 2007. 133 f. Tese (Doutorado) - Curso de Gerontologia Biomédica, Departamento de Instituto de Geriatria e Gerontologia Biomédica, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

BIAN, C. et al. Predictive value of the relative lymphocyte count in coronary heart disease. **Heart Vessels**, Hangzhou, v. 25, p. 469-473, 05 out. 2010.

BISSET, L. R. et al. Reference values for peripheral blood lymphocyte phenotypes applicable to the healthy adult population in Switzerland. **European Journal of Haematology**, v. 12, p. 203-212, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Inquérito Domiciliar sobre Comportamentos de Risco e Morbidade Referida de Doenças e Agravos não Transmissíveis. Brasil, 15 capitais e Distrito Federal 2002–2003**. Rio de Janeiro: Inca, 2002-2003.

_____. **Envelhecimento e saúde da pessoa idosa: Cadernos de Atenção Básica**. Brasília: MS, 2006. (A).

BRODY, J. I. et al. Altered lymphocyte subsets during cardiopulmonary bypass. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 87, n. 5, p. 26-628, maio 1987.

BROWN, M.; WITTNER, C. Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. **Clinical Chemistry**, v. 46, n. 8, p. 1221-1229, 2000.

CHANG, H. et al. Prognostic relevance of immunophenotyping in 379 patients with acute myeloid leukemia. **Leukemia Research**, v. 28, p. 43-48, 2004.

CHNG, W. J.; TAN, G. B.; KUPERAN, P. Establishment of adult peripheral blood lymphocyte subset reference range for an Asian population by single-platform flow cytometry: influence of age, sex, and race and comparison with other published studies. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Singapore, v. 11, n. 1, p. 168-173, 2004.

CIOCA, D. P.; WATANABE, N.; ISOBE, M. Apoptosis of Peripheral Blood Lymphocytes is Induced by Catecholamines. **Japanese Heart Journal**, Tokyo, v. 41, n. 3, p. 385-399, 26 jan. 2000.

COMANS-BITTER, W. M. et al. Immunophenotyping of blood lymphocytes in childhood. **Journal of Pediatrics**, v. 130, p. 388-393, 1997.

DEBLIER, I. et al. Markers of inflammation and oxidative stress in patients undergoing CABG with CPB with and without ventilation of the lungs: a pilot study. **Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery**, Antwerp, v. 5, p. 387-391, 10 abr. 2006.

DELOGU, G. et al. Apoptosis and surgical trauma. **Archives of Surgery**, Rome, v. 135, p. 1141-1147, 2000.

VASCONCELOS, P. O.; CARMONA, M. J. C.; AULER JÚNIOR, J. O. C. Peculiaridades no pós-operatório de cirurgia cardíaca no paciente idoso. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 54, n. 5, p. 707-727, 2004.

FLEISHER, T. A.; OLIVEIRA, J. B. Functional and molecular evaluation of lymphocytes. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, Bethesda, v. 114, n. 2, p. 227-234, ago. 2004.

FRANKE, A. et al. Hyporesponsiveness of T cell subsets after cardiac surgery: a product of altered cell function or merely a result of absolute cell count changes in peripheral blood? **European Journal of Cardio-thoracic Surgery**, Koblenz, v. 30, p. 64-71, 03 mar. 2006.

GREASON, K. L.; SCHAFF, H. V. Myocardial Revascularization by Coronary Arterial Bypass Graft: Past, Present, and Future. **Current Problems in Cardiology**, v. 36, p. 385-399, set. 2011.

GREISEN, J. et al. Acute pain induces an instant increase in natural killer cell cytotoxicity in humans and this response is abolished by local anaesthesia. **British Journal of Anaesthesia**, Aarhus, v. 83, n.2, p. 235-240, 12 jan. 1999.

HABERMEHL, P. et al. Changes in lymphocyte subsets after cardiac surgery in children. **European Journal of Pediatrics**, Mainz, v. 162, p. 15-21, 2003.

HAWLEY, T. S.; HAWLEY, R. G. **Methods in Molecular Biology: Flow Cytometry Protocols**. 2. ed. New York: Humana Press, 2004.

HERZENBERG, L. A., DE ROSA, S.C. Monoclonal antibodies and the FACS: complementary tools for immunology and medicine. **Immunology Today**, v. 21, n. 8, p. 383-390, ago. 2000.

HOLMES, J. H. et al. Magnitude of the inflammatory response to cardiopulmonary bypass and its relation to adverse clinical outcomes. **Inflammation Research**, Seattle, v. 51, n. 12, p. 579-586, 02 jul. 2002.

JENTSCH-ULLRICH, K. et al. Lymphocyte subsets' reference ranges in an age- and gender-balanced population of 100 healthy adults — A monocentric German study: Contemporary Analysis of 31 Midwestern Hospitals. **Clinical Immunology**, Magdeburg, v. 116, p.192-197, 30 abr. 2005.

KASPER, D. L. et al. **Harrison: Medicina Interna**. 16. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2006.

KIMURA, F. et al Immunosuppression following surgical and traumatic injury. **Surgery Today**, Chiba, v. 40, p. 793-808, 2010.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. R. **Bases patológicas das doenças: Robbins e Cotran**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

LAFFEY, J. G.; BOYLAN, J. F.; CHENG, D. C. H. The systemic inflammatory response to cardiac surgery. **Anesthesiology**, Ontario, v. 97, n. 1, p. 215-252, jul. 2002.

LAWLOR, D. A.; EBRAHIM, S.; DAVEY, S. Sex matters: secular and geographical trends in sex differences in coronary heart disease mortality. **BMJ.**, v. 323, n. 7312, p. 541-545, sep. 2001.

LUYTEN, C. R. et al. Antioxidant defence during cardiopulmonary bypass surgery. **European Journal of Cardiothoracic Surgery**. v. 27, p. 611-616, jan. 2005.

MARCINIAK-SROKA, J. et al. Increase in plasma sCD23 levels precedes immunoglobulin E elevation after coronary artery bypass graft surgery. **Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej**, Kraków, v. 121, n. 4, p.109-114, 19 jan. 2011.

MARKETON, J. I. W.; GLASER, R. Stress hormones and immune function. **Cellular Immunology**, n. 252, p. 16-26, 2008.

MCBRIDE, W. T. et al. Cytokine balance and immunosuppressive changes at cardiac surgery: contrasting response between patients and isolated CPB circuits. **British Journal of Anaesthesia**, Belfast, v. 75, p. 724-733, 14 jul. 1995.

MENDELSON, M. E.; KARAS, R. H. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. **The New England Journal of Medicine**, v. 340, n. 23, p. 1801-11, jun. 1999.

MEYER, T. N.; SILVA, A. L. Resposta celular ao estresse. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 45, n. 2, p. 181-188, 1999.

MOTA, A. L. et al. Circulação extracorpórea em adultos no século XXI. Ciência, arte ou empirismo? **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, v. 23, n. 1, p. 78-92, 2008.

NAOUM, F.; NAOUM, P. **Hematologia Laboratorial – Leucócitos**. São José do Rio Preto – SP, 2006.

NGUYEN, D. M.; MULDER, D. S.; SHENNIB, H. Effect of cardiopulmonary bypass on circulating lymphocyte function. **The Annals of Thoracic Surgery**, v. 53, p. 611-616, 1992.

ORFAO, A. et al. Clinically useful information provided by the flow cytometric immunophenotyping of hematological malignancies: current status and future directions. **Clinical Chemistry**, v. 45, n. 10, p. 1708-1717, 1999.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Regional Office for South-East Asia. **Laboratory guidelines for enumerating CD4 T lymphocytes in the context of HIV/AIDS**. New Delhi, 2007.

PARKER, D. J. et al. Changes in serum complement and immunoglobulins following cardiopulmonary bypass. **Surgery**, v. 71, n. 6, p. 824-827, jun. 1972.

PELLEGRINI, J. D. et al. Relationships between T Lymphocyte Apoptosis and Anergy Following Trauma. **Journal of Surgical Research**, Worcester, v. 88, p. 200-206, 2000.

QUIXABEIRA, V. B. L.; SADDI, V. A. A importância da imunofenotipagem e da citogenética no diagnóstico das leucemias: uma revisão de literatura. **RBAC**, v. 40, n. 3, p. 199-202, 2008.

RIBEIRO, N. A. M. **Variáveis hemodinâmicas, gasométricas e imunocelulares em pacientes submetidos à revascularização miocárdica com uso de azul de metileno: estudo clínico e prospectivo**. 2004. 77 f. Tese (Doutorado) - Curso de Cirurgia Torácica e Cardiovascular, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

RINDER, C. S. et al. Lymphocyte and monocyte subset changes during cardiopulmonary bypass: effects of aging and gender. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, New Haven, v. 129, n. 6, p. 592-602, jun. 1997.

RODRIGUEZ, T. T. **Avaliação neuroimunoendócrina de ratos hipotireoidianos submetidos ao estresse de imobilização e endotoxemia: participação da L-arginina e da sintase do óxido nítrico**. 2005. 223 f. Tese

(Doutorado) - Curso de Imunologia, Departamento de Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2005.

ROTH, J. A. et al. Cell-Mediated Immunity Is Depressed Following Cardiopulmonary Bypass. **The Annals of Thoracic Surgery**, Bethesda, v. 31, p. 350-356, 1981.

RUDENSKY, B. et al. The cellular immunological responses of patients undergoing coronary artery bypass grafting compared with those of patients undergoing valve replacement. **European Journal of Cardiothoracic Surgery**, Jerusalem, v. 37, p.1056-1062, 18 fev. 2010.

SANTAGOSTINO, A. et al. An Italian national multicenter study for the definition of reference ranges for normal values of peripheral blood lymphocyte subsets in healthy adults. **Haematologica**, v. 84, p. 499-504, 1999.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. Diretrizes da cirurgia de revascularização miocárdica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 82, n. 5, p. 1-21, 2004.

STERNBERG, E. M. Neural-immune interactions in health and disease. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 100, n. 11, 2641-2647, 1997.

SULIMAN, M. A. R. M. et al. Predictive Value of Neutrophil to Lymphocyte Ratio in Outcomes of Patients with Acute Coronary Syndrome. **Archives of Medical Research**, Muscat, v. 41, p.618-622, 12 nov. 2010.

SWEISS, N. J. et al. Significant CD4, CD8, and CD19 Lymphopenia in Peripheral Blood of Sarcoidosis Patients Correlates with Severe Disease Manifestations. **Plos One**, Luxembourg, v. 5, n. 2, p.1-4, 05 fev. 2010.

TAJIMA, K. et al. Cardiopulmonary Bypass and Cellular Immunity: Changes in Lymphocyte Subsets and Natural Killer Cell Activity. **The Annals of Thoracic Surgery**, Nagoya, v. 55, p.625-630, 1993.

THALHAMMER-SCHERRER, R. et al. Role of Immunological Lymphocyte Subset Typing as a Screening Method for Lymphoid Malignancies in Daily Routine Practice. **Cytometry: Communications in Clinical Cytometry**, Vienna, v. 42, p.5-10, 2010.

TORRES, A. J. L. et al. Reference range for T lymphocytes populations in blood donors from two different regions in Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 13, n. 3, p.221-225, 2009.

TSEGAYE, A. et al. Immunohematological reference ranges for adult Ethiopians. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 6, p. 410-414, 1999.

URASSA, W. K. et al. Lymphocyte subset enumeration in HIV seronegative and HIV-1 seropositive adults in Dar es Salaam, Tanzania: determination of reference values in males and females and comparison of two flow cytometric methods. **Journal Of Immunological Methods**, Solna, v. 277, p. 65-74, 13 mar. 2003.

URRA, X. et al. Harms and benefits of lymphocyte subpopulations in patients with acute stroke. **Neuroscience**, Barcelona, v. 158, p. 1174-1183, 2009.

UTLEY, J. R. Cardiopulmonary bypass inflammatory and immunologic phenomena. **Advances in Neuroimmunology**, Spartanburg, v. 3, n. 4, p. 243-253, 1993.

WAN, S.; LECLERC, J.; VINCENT, J. Inflammatory response to cardiopulmonary bypass. **Chest**, v. 112, p. 676-692, 1997.

WEDEMEYER, N.; PÖTTER, T. Flow cytometry: an 'old' tool for novel applications in medical genetics. **Clinical Genetics**, v. 60, p. 1 – 8, 2001.

APÊNDICE A



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto: “Avaliação dos valores de leucócitos e linfócitos periféricos em pacientes internados em unidade de terapia intensiva submetidos à cirurgia cardíaca”.

Você está sendo convidado(a) a participar, como voluntário(a), numa pesquisa científica, que tem como objetivo avaliar o perfil de células leucocitárias em sangue periférico de pacientes, internados em unidade de terapia intensiva (UTI), submetidos à cirurgia cardíaca. O estudo torna-se necessário para auxiliar, futuramente, o corpo médico na avaliação da capacidade de defesa do organismo de pacientes internados em UTI. Este projeto está sendo desenvolvido sob coordenação do Dr. André Ney Menezes Freire, numa colaboração entre a Santa Casa de Misericórdia/Hospital Santa Izabel e o Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular do Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Bahia.

Caso você concorde, sem que haja aumento de risco ou prejuízo para você, em sua condição de paciente, serão coletados 6 mL (quantidade de quase uma colher de sopa) de sangue periférico de sua veia do braço em momentos diferentes: durante a cirurgia – três amostras, 24 h pós-cirurgia, 48 h pós-cirurgia, até sua alta da UTI. A coleta será feita no mesmo momento da rotina de exames da sua unidade de internação, pelos profissionais de coleta do Hospital. Precisamos ter os seus dados dos prontuários médicos para melhor análise da pesquisa para divulgação em congressos e revistas médicas, mas seus dados serão protegidos e jamais será divulgada sua identidade. Você não arcará com nenhum custo ou prejuízo, assim como não receberá qualquer espécie de reembolso ou gratificação caso aceite participar da pesquisa. Os benefícios previstos são que os seus médicos poderão ter os resultados dos exames para colocar na sua ficha e os benefícios maiores serão para o futuro próximo com a produção de conhecimento científico e médico.

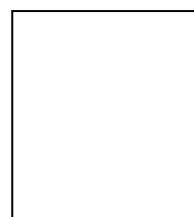
Você pode optar por não participar deste estudo, ou mesmo desistir de participar em qualquer etapa, sem prejuízos ou diferença no seu atendimento hospitalar. Mas caso aceite participar, por favor, preencha a ficha e assine na presença de duas testemunhas, uma cópia deste documento ficará com você e outra com os pesquisadores responsáveis pelo projeto. Qualquer dúvida, você deve procurar o pesquisador pelo telefone 71-2203-8285 e o Comitê de Ética em Pesquisa Prof. Dr. Celso Figuerôa deste Hospital no tel.: 71-2203-8362 e falar com Dr. Mittermayer Barreto Santiago.

Eu,....., RG nº, CPF nº....., prontuário nº, abaixo assinado, concordo de maneira livre e esclarecida em participar, na condição de sujeito de pesquisa, do estudo intitulado “Avaliação dos valores de leucócitos e linfócitos periféricos em pacientes internados em unidade de terapia intensiva submetidos à cirurgia cardíaca”. Fui devidamente informado(a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como sobre os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Autorizo a equipe acessar aos dados de minha ficha clínica e prontuário médico. Foi-me assegurado o sigilo, em relação à privacidade do sujeito de pesquisa, e garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve à qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento, assistência e/ou tratamento.

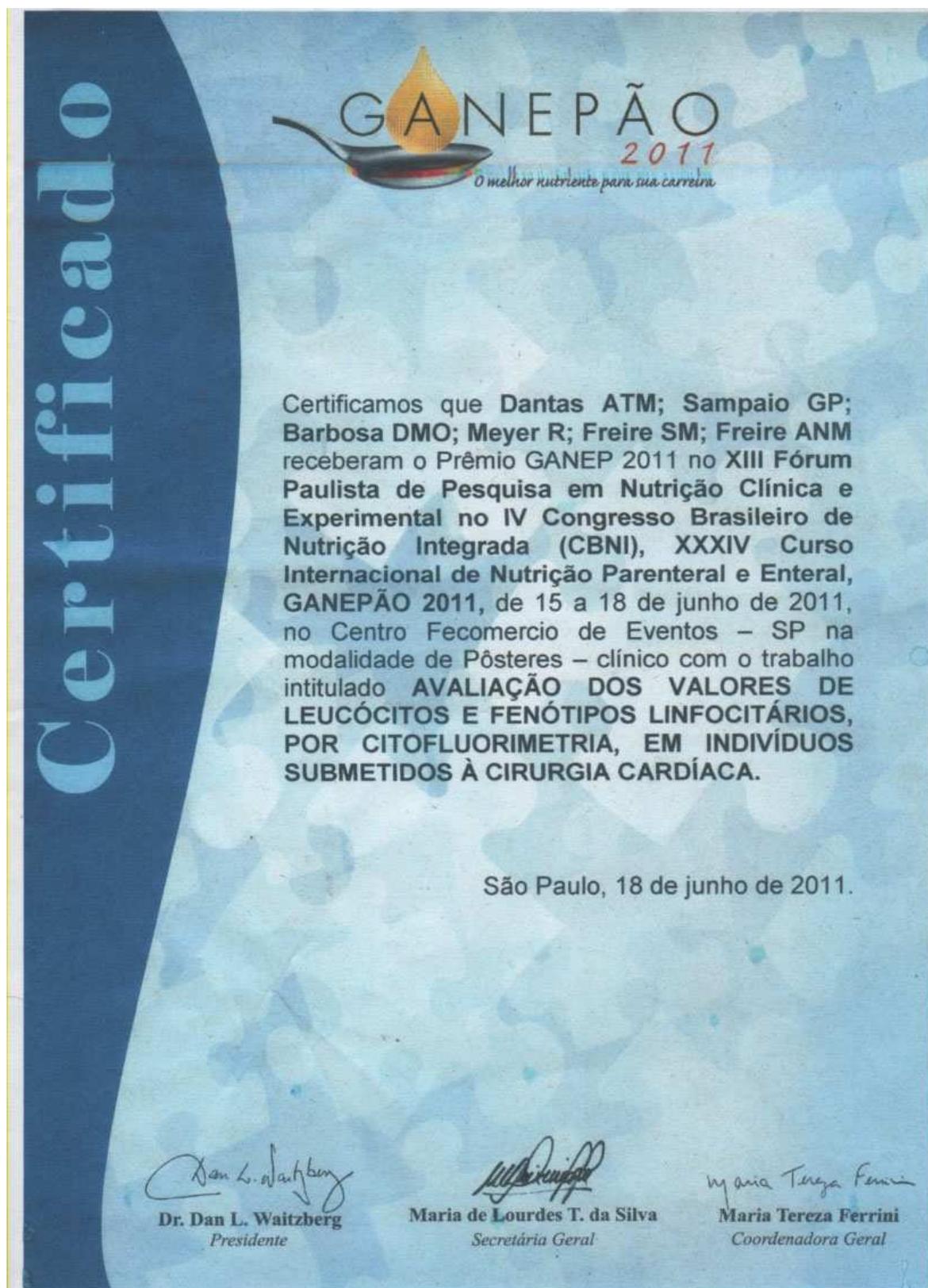
Assinatura do sujeito ou representante legal

1ª. Testemunha _____

2ª. Testemunha _____



ANEXO A



ANEXO B

HOSPITAL SANTA IZABEL
SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DA BAHIA

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
PROF. DR. CELSO FIGUEIRÔA
HOSPITAL SANTA IZABEL

Salvador, 16 de dezembro de 2008.

1. IDENTIFICAÇÃO DO PROJETO

TÍTULO DA PESQUISA: “Avaliação dos Valores de Leucócitos e Linfócitos Periféricos em Pacientes Internados em unidade de Terapia Intensiva Submetidos à Cirurgia Cardíaca”

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Dr. André Ney Freire

INSTITUIÇÃO: Hospital Santa Izabel

CARGO: Médico

2. PARECER DO RELATOR*ASPECTOS TÉCNICOS*

Estudo em corte longitudinal prospectivo

Método

Coleta de 6ml de sangue periférico em 50 pacientes, que serão submetidos à cirurgia cardíaca.

Pré cirurgia – coleta 24h antes

Pós cirurgia – coleta 48h e 72h depois

O material será avaliado quanto ao perfil leucocitário e linfocitário

CrITÉrios de inclusão

Paciente de 60 a 70 anos, com perfil leucocitário normal e sem doenças infecciosas concomitantes.

POTENCIAIS RISCOS

São apenas os relacionados à coleta normal de sangue, visto que não haverá coleta especial. Risco insignificante



HOSPITAL SANTA IZABEL
SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DA BAHIA

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
PROF. DR. CELSO FIGUEIRÔA
HOSPITAL SANTA IZABEL

PROVÁVEIS BENEFÍCIOS

Não há benefícios diretos para os pacientes, visto que o projeto se compõe apenas de coleta de amostra.

Os benefícios são relacionados à obtenção de conhecimento científico para futura utilidade coletiva.

ASPECTOS ÉTICOS

Todos os aspectos éticos foram respeitados.

PARECER FINAL

A pesquisa esta em conformidade com a ética, não havendo prejuízo para o paciente ou para a instituição. Sugiro a sua aprovação.

3. PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Santa Izabel, acatando o parecer do relator designado para o referido protocolo, em uso de suas atribuições, **aprova** o Projeto de Pesquisa supracitado. Para melhor adequação sugerimos que o TCLE seja todo na primeira pessoa e atualização do cronograma.
PROJETO APROVADO COM SUGESTÃO

Cordialmente,

Prof. Dr. Jedson dos Santos Nascimento

Vice Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa Prof. Dr. Celso Figueirôa
Hospital Santa Izabel

Salvador, 20 de março de 2011.

Prezado (a) Investigador (a): *Sra. Ana Tereza de Magalhães Dantas*

Por razões administrativas, estamos alterando alguns procedimentos internos deste CEP. Todos os projetos aprovados no ano de 2008 serão numerados quanto à aprovação retrospectivamente. Desta forma, o projeto abaixo citado possui o n.º de aprovação listada.

TÍTULO DO PROJETO APROVADO EM 2008	PESQUISADOR RESPONSÁVEL	DATA DA REUNIÃO	DEFINIÇÃO DA REUNIÃO	NÚMERO DO PROTOCOLO DO CEP
“Avaliação dos Valores de Leucócitos e Linfócitos Periféricos em Pacientes Internados em Unidade de Terapia Intensiva Submetidos à Cirurgia Cardíaca”.	Dr. André Ney Menezes Freire	16/12/2008	Aprovado	54 / 2008

Cordialmente,


Dr. Jelson dos Santos Nascimento

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa Prof. Dr. Celso Figueirôa
Hospital Santa Izabel

Pça Almeida Couto, 500 CEP 40050-410 Salvador-BA C6C.15.153.745/0002-49



Instituto de Ciências da Saúde
Programa de Pós Graduação
Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas
Avenida Reitor Miguel Calmon s/n - Vale do Canela. CEP: 40110-100
Salvador, Bahia, Brasil

<http://www.ppgorgsistem.ics.ufba.br>