

SHEILA MARIA VIEIRA HAZIN



**Expressão da CD44 em células brancas do sangue
total de neonatos e lactentes submetidos à cirurgia
cardíaca com circulação extracorpórea**

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Cirurgia.

Prof. Dr. Carlos Teixeira Brandt - Orientador Interno

Prof. Dr. Fernando Ribeiro de Moraes Neto - Orientador Externo

**RECIFE
2007**

Hazin, Sheila Maria Vieira
Expressão da CD44 em células brancas do sangue
total de neonatos e lactentes submetidos à cirurgia
cardíaca com circulação extracorpórea / Sheila Maria
Vieira Hazin. – Recife : O Autor, 2007.

xiv, 80 folhas ; il., fig., tab., gráf.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de
Pernambuco. CCS. Cirurgia, 2007.

Inclui bibliografia e anexos .

1. Cirurgia cardiovascular – Circulação
extracorpórea - Neonatal. 2. CD44 – Síndrome
inflamatória da circulação extracorpórea. I. Título.

616.1
616.1

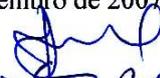
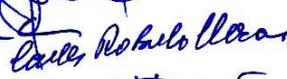
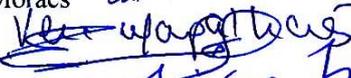
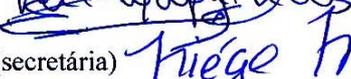
CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)

UFPE
CCS2007-69

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA

Relatório da Defesa de Tese do Dra. Sheila Maria Vieira Hazin aluna do Programa de Pós-graduação em Cirurgia, Área de Concentração: Cirurgia: Clínica e Experimental.

Às oito horas do dia vinte e um de dezembro do ano de dois mil e sete no Auditório Murilo La Greca do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, tiveram início os trabalhos de defesa de tese da Dra. Sheila Maria Vieira Hazin, para obtenção do grau de Doutora em Cirurgia. A comissão Julgadora – eleita pelo Colegiado do Programa e homologada pela Câmara de Pesquisa e Pós-graduação – foi integrada pelos professores: José Lamartine de Andrade Aguiar, Doutor do Departamento de Cirurgia do CCS/UFPE; Dr. Sílvio da Silva Caldas Neto, Doutor do Departamento de Cirurgia do CCS/UFPE; Dr. Carlos Roberto Ribeiro de Moraes Neto, Doutor do Departamento de Cirurgia do CCS/UFPE; Dr. Vera Magalhães da Silveira, Doutora do Departamento de Medicina Tropical do CCS/UFPE; e Dr. Edgar Guimarães Victor, Doutor do Departamento de Medicina Interna do CCS/UFPE; e, para suplentes: interno: Edmundo Machado Ferraz, Doutor do Departamento de Cirurgia do CCS/UFPE e, finalmente, externo, a Dr. Célia Maria Machado Barbosa de Castro, Doutora do Departamento de Medicina Tropical do CCS/UFPE; tendo, como orientadores internos, o Dr. Carlos Teixeira Brandt, Doutor do Departamento de Cirurgia do CCS/UFPE e o Dr. Fernando Ribeiro de Moraes Neto. A tese apresentada pela doutoranda Sheila Maria Vieira Hazin versou sobre: “Expressão da CD44 em células brancas do sangue total de neonatos e lactentes submetidos à cirurgia cardíaca com circulação extracorpórea”. Após, a explanação de 30(trinta) minutos, pela candidata, justificando a escolha, o objetivo da pesquisa, a metodologia empregada e os resultados obtidos, baseados na análise estatística, ilustrados com datashow, foram realizadas as arguições na seguinte ordem: Prof. Dr. Edgar Guimarães Victor, Prof. Dr. Vera Magalhães da Silveira, Prof. Dr. Carlos Roberto Ribeiro de Moraes, Prof. Dr. Sílvio da Silva Caldas Neto, e o Prof. Dr. José Lamartine de Andrade Aguiar (Presidente da Banca Examinadora); todas as arguições foram feitas no tempo regulamentar, e respondidas pelo candidato. Ao término das mesmas, a Comissão Julgadora proferiu o seguinte resultado: Prof. Dr. José Lamartine de Andrade Aguiar (Presidente da Banca Examinadora), menção “Aprovado”, Prof. Dr. Sílvio da Silva Caldas Neto, menção “Aprovado”, Prof. Dr. Carlos Roberto Ribeiro de Moraes, menção “Aprovado”, Prof. Dr. Vera Magalhães da Silveira, menção “Aproibada”, e Prof. Dr. Edgar Guimarães Victor, menção “Aproibada”. Conclusão, o candidato, obteve a menção “Aproibada”. Nada mais havendo a registrar foram encerrados os trabalhos do que, para constar, elaborei o presente relatório que vai por mim, Niége Maria de Paiva Melo, Secretária, assinados depois do Senhor Presidente, e demais integrantes da Comissão Examinadora. Recife, 21 de dezembro de 2007.

Prof. José Lamartine de Andrade Aguiar 
Prof. Sílvio da Silva Caldas Neto 
Prof. Carlos Roberto Ribeiro de Moraes 
Prof. Vera Magalhães da Silveira 
Prof. Edgar Guimarães Victor 
Sra. Niége Maria de Paiva Melo (secretária) 

Compare com o Documento

Original em 26/05/2008

Niége Melo

Niége M. de Paiva Melo
Sup. Executiva do Programa de
Pós-graduação em Cirurgia
CCS/UFPE
Nível Mestrado/Doutorado
Caj. D011E566
SIAPE 1134690



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Amaro Henrique Pessoa Lins

VICE-REITOR

Prof. Gilson Edmar Gonçalves e Silva

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DIRETOR

Prof. José Thadeu Pinheiro

HOSPITAL DAS CLÍNICAS

DIRETORA SUPERINTENDENTE

Prof. George da Silva Telles

DEPARTAMENTO DE CIRURGIA

Prof. Marcelo Salazar da Veiga Pessoa

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA

COORDENADOR

Prof. Carlos Teixeira Brandt

VICE-COORDENADOR

Prof. José Lamartine de Andrade Aguiar

CORPO DOCENTE

Prof. Álvaro Antônio Bandeira Ferraz

Prof. Carlos Teixeira Brandt

Prof. Cláudio Moura Lacerda de Melo

Prof. Edmundo Machado Ferraz

Prof. Frederico Teixeira Brandt

Prof. José Lamartine de Andrade Aguiar

Prof. Salvador Vilar Correia Lima

Prof. Sílvio Caldas Neto



DEDICATÓRIA

A MEUS PAIS,
FUAD HISSA HAZIN E CYLEDA VIEIRA HAZIN,
que sempre me incentivaram nas minhas escolhas,
nem sempre fáceis.

A MEU FILHO,
JEFFERSON HISSA HAZIN,
pela paciência e compreensão das horas ausentes.

AGRADECIMENTOS

Aos meus colegas de trabalho **Dr. Fabio Antonio Amando Granja** e **Dr. Rogério Holanda**, sem os quais seria impossível a realização deste trabalho.

Aos anestesistas **Dr. Marcius Vinicius Maranhão**, **Dr. Carlos Augusto Rocha** e **Dra. Ana Cíntia Carneiro Leão**, pela capacitação profissional, além da paciência e envolvimento com as crianças.

Aos demais componentes da sala de cirurgia, com especial atenção à instrumentadora **Aldenora Amorim Ribeiro** e ao perfusionista **Moacir de Almeida**.

Às cardiopediatras da UCMF (Unidade de Cardiologia Materno-Fetal), em especial a **Sandra da Silva Mattos**, **Lúcia Roberta Didier Moser** e **Juliana Rodrigues Neves**, que, nesses doze anos de convívio, têm-me dado apoio e orientação indispensáveis para o sucesso das cirurgias. Além disso, têm sido companheiras inseparáveis no sofrimento diário que é tentar minimizar a dor das crianças cardiopatas brasileiras.

Aos meus orientadores, **Prof. Dr. Fernando Moraes** e **Prof Dr. Carlos Teixeira Brandt**, pela orientação e apoio na realização desta tese.

Aos amigos do LIKA (Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami), em especial a **Vludia Costa**, por sua participação na elaboração técnica da tese. Sem a estrutura e os equipamentos do LIKA, esta tese não se teria realizado.

Às secretárias **Adriana Silva Pereira**, do NCT (Núcleo de Cirurgia Cardíaca e Torácica) e **Iana Lyra**, do ICP (Instituto do Coração de Pernambuco), pelo tratamento atencioso e profissional.



À **Sra. Niede Maria de Paiva Melo**, secretária do curso de Pós-Graduação, pela atenção e pelo interesse demonstrados durante todo o curso.

A **Ribamar Granja**, do NCT, pela disposição incansável para ajudar, permitindo a viabilidade do Projeto.

Ao **Prof. José Natal Figueiroa**, pela cuidadosa análise estatística e pela companhia agradável.

Afinal, a **todos** que não foram citados, mas que fazem parte de um grande grupo de apoio às crianças, o meu agradecimento especial.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE GRÁFICOS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
1. Introdução.....	01
2. Literatura.....	04
2.1 Resposta inflamatória sistêmica após cirurgia cardíaca com circulação extracorpórea.....	05
2.2 CD44 e hialuronan.....	12
2.3 Linfócitos T, células NK.....	16
2.4 IL-2, CD44 e sua relação com a SVC.....	19
3. Material e Métodos.....	22
3.1 Local de estudo.....	23
3.2 Tipo de estudo.....	23
3.3 Seleção.....	24
3.3.1 Critério de inclusão.....	24
3.3.2 Critério de exclusão.....	24
3.4 Procedimentos.....	24
3.4.1 Procedimentos técnicos.....	24
3.4.1.1 Protocolo.....	24
3.4.1.2 Coleta.....	25
3.4.2 Procedimento cirúrgico.....	25
3.4.2.1 Técnica de circulação extracorpórea.....	26
3.4.2.2 Procedimento imunológico.....	26
3.4.3 Procedimento imunológico.....	26
3.4.4 Procedimentos analíticos.....	27

3.4.5 Procedimentos éticos.....	28
4. Resultados.....	29
4.1 Avaliação clínica.....	30
4.2 Expressão da CD44 em células brancas CD44+ CD3-.....	31
4.3 Expressão da CD44 em linfócitos T (CD44+ CD3+).....	34
4.3.1 Avaliação dos linfócitos T citotóxicos (TCD3+ TCD8+).....	35
4.3.2 Avaliação dos linfócitos auxiliares TCD3 + TCD8- (TCD4+)....	37
4.4 Expressão da CD44 em células NK (CD56+ CD44+).....	38
5. Discussão.....	41
6. Conclusões.....	53
Referências.....	55
Anexos.....	65
Anexo 1 Banco de dados dos procedimentos imunológicos.....	66
Anexo 2 Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos.....	75
Anexo 3 Protocolo de Pesquisa.....	76
Anexo 4 Termo de Consentimento livre e esclarecido	78
Anexo 5 Normatização da Tese	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMCI	ativação da morte celular induzida
Bax	Bcl2 associated x protein
Bcl-2	B cell lymphoma 2
CAM	concentração alveolar mínima
CAVT	Canal atrioventricular total
C3a	fragmento do complemento C3
C4a	fragmento do complemento C4
C5a	fragmento do complemento C5
C2	complemento 2
CEC	circulação extracorpóea
CD1	“cluster differentiation” 1 ou grupo de diferenciação 1
CD2	“cluster differentiation” 2 ou grupo de diferenciação 2
CD3	“cluster differentiation” 3 ou grupo de diferenciação 3
CD8	“cluster differentiation 8” ou grupo de diferenciação 8
CD11b	cluster differentiation” 11 ou grupo de diferenciação 11b
CD44	“cluster differentiation” 44 ou grupo de diferenciação 44
CD48	“cluster differentiation” 48 ou grupo de diferenciação 48
CD56	“cluster differentiation 56” ou grupo de diferenciação 56
CIV	comunicação interventricular
CLS	“Capillary Leak Syndrome”
DMRA	disfunção mitocondrial relacionada a apoptose
DNA	“Desoxyribonucleic acid”
DKS	“Damus Kaye Stansel”
DVSVE	dupla via de entrada do ventrículo esquerdo
FN-KB	fator nuclear KB
FAS	CD95 (membro da família de receptores do FNT- α)
FASL	ligante FAS
FLIP	“FADD like ice Inhibitory proteins”
HCE	hipoplasia de coração esquerdo
ICP	Instituto do Coração de Pernambuco
IDCS	imunodeficiência combinada severa

IFN- γ	interferon γ
IL-1B	interleucina 1B
IL-1ra	antagonista do receptor IL-1
IL-2	Interleucina 2
IL-2R	receptor da IL-2
IL-4	interleucina 4
IL-6	interleucina 6
IL-8	interleucina 8
IL-10	interleucina 10
IL-12	interleucina 12
IL-15	Interleucina 15
K ₃ EDTA	ácido etileno diamino tetracético tripotássico
LIKA	Laboratório de Imunopatologia KEIZO ATAMI
LPS	lipopolissacarídeo
mAbs	anticorpo monoclonal
MHC	“major histocompatibility complex”
NCT	Núcleo de Cirurgia Cardíaca e Torácica
NK	"natural killer" ou célula matadora natural
PECy5	h“r-phicoerythrin - cyanine (cy5)”
PBS	phosphate buffered saline
RNA	“Ribonucleic acid”
mRNA	RNA mensageiro
R-PE	“r-phicoerithrin”
SVC	síndrome do vazamento capilar
TGA	transposição dos grandes artérias
Th1	T helper 1
Th2	T helper 2
TCD3+	positivo para o marcador de células T
TCD4+	célula T, o co-receptor CD4+
TCD8+	célula T, co-receptor CD8+
TNF- α	fator de necrose tumoral α
TCR	receptor de célula T
USA	“United States of América”
UTI	Unidade de tratamento intensivo

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Parâmetros clínicos, cirúrgicos e de pós-operatório.....	31
Tabela 2	Médias e desvios padrão das percentagens de células CD44+ CD3-.....	33
Tabela 3	Dados da Fig.1 relativos ao paciente número 11.....	33
Tabela 4	Médias e desvios padrão da percentagem de linfócitos T CD3+ CD44+.....	35
Tabela 5	Médias e desvios padrão das percentagens de células TCD3+ TCD8+.....	36
Tabela 6	Dados da Fig. 2 relativos ao paciente número 11.....	37
Tabela 7	Médias e desvios padrão das percentagens de linfócitos auxiliares TCD3+ TCD4+.....	38
Tabela 8	Dados da Fig.3 relativos ao paciente número 11.....	39
Tabela 9	Média e desvio padrão da percentagem de células NK CD44+....	40

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Células marcadas com antiCD44 (CD44 PE) e antiCD3 (CD3 PECy5) e separadas por citometria de fluxo. Quadrante superior direito (CD3+ CD44+), quadrante inferior direito (CD44+ CD3 -). Dados relativos ao paciente número 11..... 33
- Figura 2** Células marcadas com antiCD3 (CD3 PECy5) e antiCD8 PE e separadas por citometria de fluxo. Quadrante superior esquerdo CD3+ (linfócitos T, citotóxicos e auxiliares), quadrante superior direito CD3+ CD8+ (linfócitos T citotóxicos). Dados relativos ao paciente número 11..... 36
- Figura 3** Células marcadas com antiCD44 (R-PE) e antiCD56 (PECy5) e separadas por citometria de fluxo. Quadrante superior direito CD56+ CD44+ (células NK CD44+). Dados relativos ao paciente número 11..... 38

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Variação das médias das percentagens de células CD44+ CD3-	32
Gráfico 2	Variação das médias das percentagens de linfócitos TCD44+ TCD3+.....	34
Gráfico 3	Variação das médias das percentagens de linfócitos citotóxicos TCD3+ TCD8+.....	35
Gráfico 4	Variação das médias das percentagens de linfócitos auxiliares TCD3+TCD8- (TCD4+).....	37
Gráfico 5	Variação das médias das percentagens de células NK, CD44+ CD56+.....	39

RESUMO

A Circulação Extracorpórea (CEC) induz uma reação sistêmica inflamatória, que aumenta a morbimortalidade nas cirurgias cardíacas. Os neonatos e lactentes são especialmente suscetíveis a essa reação e ao desenvolvimento da Síndrome do Vazamento Capilar pós-operatória (SVC). A SVC resulta na perda da integridade endotelial, com extravasamento de grandes volumes de plasma e seus constituintes no espaço extracelular. Uma síndrome similar à SVC é desencadeada pela Interleucina-2, através de um possível mecanismo de apoptose, mediado pela molécula de adesão CD44. A ativação da CD44, em leucócitos na CEC, pode mediar a SVC em crianças de baixo peso. Na presente investigação, foi avaliada a expressão da CD44 em linfócitos T, células NK e demais leucócitos do sangue total, de um grupo consecutivo de 17 crianças submetidas à cirurgia cardíaca com CEC, nos dez primeiros meses de vida. Foi, também, avaliado o comportamento de células TCD4+ e TCD8+, no que se refere a freqüência de células no pós-operatório imediato. Duas crianças evoluíram para óbito precoce e foram excluídas do estudo. A pesquisa foi realizada em amostras de sangue arterial coletadas no início e no fim da cirurgia e, no pós-operatório, de quatro em quatro horas, em cerca de dez amostras por paciente. Os leucócitos isolados foram marcados com anticorpos monoclonais (antiCD44, antiCD3, antiCD56 e antiCD8) e as células separadas por citometria de fluxo. Foi observado aumento significativo na freqüência de células CD44+ e CD3- até oito horas do final da cirurgia, e depleção significativa de linfócitos T (CD3+ e CD44+) e células NK (CD56+ e CD44+), com pico na quarta hora, pós-operatória. Os resultados mostram também diminuição de linfócitos TCD4+ duas vezes maior do que de TCD8+. Pode-se concluir que existe um estado de imunossupressão com pico na quarta hora de pós-operatório, que envolve as células T e NK, ambas CD44+; enquanto as demais células brancas (CD44+ e CD3-) apresentam aumento na freqüência nas primeiras oito horas.

Descritores: Síndrome do Vazamento Capilar, Circulação Extracorpórea, Interleucina-2, CD44, Hialuronan.

ABSTRACT

Cardiopulmonary bypass induce a systemic inflammatory reaction which increases the morbi-mortality in children submitted to cardiac surgery. Neonates and infants are especially affected by this reaction and by the development of Capillary Leak Syndrome. (CLS). CLS results in loss of integrity of endothelial wall and extravasation of plasma and its components in the extravascular space. Interleukin 2 induces a syndrome similar to CLS probably through a mechanism of apoptosis mediated by the adhesion molecule CD44. CLS in low weight children can result from activation of CD44 in leucocytes by CPB. This investigation was done to evaluate the expression of CD44 in T lymphocytes, NK cells (Natural Killer) and the other white cells in the whole blood of 17 consecutive children up to 10 months of age who were submitted to cardiac surgery with cardiopulmonary bypass. TCD4+ and TCD8 + cells were also evaluated for their frequency in the immediate post-operative period. Among this group 2 died early and were excluded from the study. The research was done in samples of arterial whole blood obtained immediately before ,and in the and of surgery .It was also collected during the post-operative period every four hours with a total of 10 samples per patient and the white cells selected. The cells were marked with monoclonal antibody (anti-CD44, anti-CD3, anti-CD56 and anti-CD8) and the cells determined by flow cytometry. A significant increase in the frequency of CD44+ CD3- cells was observed until the eighth hour of surgery. A decrease in the frequency of lymphocytes (CD3+ CD44+) and NK cells (CD56+ CD44+) was also observed which peaked four hours after surgery. The results also showed a decrease twice as high in TCD4+ cells than in TCD8+. It can be concluded that there is a state of immunosuppression involving CD44+ cells, including T lymphocytes and NK cells, which peaked in the 4th postoperative hour while the other white cells CD44+ increased during the first eight hours after the procedure.

Keywords: Capillary Leak Syndrome, Cardiopulmonary Bypass, Interleukin 2, CD44, Hialuronan.



INTRODUÇÃO

A circulação extracorpórea (CEC) induz uma reação sistêmica inflamatória com ativação de vários mediadores incluindo componentes da cascata de complemento, ativação de neutrófilos e plaquetas, resultando na produção local e sistêmica de citocinas e moléculas de adesão¹. Os recém-nascidos e as crianças pequenas respondem a esse procedimento de maneira mais dramática e são particularmente vulneráveis às moléculas vasoativas e ao desenvolvimento da síndrome do vazamento capilar (SVC) pós-CEC².

A SVC tem diferentes etiologias, mas termina em uma via final comum, com perda da integridade endotelial. O resultado é o extravasamento de grandes volumes de plasma e seus constituintes no espaço extracelular².

Uma síndrome similar à SVC tem sido produzida administrando-se grandes quantidades de Interleucina-2 (IL-2) a animais e pacientes com câncer³. A IL-2 é um polipeptídeo produzido pelas células T ativadas. Entre suas propriedades imunomoduladoras, incluem-se a proliferação e a diferenciação das células T e B e o aumento da citotoxicidade contra uma variedade de células-alvo com aumento da atividade das células NK (Natural Killer)⁴.

Além dessas propriedades, a IL-2 faz também os linfócitos ativados se ligarem e destruírem células endoteliais, por um possível mecanismo de apoptose⁵. A habilidade de lisar as células endoteliais pode ser mediada pela CD44 (Cluster of Differentiation 44)⁴, a qual representa uma família de glicoproteínas presente na superfície de linfócitos, macrófagos e células epiteliais, sendo mediadora da aderência celular, da ativação de leucócitos, da migração de linfócitos, além de receptora específica para o hialuronan, um dos principais componentes da matriz extracelular⁴.

A estimulação dos receptores da célula T induz a ativação da CD44⁴. A ativação do hialuronan no endotélio da microvasculatura por citocinas como fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e a ativação da CD44 em neutrófilos e linfócitos pela CEC abrem uma nova possibilidade de investigação na etiologia da síndrome inflamatória pós-circulação extracorpórea.

A SVC é importante para cirurgiões cardíacos, principalmente para aqueles que se dedicam a cardiopatias congênitas complexas, que precisam ser corrigidas em uma idade precoce e demandam a utilização da bomba de CEC por períodos de tempo mais prolongados. Qualquer informação que esclareça um pouco mais e diminua as conseqüências da reação imunológica à CEC terá um impacto na morbidade e mortalidade imensurável.

O presente trabalho tem como objetivo geral o de avaliar a possibilidade de a CD44 estar envolvida na SVC pós-CEC em neonatos e lactentes, e como objetivo específico o de verificar a expressão da CD44 em linfócitos, leucócitos polimorfonucleares e células NK de forma seriada, utilizando anticorpos monoclonais e citometria de fluxo no período pós-operatório imediato de recém-nascidos e lactentes que se submeteram à CEC.



LITERATURA

2.1 Resposta inflamatória sistêmica após cirurgia cardíaca com circulação extracorpórea

Cirurgia cardíaca pediátrica quase sempre necessita da CEC, a qual desencadeia uma resposta inflamatória sistêmica com uma seqüência complexa de eventos e ativação do sistema complemento e da coagulação, além da ativação de citocinas, moléculas de adesão, neutrófilos, plaquetas e disfunção endotelial⁶. Essas mudanças estão associadas ao aumento do risco pós-operatório, da morbidade e da mortalidade⁷.

Alguns pacientes podem apresentar uma resposta exagerada, com aumento da permeabilidade capilar, ou SVC⁸. Essa síndrome é caracterizada por depleção do volume intravascular, extravasamento maciço dos constituintes plasmáticos para o espaço extravascular e conseqüente edema, choque hipovolêmico e disfunção de múltiplos órgãos. A SVC está relacionada ao baixo peso e a pouca idade, ao tempo prolongado de perfusão e à hipotermia. A base fisiológica dessa síndrome é complexa⁹.

A síndrome é bifásica: em uma primeira fase, ela é caracterizada por instabilidade hemodinâmica, necessitando durante algumas horas de reposição volêmica e inotrópicos; numa segunda fase, é caracterizada pelo desenvolvimento gradual da disfunção em diferentes órgãos e acúmulo de líquido no espaço extravascular. Essa segunda fase dura aproximadamente 48 horas¹⁰.

Demonstrou-se, em 40 pacientes submetidos à CEC, um aumento transitório na permeabilidade vascular sistêmica, cuja intensidade foi associada à disfunção renal e pulmonar, mesmo em cirurgias não complicadas. Não se

conheciam os mecanismos envolvidos, nem se eles poderiam ser modulados. Entretanto, foi sugerido que a proteção microvascular pudesse produzir impacto na morbidade e mortalidade operatórias¹¹.

A cirurgia cardíaca leva a mudanças importantes no sistema imunológico, devido à combinação do trauma local com a CEC e à reperfusão cardíaca e pulmonar^{9,12}. Durante a CEC, ocorre ativação do sistema de contato, que é composto da cinina-caliceína, fibrinólise-coagulação e do sistema complemento. O fator XII é ativado pelo contato do sangue com superfícies artificiais do circuito da CEC, levando à formação da bradicinina. As cininas são potentes vasodilatadores, que também participam da inflamação, levando ao aumento da permeabilidade e quimiotaxia de neutrófilos, além de se ligarem a receptores de células endoteliais, produzindo substâncias vasoativas, como prostaglandinas e óxido nítrico^{13,14}.

Estão também relacionados à CEC o sistema complemento e a liberação de citocinas. A ativação do complemento ocorre pela via alternativa, levando à formação de anafilatoxinas C3a e C5a. O imunocomplexo protamina-heparina pode ativar a via clássica com o fator C4a e C2¹⁵.

As citocinas são proteínas sintetizadas por células que afetam outras células. São produzidas por monócitos, macrófagos, linfócitos e células endoteliais. As citocinas produzidas por linfócitos são chamadas de 'linfocinas', ou 'interleucinas' (IL). Sua produção na cirurgia cardíaca é estimulada pela isquemia-reperfusão, ativação de complemento, liberação de endotoxinas e, ainda, ampliada pela ação de outras citocinas. Sua liberação é mediada através dos fatores de transcrição intracelular FN-KB (Fator nuclear-KB)^{6,16}.

As citocinas mais importantes produzidas durante a CEC são os mediadores pró-inflamatórios TNF- α , interleucina-1 [IL-1], interleucina-6 [IL-6] e interleucina-8 [IL-

8]) e antiinflamatório (interleucina 10 [IL-10]). Todos potenciais participantes da síndrome inflamatória pós-CEC^{6,9,15,17}.

Vinte e nove pacientes adultos que se submeteram à CEC tiveram seus níveis plasmáticos de mediadores da inflamação (TNF- α , IL-6, IL-8, elastase, histamina, complemento C5a e C3a) medidos antes, durante e depois da CEC. Essas substâncias apresentaram um pico na quarta hora após a CEC (exceto o TNF- α) e retornaram à linha basal ou diminuíram consideravelmente após 24 horas. Foi concluído que pacientes com resposta exagerada à CEC apresentam tendência para maior sangramento, demonstram maior aumento na permeabilidade capilar (aumento maior de peso) e necessitam de maior suporte respiratório do que os pacientes com pequena resposta inflamatória. A intensidade da resposta inflamatória influencia a resposta clínica⁸.

Para avaliar a reação imune nas cirurgias de revascularização com e sem CEC, foram medidos os níveis sanguíneos das citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-8 e TNF- α no pós-operatório. A IL-2R (receptor para IL-2) foi estudada para avaliar especificamente a reação proliferativa à ativação linfocitária ou resposta imune adaptativa. Os níveis séricos da IL-6 aumentaram de forma significativa no pós-operatório imediato e, entre as primeiras 4-6h. Os níveis da IL-8 apresentaram um pico. Os níveis sanguíneos da IL-2R aumentaram de forma significativa no primeiro dia e permaneceram elevados até o quinto dia. A presença ou a ausência da CEC não causou diferença significativa em nenhum dos casos. Os níveis da TNF- α foram inconclusivos¹⁸.

Foi demonstrado também que a IL-2R estava aumentada nas cirurgias coronarianas com ou sem CEC; porém, nas cirurgias com CEC, com valores elevados de forma significativa¹⁹.

A IL-6, que atua na diferenciação das células B e estimula hepatócitos a produzir proteínas da fase aguda inflamatória²⁰, começa a aumentar perto do fim da CEC, permanecendo elevada nas primeiras horas da cirurgia.

Níveis de IL-8, a qual contribui para a inflamação dos tecidos, ativando e promovendo a migração de neutrófilos, estão aumentados no sangue de pacientes pediátricos que se submetem à CEC. Foi demonstrado que a IL-8 é produzida pelos tecidos, e não somente pelas células inflamatórias invasoras. Endotélio e miócitos podem também ser fontes celulares do m RNA (RNA mensageiro) da IL-8²¹.

A IL-10 e a IL-1ra (antagonista do receptor IL-1) são as citocinas antiinflamatórias mais consistentemente liberadas durante e após a cirurgia cardíaca com CEC, tanto em crianças quanto em adultos^{7,22}. No entanto, dados da literatura indicam que a idade das crianças tem papel fundamental no mecanismo de liberação da IL-10 e no tipo de células envolvidas, que podem incluir monócitos ou uma resposta específica de células T¹⁷.

Foi observado também um aumento significativo nos níveis circulantes do TNF- α em pacientes que se submeteram à cirurgia de revascularização do miocárdio com CEC. Os maiores níveis foram observados durante a isquemia cardíaca e durante a reperfusão. Foi possível concluir que a CEC pode induzir uma resposta inflamatória através da liberação do TNF- α ^{22,23}. Os níveis de TNF- α também aumentaram entre o começo e até duas horas do fim da CEC em crianças²⁰.

A capacidade de prever, no período pré-operatório, quais os pacientes de maior risco é muito importante para que se tomem medidas profiláticas. Um sistema imunológico já ativado antes da cirurgia poderia amplificar, em muito, a resposta imunológica ao trauma. Para avaliar essa hipótese, foram selecionados indicadores da inflamação como indicadores de risco. Elevações pré-operatórias dos níveis

sanguíneos de componentes de complemento C3 e C5, do TNF- α e de neutrófilos, além do peso corporal e da diminuição de linfócitos, foram relacionadas a crianças que desenvolveram edema pós-operatório²⁴.

A cirurgia cardíaca causa ativação de células hematopoiéticas circulantes, incluindo neutrófilos e monócitos. Foi realizado um estudo para identificar a ativação local e sistêmica de neutrófilos e a expressão de moléculas de adesão em pacientes submetidos à cirurgia de revascularização do miocárdio com CEC. A expressão da CD11 b (cluster differentiation 11) em neutrófilos circulantes aumentou durante a CEC e apresentou um pico de 145% do nível basal na reperfusão, diminuindo a níveis insignificantes, acima do basal, já em 20 minutos do término da CEC. Apesar de haver uma perda de neutrófilos, sugerindo seqüestração, não foi possível demonstrar ativação de neutrófilos no coração e no pulmão, após a reperfusão²⁵.

A resposta imunológica celular nas cirurgias coronárias com e sem CEC foi avaliada utilizando-se anticorpos monoclonais e citometria de fluxo. Os pacientes que receberam transfusão sangüínea foram excluídos. As células TCD4 (célula T, co-receptor CD4) +diminuíram significativamente logo após a CEC, assim como as células TCD8 + (célula T, co-receptor CD8), mas não tão tanto quanto a TCD4+. Nos pacientes sem CEC, essas mudanças não foram estatisticamente significantes. Os níveis de células NK também diminuíram de forma significativa após a CEC, mas o grau de ativação aumentou. A resposta mostrou a real possibilidade da ativação da imunidade não específica na CEC, apesar da diminuição das células NK em números absolutos²⁶.

Em estudo prospectivo, realizado em 40 pacientes adultos, no qual se pretendia verificar a hipótese de um fator dilucional, foi encontrado resultado um pouco diferente, com aumento inicial da contagem de linfócitos imediatamente

depois da cirurgia, os quais caíram para um mínimo no primeiro dia do pós-operatório. As células TCD4+, apesar da redução numérica, estavam mais ativas no primeiro dia, quando comparadas com as de qualquer outro dia do pós-operatório. No estudo, foi possível concluir que uma alteração funcional parecia ser a responsável. No entanto, para confirmação dessa hipótese, mais pesquisa seria necessária²⁷.

Outros fatores, como a endotoxina, o lipopolissacarídeo da parede celular de bactérias Gram-negativas e estímulo importante no desenvolvimento da síndrome inflamatória sistêmica, foram encontrados em níveis mais elevados, de forma significativa, nos pacientes que se submeteram à CEC, comparados aos sem CEC. A patogênese desse fenômeno não é clara, mas hipotermia, hipoperfusão e outras causas de isquemia intestinal têm sido responsabilizadas^{16,28}.

Foi também estudada a expressão de genes na CEC, tendo sido concluído que a CEC e a parada cardíaca por cardioplegia não causam uma mudança indiscriminada na expressão dos genes, mas mudanças em caminhos específicos: um aumento nos genes ativadores da inflamação e transcrição de genes relacionados à apoptose, e uma diminuição das imunoglobulinas²⁹.

Um outro estudo verificou que a deficiência herdada de C4 aumenta a ativação do complemento pelo complexo protamina-heparina. A C4 ativada se liga de forma mais efetiva a imunocomplexos e, portanto, tem papel importante na eliminação dos mesmos. A sua deficiência pode permitir que complexo protamina-heparina circulem por mais tempo, ativando ainda mais o complemento³⁰.

Cirurgia cardíaca, em particular com CEC e cardioplegia, desencadeia inflamação do miocárdio e apoptose ou morte celular programada. A duração do processo de apoptose é de 12 a 24 horas, mas mudanças da morfologia celular já

são vistas com menos de duas horas. Sinalizadores de membrana, mediadores liberados pela mitocôndria, o balanço entre a expressão de substâncias pró-apoptose bax (Bcl-2 associated x protein) e antiapoptose Bcl-2 (B cell lymphoma 2) e ativação da caspase estão envolvidos. A ligação entre isquemia/reperfusão e apoptose sugere que apoptose pode ser um dos fatores mais importantes na disfunção do miocárdio pós-CEC³¹.

Disfunção mitocondrial relacionada à apoptose (DMRA) descreve o conjunto de mudanças funcionais e estruturais da mitocôndria pré-apoptose. O coração neonatal é especialmente vulnerável à apoptose. A CEC está associada à liberação de moléculas pró-apoptose, como o TNF- α . Foi também demonstrado um aumento na bax, proteína com capacidade para formação de poros na membrana mitocondrial com liberação do citocromo C. DMRA está presente precocemente no período pós-operatório em cordeiros na fase neonatal³².

Em um estudo, o sangue de pacientes que se submeteram à CEC pode exercer forte apoptose em células endoteliais humanas. Aumento da apoptose endotelial foi observado com sangue obtido após uma hora e, principalmente, após seis horas passadas da CEC. A proporção de células endoteliais em apoptose foi 5,6 vezes maior em culturas incubadas com sangue obtido seis horas após a saída da CEC, comparado com sangue obtido no período pré-operatório. Morte por apoptose das células endoteliais, seis horas após a CEC, pode ser responsável pelo aumento da permeabilidade vascular, disfunção dos órgãos e, inclusive, pelo aumento da permeabilidade capilar³³.

A síndrome inflamatória foi e continua sendo exaustivamente estudada. Até hoje, não há uma conclusão definitiva sobre o processo, mas, ao que tudo indica, um mecanismo imunológico está envolvido.

2.2 CD44 e hialuronan

Durante a década de 80, grupos internacionais interessados na diferenciação de antígenos leucocitários humanos relacionaram as incontáveis proteínas presentes na superfície de leucócitos em famílias ou conjuntos de diferenciação (“Clusters of Differentiation” [CD]). Essas são moléculas de superfície celular, identificadas por anticorpos monoclonais. Uma das famílias definidas por esse grupo foi a da CD44³⁴.

A CD44 representa uma família de glicoproteínas transmembrana expressa na superfície de uma variedade de células, como linfócitos, macrófagos e células epiteliais. Ela é receptora específica para o hialuronan, um dos principais componentes da matriz extracelular, e a interação CD44-hialuronan está implicada em processos fisiológicos complexos de aderência celular, ativação de leucócitos e migração de linfócitos³⁵.

A CD44, com peso molecular de 85-200KD, pode ser dividida funcionalmente em três domínios: a porção extracelular distal é a região primariamente responsável pela ligação da CD44 com o hialuronan; a porção extracelular proximal é o sítio primário de divisões alternadas no mRNA, que produz as muitas isoformas da CD44, sendo responsável por uma das principais funções da CD44, que é mediar a migração de linfócitos para o tecido linfóide intestinal; uma porção intracitoplasmática com capacidade para interagir com o citoesqueleto, além do potencial para sinalização intracelular; e a porção transmembrana, que é uma das mais típicas, mas associações com proteínas de membrana podem provocar modulações na interação com o hialuronan³⁴.

O hialuronan é um polissacarídeo linear com a seguinte estrutura: B 1,4 D-ácido glucurônico B 1,3 N-acetil D-glicosamina. Apesar de o hialuronan ser um polímero composto pela repetição de um simples dissacarídeo, está implicado direta ou indiretamente em fenômenos de superfície celular de alta especificidade, mesmo em diluições muito baixas³⁶.

O hialuronan está distribuído na matriz extracelular, sendo proeminente na maioria das membranas basais, ao redor de vasos pulmonares e em vários outros tecidos³⁷.

A CD44 reconhece a seqüência dos seis resíduos de açúcar do hialuronan. Na superfície celular, o receptor se liga ao hialuronan de uma forma cooperativa, na qual duas ou mais moléculas do CD44 se ligam a uma só de hialuronan, resultando em maior afinidade³⁷.

Embora a CD44 funcione como receptor de superfície celular para o hialuronan em algumas linhagens celulares, a maioria das células hematopoiéticas que expressam a CD44 não se ligam ao hialuronan. Alguns anticorpos monoclonais específicos antiCD44 podem, no entanto, rapidamente induzir a ligação entre o hialuronan e a CD44 em células T normais. Esse fato sugere a existência de um mecanismo "in vivo", capaz de ativar a função de receptor para o hialuronan em células T normais³⁸.

Foi demonstrado que a ligação entre a CD44 dos linfócitos e seu receptor, o hialuronan, pode mediar a aderência primária de linfócitos ao endotélio vascular, e que essa ligação apresenta força suficiente para suportar a força do fluxo e para suportar, portanto, as etapas iniciais do extravasamento dos linfócitos³⁹.

A expressão do hialuronan na superfície de células endoteliais é induzida por citocinas pró-inflamatórias, TNF- α e IL-1B, assim como pelo lipopolissacarídeo

bacteriano, criando locais receptivos para interação CD44/hialuronan e extravasamento de células inflamatórias⁴⁰. Essa capacidade de indução da expressão do hialuronan parece restrita ao endotélio microvascular, não ocorrendo em vasos de grande calibre⁴¹. Depois do fator TNF- α , a ativação da CD44 é o maior ativador da expressão do hialuronan na superfície endotelial³⁹.

Tanto a posição estratégica do hialuronan no endotélio como a da CD44 em ambos, endotélio e linfócitos, sugerem que essa molécula pode ter participação no mecanismo pelo qual linfócitos circulantes são recrutados pelo endotélio. Utilizando microscopia intravital, foi demonstrado que ambos os linfócitos Th1 (T helper 1) e Th2 (T helper 2) usam a CD44 para rolar e aderir a microvasculatura ativada pelo fator de necrose tumoral- α . O hialuronan também foi necessário para que ocorresse essa interação⁴².

A ativação das células T aumenta a ligação delas com o hialuronan, mediando o rolamento de linfócitos. Ainda a estimulação de CD44 com anticorpo monoclonal (mAbs) aumenta a atividade citotóxica de células NK e linfócitos citotóxicos, e induz a liberação de TNF- α e de IL-1B em monócitos⁴³.

A expressão da CD44 aumenta rapidamente em neutrófilos e nas células endoteliais de capilares na lesão de isquemia e reperfusão renal, o que provoca o recrutamento de neutrófilos para esses tecidos isquêmicos e a conseqüente disfunção renal. Experimentos com transferência de neutrófilos marcados em animais demonstram que a CD44 endotelial, e não a CD44 dos neutrófilos, medeia a migração. A ativação dos neutrófilos aumenta a expressão do hialuronan⁴⁴.

As células NK em repouso expressam CD44 que não se liga ao hialuronan. Após a infecção, a população de células CD44 ativadas aparece e a sinalização através da CD44 aumenta a atividade citotóxica dessas células. As

citocinas pró-inflamatórias IL-2 e IL-15 (Interleucina 15) têm um importante papel na ativação da CD44 em células NK. Quando usadas em combinação com o hialuronan de baixo peso molecular, a célula NK ativada é um potente indutor da produção de interferon- δ (IFN- δ)⁴⁵.

O IFN- δ é crítico para uma resposta imune inata contra infecções. A combinação de citocinas, IL-2 derivadas de linfócitos T ativados e IL-12, IL-15 de monócitos, induzem a uma ótima produção de IFN- δ pelas células NK, e de forma subsequente induzem a apoptose dessas células⁴⁶.

Evidências sugerem que o hialuronan pode induzir expressão de genes inflamatórios em macrófagos de ratos. Hialuronan existe na sua forma nativa como um grande polímero, mas é encontrado em pequenos fragmentos em condições inflamatórias. A redução no peso molecular do hialuronan pode ser resultado da despolimerização provocada por radicais livres de oxigênio, quebra enzimática e/ou síntese alterada⁴⁷.

Foram examinados os efeitos de fragmentos de hialuronan de alto e baixo peso molecular na ativação do NF- κ B de macrófagos de ratos. O NF- κ B é um fator de transcrição envolvido na regulação de muitos genes pró-inflamatórios, sendo ativado por estímulos, como IL-1, TNF- α e radicais livres de oxigênio. Foi possível concluir que somente pequenos fragmentos são capazes de ativar a ligação ao DNA da NF- κ B^{6,47}.

O hialuronan, administrado conjuntamente com a IL-2, age como agonista e ativa células citotóxicas a mediar a destruição de células-alvo. Estudos histopatológicos demonstraram em animais, nos quais a IL-2 e o hialuronan foram associados, um maior infiltrado linfocitário perivascular e um aumento de edema nos

pulmões e no fígado. No entanto, não se pode precisar o mecanismo através do qual o hialuronan aumenta a atividade lítica de células citotóxicas⁴⁸.

2.3 Linfócitos T, células NK

A proliferação e a diferenciação das células T são orientadas por um fator de crescimento protéico, ou citocina, chamada IL-2, que é produzida pela própria célula T ativada. A IL-2 tem três cadeias: alfa, beta e gama. As células T em repouso expressam um receptor de IL-2 de baixa afinidade (beta e gama). A associação dessas cadeias com a cadeia alfa cria um receptor com afinidade muito mais elevada para a IL-2, permitindo que a célula responda a quantidades muito baixas dessa citocina⁴⁹.

A natureza e a duração da estimulação antigênica, através da produção de IL-2, regulam a autonomia da expansão dos linfócitos tóxicos. Linfócitos que sofrem uma estimulação prolongada produzem mais IL-2 e por um período mais prolongado que os submetidos a uma estimulação rápida. A IL-2 produzida é essencial à proliferação celular. Se a estimulação for de curta duração, os linfócitos sofrem um processo abortivo e apoptose^{50,51}.

A IL-2 é capaz de induzir morte aos linfócitos, assim como seu crescimento. Talvez a atividade promotora de crescimento dessa citocina seja dominante na fase precoce da resposta imunológica, mas, se a estimulação das células T persistirem ou a IL-2 aumentar acima do limiar, o potencial para a ativação da morte celular (apoptose) se tornará dominante e os linfócitos cometerão suicídio ou fratricídio⁵².

Ambas as células TCD4⁺ e TCD8⁺ produzem grandes quantidades de IL-2. Foi demonstrado que a TCD8⁺ pode iniciar a produção de IL-2 seis horas após a infecção e antes da divisão celular “in vivo”. O pico de produção de IL-2 foi alcançado precocemente na resposta imunológica e antes do pico proliferativo⁵⁰.

“Ativação da morte celular induzida” (AMCI) é uma forma de apoptose induzida pela estimulação repetida de linfócitos e um mecanismo importante de autotolerância. Em células TCD4, é mediada por FAS (CD95) (membro da família de receptores do TNF- α) e aumentada pela IL-2. Células T se tornam sensibilizadas para AMCI após ativação antigênica e pela IL-2, que aumenta a transcrição e a expressão de superfície do ligante FAS (FASL) e suprime a transcrição e a expressão do FLIP (FADD Like Ice Inhibitory Protein), o inibidor de apoptose⁵³.

Foi demonstrado que a CD44 também tem papel importante na morte celular induzida. É conhecido que a ativação de células T aumenta a expressão da CD44. A sinalização através da CD44 leva ao aumento da apoptose nas células T (TCR) ativadas, mas não nas células T em repouso. A CD44 pode tornar-se um novo caminho na indução de apoptose em células T ativadas e, assim, tratar doenças auto-imunes, rejeição de alo-enxertos e a doença do enxerto-versus-hospedeiro⁵⁴.

As células TCD8⁺ citotóxicas produzem citólise de células infectadas. As TCD4⁺ se diferenciam em células Th1 ou Th2. A ativação seletiva da Th1 leva à imunidade mediada por células (ativação de macrófagos para eliminação de microorganismos intracelulares), ao passo que a ativação seletiva da Th2 proporciona a imunidade humoral (ativa a produção de anticorpos). A ativação das células T modifica a expressão de várias moléculas de superfície, como, por exemplo, densidades mais altas da molécula de adesão CD44⁴⁹.

Células NK são células grandes, granulares, semelhantes aos linfócitos e consideradas células efetoras da imunidade inata. Sua atividade é descrita como não-adaptativa e irrestrita para o complexo de histocompatibilidade principal (MHC - "Major Histocompatibility Complex")⁵⁵.

Hoje, está bem estabelecido que sua função lítica é regulada por um complexo de citocinas que atuam independentemente ou de forma sinérgica. Evidências também indicam que células NK, ativadas pela IL-2, adquirem a capacidade de aderir ao endotélio vascular. Esse processo é extremamente seletivo e se correlaciona com o processo de morte celular. Análise de fluxo citométrica revela uma suscetibilidade seletiva pela ação citotóxica do TNF- α . A microscopia confocal demonstra que a interação entre as células NK e o endotélio induz a liberação do citocromo c e translocações de células alvo, indicando envolvimento mitocondrial na indução da morte celular⁵⁵.

Linfócitos citotóxicos e células NK são considerados células efetoras da imunidade, mediada por células e inata, respectivamente, com papel crítico na defesa precoce contra infecções virais e transformações malignas. Essas células usam o mesmo mecanismo básico para destruir seus alvos, embora as respostas sejam desencadeadas por receptores distintos⁵⁶. Células TCD8⁺ dependem do receptor de células T (TCR) para reconhecimento de antígeno e função. Entretanto, células TCD8⁺ podem, quando ativadas, expressar receptores da imunidade inata⁵⁷.

Foi examinada a expressão de receptores NK em células TCD8 de camundongos normais que também expressavam níveis elevados da CD44 (CD44 alta). Essas células T, diferentemente das de memória convencionais, proliferam e se tornam ativadas através da IL-2, via um mecanismo dependente da CD48/CD2.

Antes de serem ativadas, apresentam níveis baixos ou inexistentes de receptores NK, mas, quando ativadas pela IL-2, apresentam níveis elevados. Essas células demonstram preferência por tumores de células próprias. Ainda, células TCD8+ (CD44 alta) expressam moléculas de adaptação que normalmente só estão expressas em células NK⁵⁷.

Linfócitos citotóxicos e células NK destroem seus alvos através da exocitose de grânulos líticos (granzima e perforina) ou por se relacionarem com o grupo de receptores de superfície para morte celular, como o receptor de necrose tumoral- α , incluindo a FAS. Após o reconhecimento da célula alvo, há a liberação de grânulos citotóxicos e seu conteúdo na sinapse imunológica, entre a célula alvo e a célula tóxica, com indução de apoptose. Apoptose (ou morte celular induzida) tem um papel crítico no desenvolvimento e na homeostasia de linfócitos, pois a citotoxicidade, mediada por células, também regula e termina a resposta imune⁵⁶.

Mutações que impeçam receptores de citocinas de liberar sinais de sobrevivência podem levar a uma excessiva morte celular, como na síndrome da imunodeficiência combinada severa (IDCS), que é caracterizada por profunda depleção de células T e número normal de células B. Ao contrário, inibição da apoptose leva ao desenvolvimento de doença auto-imune, ou linfoma⁵⁸.

2.4 IL-2, CD44 e sua relação com a SVC

Linfócitos humanos, quando cultivados na presença da IL-2 recombinante ou nativa, adquirem a capacidade de destruir alvos tumorais NK-sensíveis ou NK-resistentes. Essa habilidade, em geral, não destrói células normais ou não-transformadas. Devido a essa especificidade para células tumorais, vários protocolos

têm sido utilizados com a IL-2, na terapia contra o câncer. Entretanto, a infusão de altas doses dessa substância causa toxicidade sistêmica, tanto em humanos como em animais, produzindo a SVC. Alguns aspectos dessa toxicidade sugerem destruição de tecidos normais, mediada por células⁵⁹.

A SVC foi induzida em camundongos com a injeção seriada intraperitoneal de IL-2. Foi demonstrado dano considerável às células endoteliais, que apresentavam edema citoplasmático, vacúolos e figuras de mielina. A microscopia eletrônica mostrou células linfáticas presas às células endoteliais através de microvilosidades. Algumas pareciam estar passando através de poros temporários no citoplasma de células endoteliais, acumulando-se no espaço perivascular. A SVC foi associada a lesões vasculares preferencialmente localizadas em vênulas, veias pequenas e capilares, nos pulmões e, de forma mais proeminente, no fígado⁶⁰.

Utilizando o mesmo método de indução da SVC, foi administrada a IL-2 a uma cepa selvagem de ratos e a uma cepa sem a CD44, com o objetivo de investigar a hipótese de linfócitos citotóxicos se utilizarem da CD44 como mediadora de lesão no endotélio vascular. Na microscopia eletrônica, foram observadas lesões extensivas celulares no endotélio do pulmão e do fígado da cepa selvagem tratada com IL-2, mas não na cepa sem CD44. A SVC foi também bloqueada pela administração de anticorpos contra a CD44⁴.

Considerando não haver conclusões definitivas sobre a implicação das células dos sistemas imunes inato ou adaptado na SVC induzida pela IL-2, foi desenvolvido um modelo para analisar os eventos precoces e tardios que caracterizam a lesão pulmonar nessa síndrome. Foi concluído que as células NK são críticas, tanto nos eventos precoces como nos tardios. A resposta tardia

(recrutamento de neutrófilos e perda protéica) foi quase totalmente abolida na ausência de células NK⁶¹.

Foi demonstrado, também, que a CD44 se torna uma molécula indutora de citotoxicidade em células NK e, em menor extensão, em células T, entre 24 e 48 horas após a adição de IL-2 e IL-12. É provável que a aquisição da capacidade indutora de citotoxicidade envolva modificação da própria CD44 ou de componentes que interagem direta ou indiretamente com ela. Esses dados levantam a possibilidade de que a expressão de receptores da CD44 em células alvo pode desencadear a resposta lítica em células NK ou em T ativadas⁶².

A natureza e o papel mediador das diversas isoformas da CD44, envolvidas na citotoxicidade dos linfócitos para células endoteliais e tumorais, também foram investigados. Tratamento de linfócitos normais com IL-2 aumenta a expressão genética da variante CD44 V6 e V7, e induz, de forma significativa, a SVC⁶³.

Camundongos sem CD44 V6-V7 e camundongos sem CD44 V7 demonstraram uma redução acentuada da SVC induzida pela IL-2. Nesses casos, os linfócitos diminuíram de forma significativa sua capacidade de aderir e mediar a lise das células endoteliais, que pode ser bloqueada pela clivagem enzimática do hialuronan, receptor da CD44. Finalmente, anticorpos antiCD44 V7 causam uma redução significativa tanto na aderência quanto na lise das células endoteliais, e levam à supressão da SVC induzida pela IL-2. Foi sugerido que a expressão da CD44 nas células citotóxicas tem um papel específico na lesão endotelial e que é possível reduzir especificamente a lesão endotelial, tendo como alvo a CD44 V7⁶³.



MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de estudo

A presente investigação foi realizada em pacientes do NCT (Núcleo de Cirurgia Cardiotorácica) e em pacientes do ICP (Instituto do Coração de Pernambuco), ambos localizados no Real Hospital Português, onde foram realizados os procedimentos cirúrgicos. Os procedimentos imunológicos foram realizados no LIKA (Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami), sediado na Universidade Federal de Pernambuco (anexo 1).

3.2 Tipo de estudo

Foi realizado um estudo prospectivo no qual se avaliou a expressão da CD44 na amostra de sangue total de um grupo consecutivo de 17 recém-nascidos e lactentes com cardiopatia congênita em 2007, que foram submetidos à cirurgia cardíaca com utilização da CEC nos primeiros dez meses de vida. Foram avaliados os seguintes grupos celulares: o dos linfócitos T e o agrupamento de todas as outras células (leucócitos polimorfonucleares e linfócitos B). Foram estudadas, em seguida, as populações de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺. Ademais, a expressão da CD44 em células NK também foi avaliada, em dez pacientes do mesmo grupo.

A pesquisa foi realizada em amostras de sangue total coletadas em tubos de EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) e encaminhadas para exame em caixas térmicas, no mesmo dia da coleta. As células foram marcadas com anticorpos monoclonais (antiCD56, antiCD3, antiCD44 e antiCD8) e o fenótipo das células foi determinado por citometria de fluxo. As amostras tiveram hemácias lisadas, e as células leucocitárias foram selecionadas.

3.3 Seleção

3.3.1 Critério de inclusão

- ❖ Crianças dos sexos masculino ou feminino com cardiopatia congênita que foram submetidas à cirurgia cardíaca com o uso da CEC, até 10 meses de vida.

3.3.2 Critério de exclusão

- ❖ Morte até as primeiras 6 horas do pós-operatório imediato, infecção pré-operatória ou outras doenças associadas.

3.4 Procedimentos

3.4.1 Procedimentos técnicos

3.4.1.1 Protocolo

Foram anotados os seguintes parâmetros:

Idade, peso, sexo, diagnóstico, cirurgia, tempo de CEC, tempo de isquemia miocárdica, necessidade de ventilação mecânica e inotrópicos.

O seguinte sistema de gradação (anotado pelo plantonista da UTI após 24 horas da cirurgia) foi utilizado, para avaliar a presença de edema pós-operatório:

- ❖ 0 - não apresentou edema;
- ❖ 1 - edema de pequeno a moderado (edema bipalpebral);
- ❖ 2 edema grave (generalizado).

3.4.1.2 Coleta

Pré-operatório: a primeira amostra sanguínea foi obtida por ocasião da inserção do cateter arterial no início da cirurgia. Um total de 0,5mL de sangue foi retirado, por paciente. Antes da coleta de cada amostra, 2mL de sangue arterial eram aspirados em uma seringa, contendo uma solução de heparina (0,5mL de SF 0,9% + heparina 1mL) e os 0,5mL retirados com outra seringa, de modo a garantir um suprimento de sangue livre de diluições. Em seguida, os 2mL eram devolvidos.

Pós-operatório: foram coletados 0,5mL de sangue ao fim da cirurgia e, em seguida, o sangue foi retirado na mesma quantidade de forma seriada (de quatro em quatro horas), em um total de dez amostras para cada paciente, por meio do cateter percutâneo previamente inserido durante a monitorização cirúrgica.

3.4.2 Procedimento cirúrgico

Anestesia geral foi induzida com sevoflurano (concentração que variou de 0,75 a 1 CAM (concentração alveolar mínima) e mantida com o mesmo agente e com o opióide alfentanil 30 a 50µg/Kg. Relaxamento muscular foi obtido com rocurônio 0,6mg/Kg. Todos os pacientes foram ventilados mecanicamente e ajustados com gasometria arterial, oximetria de pulso e capnógrafo. Monitorização invasiva incluiu cateter venoso central, cateterização da artéria radial e sonda vesical. Drogas inotrópicas, como dopamina, dobutrex, adrenalina e amilrinona foram iniciadas antes da saída da CEC, quando necessário. Cefuroxime (100mg/Kg) foi iniciada após a indução da anestesia e mantida por dois dias.

3.4.2.1 Técnica de circulação extracorpórea

Técnica usual de circulação extracorpórea foi realizada em todos os pacientes. Foi utilizado o Oxigenador Liliput (Dideco), a Biopump Infantil (Medtronic) e o Hemoconcentrador Infantil (Edwards). O circuito foi preenchido com concentrado de hemácias (100mL), Ringer Lactato (200mL), Manitol 20% (5mL/Kg), Bicarbonato de Sódio (8,4%, 10 mL) e Solumedrol (30mg/Kg).

A heparinização foi realizada com 4mg/Kg, para manter o tempo de coagulação ativado acima de 400 segundos, e foi revertida com quantidade equivalente de sulfato de protamina. O hematócrito foi mantido em $25\pm 2\%$. A cardioplegia utilizada foi a cristalóide (St. Thomas) 10mL/Kg e repetida a cada 40 minutos. Na maioria dos pacientes, a temperatura foi mantida a 30°C, a não ser no paciente para o qual foram necessárias a hipotermia profunda (18°C) e a parada circulatória total. O fluxo na perfusão foi de 1,8 a 2,4L/m X Superfície Corpórea. No término do CEC, o hemoconcentrador retirou a quantidade de cristalóide administrada.

Após a cirurgia, as crianças foram encaminhadas à unidade de recuperação pós-operatória, e os cuidados foram adaptados às necessidades individuais. Nenhum protocolo especial foi seguido.

3.4.3 Procedimento imunológico

Foram coletadas assepticamente amostras de 500 μ L de sangue venoso em tubos contendo K₃EDTA (ácido etileno diamino tetracético tripotássico) estéril. O sangue foi mantido a uma temperatura ambiente para proceder às marcações (20–

25°C). As amostras de 10µL de sangue total foram incubadas por 30 minutos a uma temperatura ambiente e ao abrigo da luz, com os anticorpos monoclonais nas concentrações de 20µL/10⁶ células.

Os anticorpos monoclonais utilizados foram antiCD44 R-PE (BD Pharmigen, USA) + antiCD3 PECy5 (BD Pharmigen, USA) ou antiCD44 R-PE (BD Pharmigen, USA) + antiCD56 PECy5 (BD Pharmigen, USA), para detectar a expressão de CD44 em linfócitos e células NK, respectivamente; e antiCD8 R-PE (BD Pharmigen, USA) + antiCD3 PECy5 (BD Pharmigen, USA), para detectar linfócitos citotóxicos.

Após a incubação, foi adicionada a solução GUAVA 1X Lysing Solution (180 µL), para lisar os eritrócitos. Foi realizada incubação por 15 minutos a uma temperatura ambiente. As amostras foram diluídas com PBS pH 7,2; 0,01M (solução tampão de Fosfato), para ajustar a sensibilidade do aparelho (500 células/µl). As amostras foram agitadas em Vortex e, em seguida, as células foram separadas por citometria de fluxo (Guava PCA); as populações de células foram avaliadas pelo programa Cytosoft versão 2.1.4 (Guava Technologies Inc., USA).

3.4.4 Procedimentos analíticos

Os dados foram resumidos através das médias e dos desvios padrão. Para estudar a variação, ao longo do tempo, das médias da percentagem de cada tipo de célula, foram ajustados modelos de regressão linear para dados correlacionados. Nesses modelos, a variável resposta foi a proporção de células, e a variável preditora foi o tempo. A significância dos parâmetros do modelo de

regressão foi avaliada pelo teste t de Student. Nesse teste, foi adotado o nível de significância de 0,05. A análise estatística foi realizada com o “software” Stata 9.2.

3.4.5 Procedimentos éticos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa em Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil (anexo 2). A investigação teve início com o protocolo de pesquisa (anexo 3), o termo de consentimento livre e esclarecido foi obtido por escrito dos guardiões legais dos pacientes (anexo 4).



RESULTADOS

4.1 Avaliação clínica

Um total de 17 crianças foram submetidas à cirurgia, sendo 09 do sexo feminino. Quatro crianças foram a óbito: duas nas primeiras quatro horas do início dos procedimentos, que foram excluídas do estudo; e duas que evoluíram para óbito na 8^a e na 20^a hora do pós-operatório. Estas foram mantidas no estudo por sobreviverem às primeiras oito horas pós-procedimento.

Foram realizadas quatro correções de comunicação interventricular (CIV), cinco cirurgias de correção anatômica da transposição das grandes artérias (Jatene), duas cirurgias de Damus-Kaye-Stansel (DKS) para dupla via de entrada do ventrículo esquerdo, três correções para canal atrioventricular total (CAVT) e uma cirurgia de Norwood para hipoplasia de ventrículo esquerdo. A média dos pesos das crianças foi de $4,3 \pm 1,3$ Kg, e a média das idades foi de 4 ± 2 meses.

Quase todas as crianças apresentaram, no pós-operatório imediato, disfunção de múltiplos órgãos, que variou de intensidade e demandou assistência ventilatória e suporte inotrópico por mais de 24 horas. (Tabela 1)

As médias dos tempos de CEC e de isquemia cardíaca foram, respectivamente: 109 ± 42 e 70 ± 35 minutos. Quatro pacientes apresentaram edema severo entre 12 e 24 horas, com média de tempo de CEC de 136 ± 30 minutos e média de tempo de anoxia-TA de 90 ± 43 minutos. Cinco crianças apresentaram edema pequeno ou moderado (CEC 75 ± 37 minutos TA 47 ± 21 minutos) e quatro não apresentaram edema (CEC 93 ± 40 minutos TA 70 ± 30 minutos). Os dois pacientes que evoluíram para óbito apresentaram edema pequeno ou moderado na oitava hora (CEC 145 ± 21 minutos TA 86.5 ± 44 minutos). (Tabela 1)

Tabela 1. Parâmetros clínicos, cirúrgicos e de pós-operatório

Idade	Peso Kg	Diagnóstico	Cirurgia	TCEC'	TA'	Edema24h	I	AV
3m	3,0	CIV	CIV	60	45	1	+	-
4m	5,0	TGA	JATENE	130	60	1	+	+
3m	3,8	DVEVE	DKS	135	85	2	+	+
4m	3,8	CAVT	CAVT	50	35	0	+	+
15d	3,0	TGA	JATENE	117	100	0	+	+
2m	3,6	TGA	JATENE	175	150	2	+	+
3m	4,6	HCE	NORWOOD	105	47	2	+	+
6m	6,0	CIV	CIV	95	75	1	+	+
2m	5,2	TGA	JATENE	135	90	0	+	+
10m	6,0	CAVT	CAVT	48	32	1	+	+
10m	7,0	DVSVE	DKS	130	80	2	+	+
5m	5,8	CIV	CIV	42	24	1	+	+
7m	4,8	CIV	CIV	70	55	0	+	+
2m	3,6	CAVT	CAVT	160	118	Óbito 20h1	+	+
1m	3,0	TGA	JATENE	130	55	Óbito 08h1	+	+

Diagnóstico: CIV (Comunicação interventricular), TGA (Transposição das grandes artérias), DVEVE (Dupla via de entrada do ventrículo Esquerdo),CAVT(Canal atrioventricular total), HCE (Hipoplasia de coração esquerdo), DKS (Damus – Kaye – Stansel).

TCEC : tempo de CEC, TA: tempo de anoxia, Edema :0 sem edema, 1 pequeno a moderado, 2 severo I (Inotró) + : utilizado,AV + :utilizada.

4.2 Expressão da CD44 em células brancas CD44+ CD3-

Foi observado um aumento significativo no percentual das células CD44+ CD3- nos pacientes, desde o pré-operatório até oito horas do final da cirurgia. Essa tendência se manteve até 32 horas, apesar de não haver, a partir das oito horas do pós-operatório, variação significativa da média. (Gráfico 1; Tabelas 2 e 3; Fig. 1)

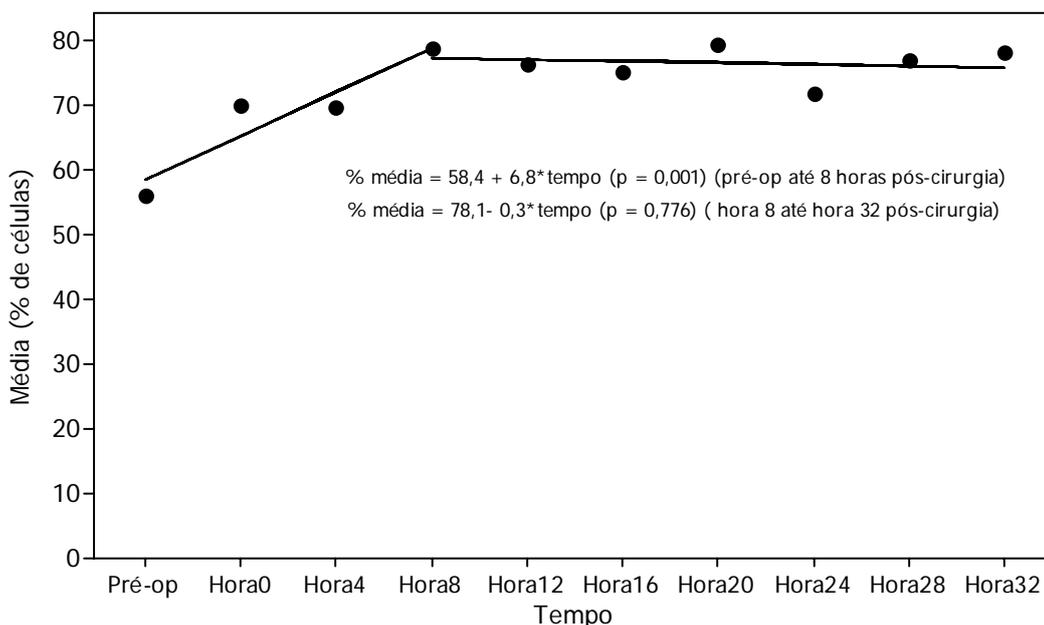


Gráfico 1. Variação das médias das percentagens de células CD44+ CD3-

Na Tabela 2 e no Gráfico 1, observam-se as médias e os desvios padrão das percentagens de células polimorfonucleares CD44+ CD3 -, no pré-operatório, logo após a cirurgia, e no pós-operatório. O ajuste de modelos de regressão para dados correlacionados indica um crescimento significativo na média das proporções de CD44+ CD3-, desde o pré-operatório até oito horas após a cirurgia ($p = 0,001$). Entretanto, a partir de oito horas do pós-operatório até o final das observações, não houve evidência de variação significativa das médias dessas proporções ($p = 0,776$).

Tabela 2. Médias e desvios padrão das porcentagens de células CD44+ CD3-

	Pré-op	Hora(s)								
		0	4	8	12	16	20	24	28	32
Média	56,0	69,9	69,8	78,7	76,4	75,2	79,5	71,8	77,0	78,1
DP	18,7	16,7	23,9	13,6	13,7	14,4	9,8	23,4	10,9	14,1

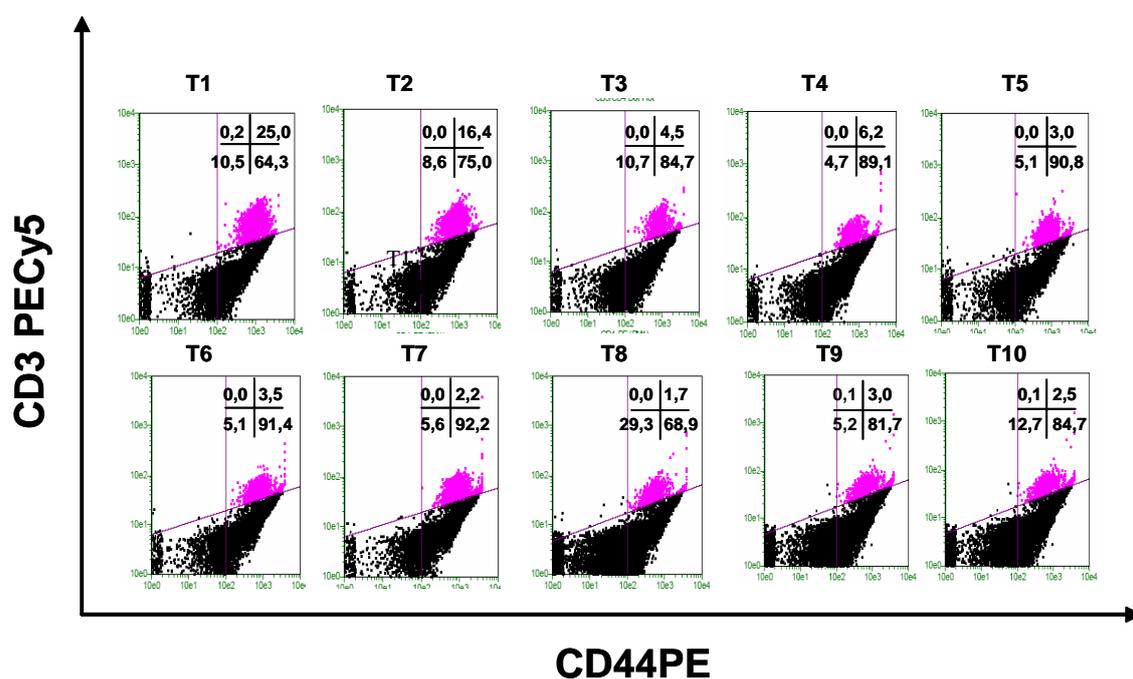


Figura 1 - As células foram marcadas com antiCD44 (CD44 PE) e antiCD3 (CD3 PEcy5) e separadas por citometria de fluxo. Quadrante superior direito (CD3+ CD44+), quadrante inferior direito (CD44+ CD3-), quadrante superior esquerdo (CD3+ CD44-), quadrante inferior esquerdo (CD3- CD44-). Dados relativos ao paciente número 11.

Tabela 3. Dados da Fig.1 relativos ao paciente número 11

	Paciente 11									
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
CD3+ CD44-	0,2	0	0	0	0	0	0	0	0,1	0,1
CD3+ CD44+	25,0	16,4	4,5	6,2	3,0	3,5	2,2	1,7	3,0	2,5
CD3- CD44-	10,5	8,6	10,7	4,7	6,0	5,1	5,6	29,3	15,2	12,7
CD3- CD44+	64,3	75,0	84,7	89,1	90,8	91,4	92,2	68,9	81,7	84,7

4.3 Expressão da CD44 em linfócitos T (CD44+ CD3+)

Foi evidenciado, nas crianças investigadas, um padrão celular de comportamento estatisticamente significativo, caracterizado por uma depleção percentual de linfócitos T CD44+, com pico na quarta hora após o término da cirurgia. (Gráfico 2; Tabelas 3 e 4; Fig.1)

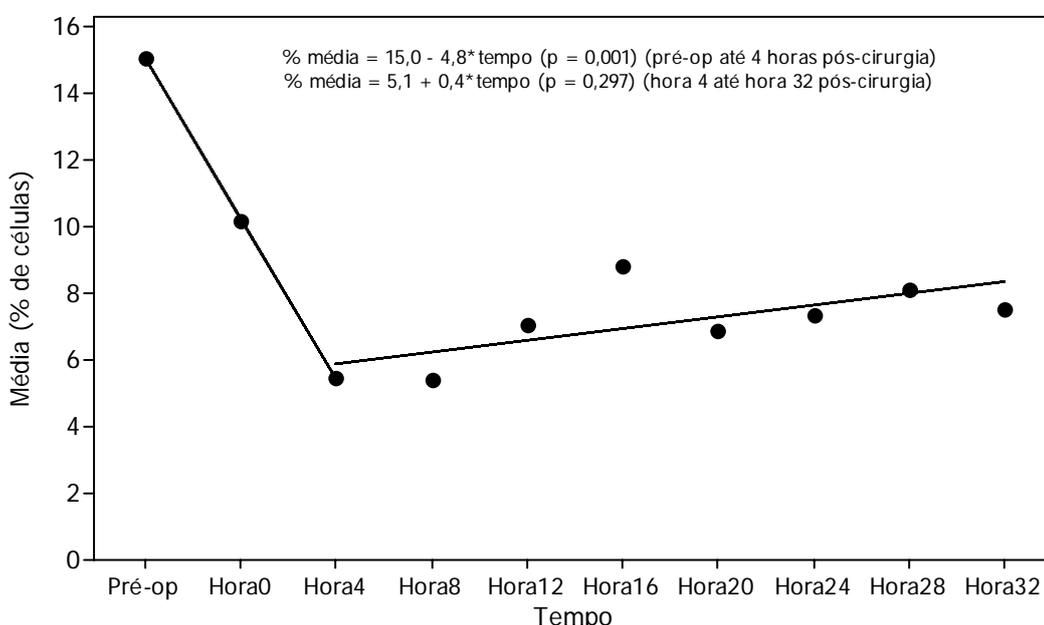


Gráfico 2. Variação das médias das percentagens de linfócitos TCD44+ TCD3+

Na Tabela 4 e no Gráfico 2, observam-se as médias e os desvios padrão das percentagens de linfócitos TCD3+ CD44+, no pré-operatório, logo após a cirurgia (Hora0), e no pós-operatório. O ajuste de modelos de regressão para dados correlacionados indica decréscimo significativo nas médias das proporções de linfócitos CD3+ CD44+, desde o pré-operatório até quatro horas após a cirurgia ($p = 0,001$). Entretanto, a partir de quatro horas do pós-operatório até o final das

observações, não houve evidência de variação significativa das médias dessas proporções ($p = 0,297$).

Tabela 4. Médias e desvios padrão da porcentagem de linfócitos T CD3+ CD44+

	Pré-op	Hora(s)								
		0	4	8	12	16	20	24	28	32
Média	15,0	10,2	5,5	5,4	7,0	8,8	6,9	7,3	8,1	7,5
DP	7,4	5,1	3,6	3,3	5,0	6,4	3,8	5,9	6,5	7,8

4.3.1. Avaliação dos linfócitos T citotóxicos (TCD3+ TCD8+)

Os resultados mostram o perfil da população de linfócitos T CD8+ nos pacientes estudados. (Gráfico 3, Tabelas 5 e 6, Fig. 2)

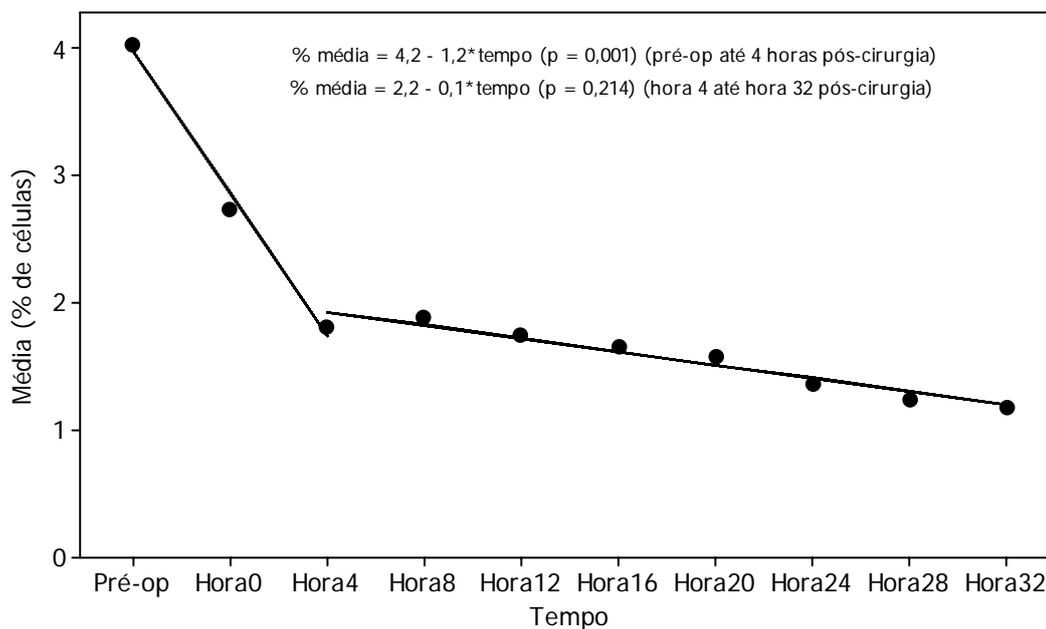


Gráfico 3. Variação das médias das porcentagens de linfócitos citotóxicos TCD3+ TCD8+

Na Tabela 5 e no Gráfico 3, observam-se as médias e os desvios padrão das percentagens de linfócitos citotóxicos TCD3+ TCD8+ no pré-operatório, logo após a cirurgia (Hora0), e no pós-operatório. O ajuste de modelos de regressão para dados correlacionados indica decréscimo significativo nas médias das proporções de linfócitos citotóxicos TCD3+ TCD8+, desde o pré-operatório até quatro horas após a cirurgia ($p = 0,001$). Entretanto, a partir de quatro horas do pós-operatório até o final das observações, não houve evidência de variação significativa da média dessa proporção ($p = 0,249$).

Tabela 5. Médias e desvios padrão das percentagens de células TCD3+ TCD8+

	Pré-op	Hora(s)								
		0	4	8	12	16	20	24	28	32
Média	4,2	2,8	1,9	2,0	1,8	1,7	1,6	1,4	1,2	1,2
DP	2,7	1,7	1,5	2,0	1,9	1,4	0,8	0,8	0,9	0,7

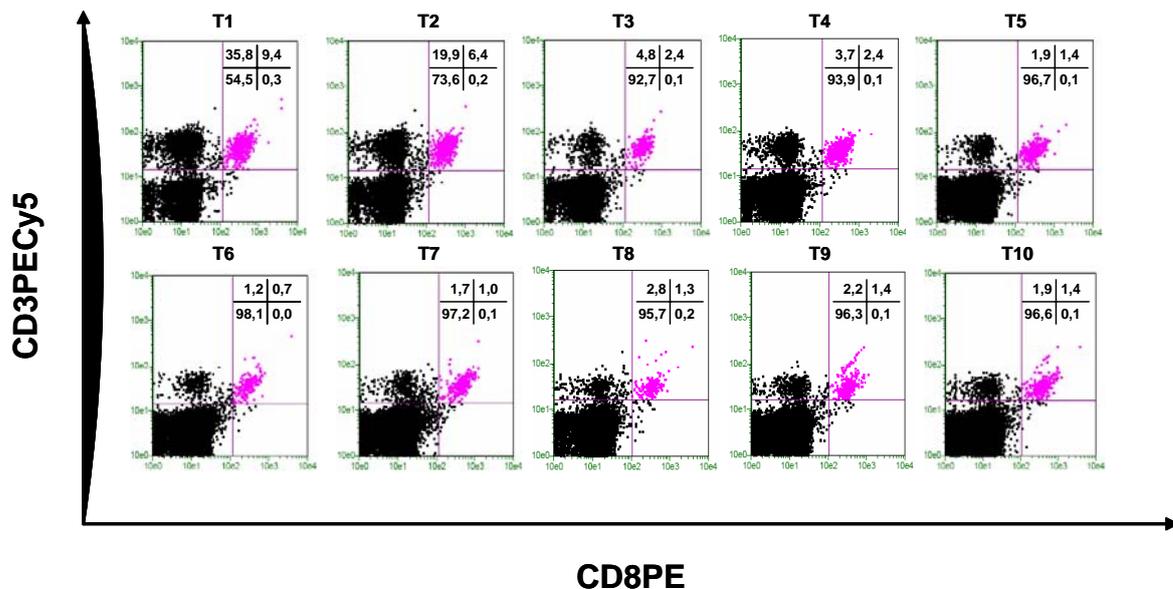
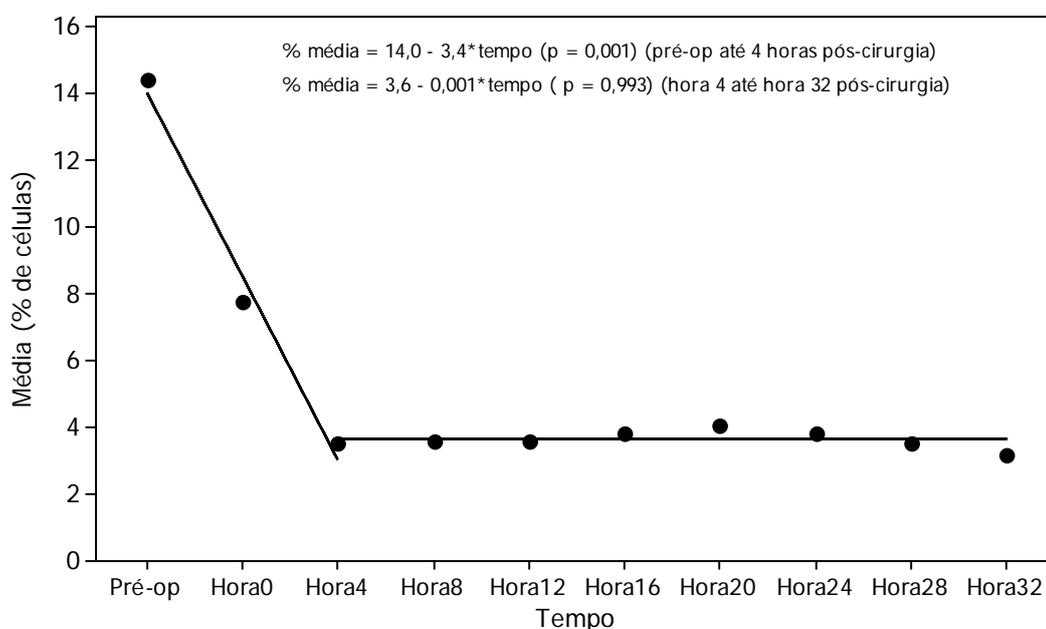


Figura 2 - As células foram marcadas com antiCD3 (CD3 PEcy5) e antiCD8 (CD8PE) e separadas por citometria de fluxo. Quadrante superior direito CD3+ CD8+ (linfócitos citotóxicos). Quadrante superior esquerdo CD3+ (linfócitos T, citotóxicos e auxiliares).

Tabela 6. Dados da Fig. 2 relativos ao paciente número 11

	Paciente 11									
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
CD3+ CD8-	35,8	19,9	4,8	3,7	1,9	1,2	1,7	2,8	2,2	1,9
CD3+ CD8+	9,4	6,4	2,4	2,4	1,4	0,7	1,0	1,3	1,4	1,4
CD3- CD8-	54,5	73,6	92,7	93,9	96,7	98,1	97,2	95,7	96,3	96,6
CD3- CD8+	0,3	0,2	0,1	0,1	0,1	0	0,1	0,2	0,1	0,1

4.3.2. Avaliação dos linfócitos auxiliares TCD3 + TCD8- (TCD4+) (Gráfico 4, Tabela 7)


Gráfico 4. Variação das médias das percentagens de linfócitos auxiliares TCD3+TCD8- (TCD4+)

Na Tabela 7 e no Gráfico 4, observam-se as médias e os desvios padrão das percentagens de linfócitos auxiliares TCD3+ TCD8- (TCD4+), no pré-operatório, logo após a cirurgia (Hora0), e no pós-operatório. O ajuste de modelos de regressão para dados correlacionados indica decréscimo significativo na média da proporção de TCD3+TCD8- (TCD4+), linfócitos auxiliares, desde o pré-operatório até quatro horas após a cirurgia ($p = 0,001$). Entretanto, a partir de quatro horas do pós-

operatório até o final das observações, não houve evidência de variação significativa da média dessa proporção ($p = 0,993$).

Tabela 7. Médias e desvios padrão das percentagens de linfócitos auxiliares TCD3+ TCD4+

	Pré-op	Hora(s)								
		0	4	8	12	16	20	24	28	32
Média	14,4	7,7	3,5	3,5	3,5	3,8	4,0	3,8	3,5	3,1
DP	9,1	4,7	2,0	2,6	2,5	3,0	2,2	2,2	2,8	2,4

4.4 Expressão da CD44 em células NK (CD56+ CD44+)

O percentual de células NK CD56+ CD44+ também apresentou o mesmo padrão de queda significativa até a quarta hora de pós-operatório, seguido de aumento aparente, mas não significativo no começo do segundo dia (28ª hora) e maior na 32ª hora. (Fig. 3, Tabelas 8 e 9, Gráfico 5)

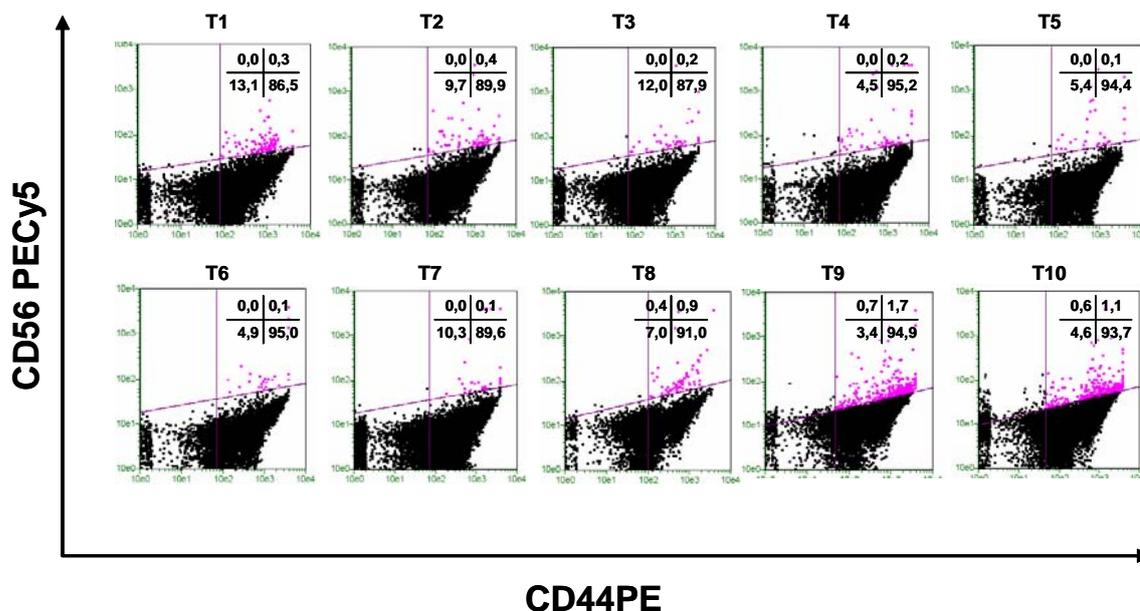
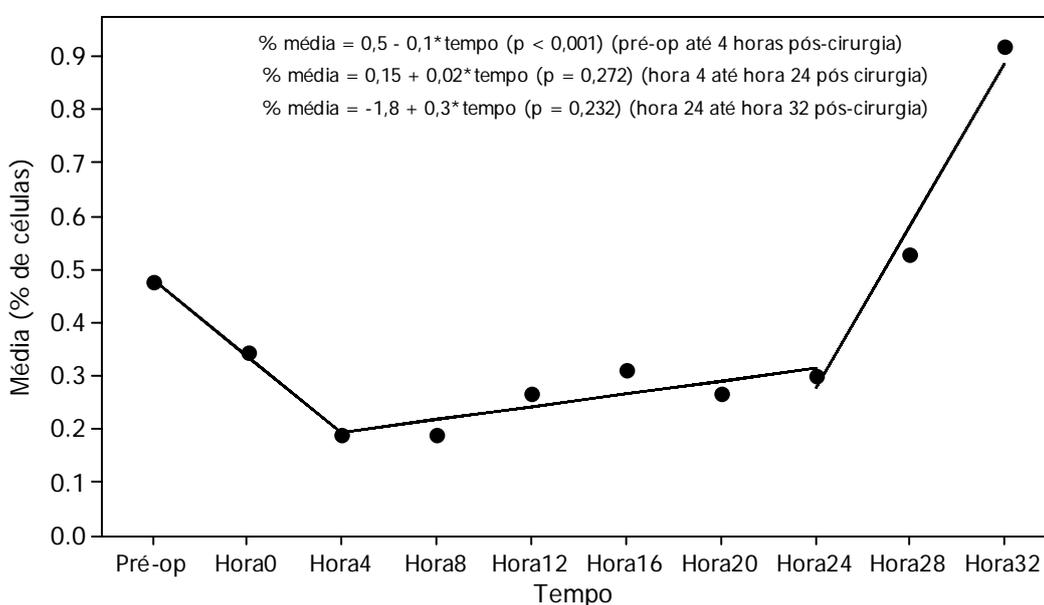


Figura 3. As células foram marcadas com antiCD44 (R-PE) e antiCD56 (PECy5) e separadas por citometria de fluxo. Quadrante superior direito CD56+ CD44+ (células NK CD44+).

Tabela 8. Dados da Fig.3 relativos ao paciente número 11

	Paciente 11									
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
CD56+ CD44-	0	0	0	0	0	0	0	0,4	0,7	0,6
CD56+ CD44+	0,3	0,4	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,9	1,7	1,1
CD56- CD44-	13,1	9,7	12,0	4,5	5,4	4,9	10,3	7,7	3,4	4,6
CD56- CD44+	86,5	89,9	87,9	95,2	94,4	95,0	89,6	91,0	94,9	93,7


Gráfico 5. Variação das médias das percentagens de células NK, CD44+ CD56+

Na Tabela 9 e no Gráfico 5, observam-se as médias e os desvios padrão das percentagens de células NK CD44+, no pré-operatório, logo após a cirurgia (Hora0), e no pós-operatório. O ajuste de modelos de regressão para dados correlacionados indica decréscimo significativo nas médias das proporções de NK CD44+, desde o pré-operatório até quatro horas após a cirurgia ($p < 0,001$). Entretanto, a partir de quatro horas do pós-operatório até 24 horas e de 24 horas até

32 horas, não houve evidência de variação significativa da média dessas proporções ($p = 0,272$ e $p = 0,232$, respectivamente).

Tabela 9. Média e desvio padrão da porcentagem de células NK CD44+

	Pré-op	Hora(s)								
		0	4	8	12	16	20	24	28	32
Média	0,5	0,3	0,2	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,5	0,9
DP	0,2	0,1	0,1	0,1	0,3	0,4	0,3	0,3	0,6	1,3



DISCUSSÃO

O presente modelo de pesquisa levou em consideração as dificuldades inerentes ao estudo com seres humanos e, em especial, com crianças pequenas, portadoras de cardiopatias complexas, no pós-operatório imediato da cirurgia cardíaca. O número de pacientes envolvidos foi o suficiente para obter resultados estatisticamente significantes, o volume da amostra sanguínea o menor possível e avaliações clínicas como, por exemplo, a simples pesagem foi proibitiva para evitar distúrbio hemodinâmico.

Foi avaliada a expressão da CD44 em leucócitos (polimorfonucleares, linfócitos e células NK), do sangue periférico, em crianças de baixo peso (médio de $4,3 \pm 1,3$ Kg) submetidas a cirurgias cardíacas com CEC, na tentativa de estabelecer uma conexão entre essa molécula de adesão e a SVC, encontrada no pós-operatório de cirurgias cardíacas em crianças.

Foi também avaliado o comportamento das células TCD4+ e TCD8+ dentro da população dos linfócitos, no que se refere ao percentual de células no pós-operatório imediato.

Na análise da presente casuística, chama-se a atenção para a complexidade das doenças que demandam correção nos primeiros dez meses de vida e, portanto, implicam cirurgias mais prolongadas e difíceis, o que pode explicar o fato de todas as crianças fazerem uso de inotrópicos e, com exceção de uma, necessitem de assistência ventilatória por mais de seis horas. Os sinais e sintomas variaram de intensidade. No entanto, comparações entre os parâmetros clínicos e os achados laboratoriais demandariam um número maior de pacientes para que fossem estabelecidas semelhanças e diferenças de forma significativa.

Apesar das dificuldades para estabelecer um padrão clínico na determinação da síndrome do extravasamento vascular nas crianças submetidas à cirurgia, pôde-se observar algum grau de edema em mais de 70% desses pacientes. Além disso, houve uma tendência de as crianças com maior tempo médio de CEC e anoxia cardíaca apresentarem as formas mais graves de edema pós-operatório.

Esses resultados se assemelham aos encontrados por Seghaye¹, cujo trabalho relata que 13 dentre 24 neonatos desenvolveram SVC na cirurgia de transposição dos grandes vasos. No presente trabalho, tentamos associar a presença de edema a quadros inflamatórios determinados pelo fenótipo das células leucocitárias.

Os resultados obtidos demonstraram uma significativa depleção percentual progressiva em linfócitos T, CD3+ CD44+ e células NK, CD56+ CD44+, até quatro horas do término da cirurgia, além de um crescimento percentual progressivo significativo na população CD3- CD44+, nas primeiras oito horas de UTI, que se manteve elevada. Essa última população é provavelmente formada por leucócitos polimorfonucleares, monócitos e linfócitos B. O pequeno número de amostras pode ter prejudicado o resultado mais tardio, e não se pode avaliar concretamente o papel dessas células nesse tempo.

O resultado encontrado é surpreendente porque oferece suporte para se começar a elucidar novos mecanismos envolvidos na reação à CEC em crianças. Certamente, vários fatores atuam sinergicamente e são responsáveis pela injúria à parede do endotélio vascular, levando ao desenvolvimento do edema. Todavia, acreditamos que o aumento de expressão da CD44 nos leucócitos

polimorfonucleares, associado à depleção de linfócitos devido a mecanismos citotóxicos, seja um dos principais responsáveis pela SVC pós-CEC.

Considerando-se que exista um estado de imunossupressão celular pós-CEC, cabe discutir quais os mecanismos envolvidos. No grupo de estudo do presente trabalho, não se pode descartar a possibilidade de um efeito dilucional, já que todas as crianças receberam transfusão sanguínea. No entanto, foi demonstrado um aumento progressivo significativo de células CD3- CD44+. Um fator dilucional contrariaria esse resultado.

Apesar da diminuição de toda a população TCD3+, os resultados mostram uma significativa diminuição de linfócitos TCD4+, que reduzem percentualmente quatro vezes no tempo de quatro horas pós-cirurgia, enquanto as células TCD8+ também diminuem, mas na proporção de duas vezes. A relação entre os linfócitos TCD4+ e TCD8+ caiu de 3,4:1, no pré-operatório, para 1,3:1, na quarta hora do pós-operatório. Os resultados da atual investigação corroboram os achados de outros pesquisadores que utilizaram diferentes modelos^{26,64,65}.

Um estudo imunológico foi realizado em pacientes com insuficiência cardíaca grave, nos quais foram implantados aparelhos de assistência ventricular esquerda em comparação com controles. Esses pacientes também apresentaram linfopenia e excessiva apoptose de TCD4+ e TCD8+. A suscetibilidade à apoptose foi duas vezes maior para TCD4+ do que para TCD8+. A consequência clínica foi uma maior prevalência de infecções por fungos⁶⁴.

Uma resposta com alguma similaridade foi encontrada na sepse, na qual a imunossupressão do hospedeiro contribui para a letalidade da doença, e onde se evidencia uma profunda depleção de células TCD4+ e células B, mediadas pela caspase-9, ou seja, apoptose de linfócitos com envolvimento mitocondrial⁶⁵.

A resposta imunológica celular nas cirurgias coronárias com e sem CEC foi avaliada. Os pacientes que receberam transfusão sangüínea foram excluídos. As células TCD4+ diminuíram de forma significativa logo após a CEC, assim como as células TCD8+, mas não tanto quanto a TCD4+. Os níveis de células NK também diminuíram de forma significativa após a CEC, mas o grau de ativação aumentou²⁶.

Em estudo prospectivo, realizado em 40 pacientes adultos, no qual se verificou a hipótese do fator dilucional, as células TCD4+, apesar da redução numérica, estavam mais ativas no primeiro dia, quando comparadas com as de qualquer outro dia do pós-operatório²⁷.

A literatura^{26,27} mostra, portanto, que na resposta imunológica celular à CEC, tanto linfócitos quanto células NK, apesar da redução numérica, estão funcionalmente mais ativos, e, além disso, a depleção é diferenciada, afetando mais as células TCD4+ do que as TCD8+.

Na literatura médica, a grande maioria dos autores escreve sobre a importância da resposta inflamatória sistêmica da CEC, mas pouco se comenta sobre a resposta antiinflamatória. O sistema de proteção imunológica à CEC foi discutido por Tarnock e colaboradores¹⁷, os quais sugeriram a importância do envolvimento da IL-10 na resposta à CEC em crianças e a indução de resposta sistêmica antiinflamatória transiente, com mudanças na população e no grau de ativação de leucócitos, além de imunossupressão periférica com prevalência Th2 sobre Th1, e, portanto, com predomínio da imunidade humoral sobre a celular⁶⁶.

Uma resposta antigênica desproporcional pode desencadear morte celular, tanto de células hematopoiéticas circulantes como de células endoteliais fixas. A resposta imunológica é complexa, com inúmeros fatores participantes⁴¹.

Nas crianças do atual estudo, é possível que mecanismos de apoptose tenham sido ativados nas fases iniciais do processo imunológico, antes mesmo da proliferação celular, o que seria uma explicação para a intensa depleção dos linfócitos.

Cirurgia cardíaca, em particular com CEC e cardioplegia, desencadeia inflamação do miocárdio e apoptose²⁹. A CEC está associada à liberação de moléculas pró-apoptose, como o TNF- α , e ao aumento da Bax. Além disso, a DMRA está presente precocemente no período pós-operatório em cordeiros na fase neonatal³⁰.

A IL-2 é capaz de induzir morte aos linfócitos, assim como seu crescimento. Se o potencial para a ativação da morte celular (apoptose) se tornar dominante, os linfócitos cometerão suicídio ou fratricídio⁵².

Foi demonstrado que a CD44 também tem papel importante na morte celular induzida. É conhecido que a ativação de células T aumenta a expressão da CD44. A sinalização através da CD44 leva ao aumento da apoptose nas células T, TCR ativadas, mas não nas células T em repouso⁵⁴.

Analisando-se os gráficos 2 e 5 do presente estudo, pode-se observar que as células T e as células NK expressaram CD44+ e foram diminuindo percentualmente em número, o que se adapta ao modelo de apoptose descrito acima. Porém, uma outra possibilidade é a seqüestração de linfócitos e células NK no nível do endotélio ativado, produzindo alterações na morfologia endotelial, com perda da integridade da parede vascular e extravasamento de constituintes plasmáticos.

É importante salientar que em um estudo de pacientes submetidos à CEC, o sangue foi capaz de induzir apoptose em culturas de células endoteliais,

principalmente seis horas após a cirurgia³³. Em outro estudo de pacientes com a síndrome do vazamento capilar idiopática ativa, o sangue foi capaz de induzir extensa e precoce apoptose das células endoteliais, em contraste com o de pessoas normais⁵.

Foi considerada a hipótese de que uma alteração do mecanismo de apoptose pudesse levar à lesão endotelial na SVC, induzida pela IL-2. Evidências mostraram, nesta pesquisa, que a perforina e a FAS têm papel importante como efetoras da citotoxicidade mediada por linfócitos citotóxicos e células NK. Esse estudo também demonstrou um aumento na percentagem de células TCD8+ e a conseqüente diminuição percentual da célula TCD4+, associado a um significativo aumento da expressão da CD44 nas células T, em todos os camundongos testados, quando comparados com controles⁶⁷.

Foi demonstrado um infiltrado perivascular de linfócitos TCD8+ ao redor de células endoteliais danificadas na SVC idiopática. No mesmo estudo, foi demonstrado o aparecimento de células positivas para o receptor IL-2, durante o ataque no mesmo paciente⁶⁸.

A participação da IL-2 na reação imunológica pós-CEC, assim como o papel ativo de linfócitos tóxicos e células NK, têm sido pouco explorados. A SVC, induzida pela IL-2, tem sido exaustivamente estudada em animais. A reação imunológica das crianças à CEC é bem mais difícil de ser avaliada, e não se sabem os pontos de intersecção entre as duas síndromes. No entanto, foi verificado que, após a CEC, a IL-2R está ativada^{18,19}, o que pode sugerir uma via final comum nos dois casos.

Evidências mostram que o endotélio presente nas paredes vasculares, e principalmente nas vênulas, exerce uma ação crítica no recrutamento de células

imunológicas e pode influenciar a resposta imune. Evidências também indicam que células NK, ativadas pela IL-2, adquirem a capacidade de aderir ao endotélio vascular, sendo esse processo extremamente seletivo, correlacionando-se com o processo de morte celular⁵⁵.

Sabe-se que a IL-2, de uma forma dose-dependente, induz linfócitos a aderirem fortemente ao endotélio celular e a serem altamente tóxicos para essas células. A lise do endotélio é mediada por linfócitos ativados tanto da linhagem dos grandes granulares quanto dos pequenos agranulares. Ambos, TCD4+ e TCD8+, estão envolvidos na citólise do endotélio vascular, mediada pela IL-2⁵⁹.

Na SVC induzida pela IL-2 em animais, a passagem dos linfócitos ativados através do endotélio foi um achado proeminente. Nas áreas de contato com os linfócitos, as células endoteliais pareciam danificadas de forma variável⁶⁰.

No presente estudo, foram envolvidos linfócitos T (CD44+) e células NK (CD44+). A depleção dessas células nas primeiras horas do pós-operatório, associada à presença de edema em mais de 70% dos pacientes, são resultados compatíveis com dano às células endoteliais, com a participação de células citotóxicas, apesar de não se poderem confirmar essas explicações.

Pode-se chamar também a atenção para a possibilidade da importância da CD44 na SVC pós-CEC em crianças, pois foi demonstrado em animais que, na ausência da CD44, a lesão do endotélio vascular é significativamente reduzida e, portanto, que a CD44 tem um papel relevante na lesão endotelial da síndrome do vazamento capilar. Assim, o seu bloqueio "in vivo" pode potencialmente prevenir a lesão das células endoteliais por linfócitos citotóxicos em uma variedade de modelos clínicos⁴.

A ativação da CD44 e a habilidade para se envolver no rolamento de linfócitos ocorrem diretamente, através de anticorpos policlonais ou através de antígenos específicos para receptores T. Esses resultados conectam a CD44 com a iniciação da resposta imune^{38,69}.

Foi demonstrado que a ligação entre a CD44 dos linfócitos e seu receptor, o hialuronan, pode mediar a aderência primária de linfócitos ao endotélio vascular³⁹. E, ainda, que a estimulação da CD44 com anticorpo monoclonal aumenta a atividade citotóxica de células NK e linfócitos, e induz a liberação de TNF- α e IL-1B em monócitos⁴³.

A expressão do hialuronan em culturas de células endoteliais e culturas primárias de endotélio é induzida por citocinas pró-inflamatórias, TNF- α e IL-1B, assim como pelo lipopolissacarídeo bacteriano, criando locais receptivos para a interação CD44/hialuronan e extravasamento de células inflamatórias⁴⁰. Todos esses fatores são produzidos durante a CEC^{16,20,28}.

Ambas as células, TCD4+ e T CD8+, foram incluídas na população que se liga ao hialuronan e é fortemente positiva para o CD44. Foi também demonstrado que quase todas as células efectoras citotóxicas são encontradas nessa população celular⁵⁰.

Finalmente, foi demonstrado, em animais, que a expressão da CD44 nas células citotóxicas tem um papel específico na lesão endotelial, e que é possível reduzir especificamente a lesão endotelial, tendo como alvo a CD44 V7 (variante genética)⁶³.

A síndrome do vazamento capilar da CEC parece ter muitas semelhanças à induzida pela IL-2 exógena experimental e à do tratamento de câncer ou à SVC idiopática, precisando dessa forma ser mais bem avaliada. Na

revisão da literatura, pode-se observar que a resposta imunológica à CEC é complexa, com envolvimento de diferentes moléculas e com uma variabilidade que depende do hospedeiro^{6-9,12,14-16}.

No presente estudo, observa-se um aumento percentual progressivo de células CD3- CD44+, mas a importância desse fato ainda não está esclarecida. É interessante salientar o comportamento diferenciado dessas células com relação aos linfócitos T e às células NK.

A ativação de moléculas de adesão de neutrófilos e a subsequente aderência dos neutrófilos ao endotélio vascular podem ter papel fundamental na síndrome inflamatória pós-CEC. No entanto, apesar da ativação generalizada de neutrófilos, a maioria dos pacientes se recupera da CEC sem problemas, o que sugere que exista um mecanismo “in vivo” que limite a resposta inflamatória²⁵.

Sabe-se, no entanto, que a expressão da CD44 aumenta rapidamente em neutrófilos e nas células endoteliais de capilares na lesão de isquemia e reperfusão renal, o que provoca recrutamento de neutrófilos para esses tecidos isquêmicos. A ativação de neutrófilos aumenta também a expressão do hialuronan⁴⁴.

Os neutrófilos contêm enzimas citotóxicas: lisozima, elastase e mieloperoxidase. Produzem, ainda, radicais livres de oxigênio e peróxido de hidrogênio, ambos extremamente citotóxicos. A ativação do complemento e dos neutrófilos pode aumentar o edema perivascular por ataque direto à parede dos vasos¹⁵.

É importante, no futuro, avaliar a relação entre o hialuronan e seu receptor CD44 na síndrome inflamatória sistêmica da CEC, assim como o envolvimento da IL-2, o processo de apoptose, as células citotóxicas (T, NK), os leucócitos polimorfonucleares e sua relação com o endotélio.

Um fato relevante no estudo atual é a intensa e precoce resposta imunológica. Como os linfócitos convencionais precisam de tempo para expandir o clone, diferenciar-se e migrar, a fim de realizar sua função celular, a resposta tem mais características de imunidade inata. Células TCD8+ podem, no entanto, quando ativadas, expressar receptores da imunidade inata⁵⁷.

Linfócitos T citotóxicos e as células NK, quando ativadas, expressam níveis elevados de CD44 (CD44 alta), mediando de forma eficiente lise celular após a ligação da CD44, que não é restrita à MHC e é TCR-independente. Um desarranjo entre os linfócitos citotóxicos ativados, expressando a CD44, e as células endoteliais que carregam o hialuronan, pode levar à lise endotelial e estar relacionada a uma variedade de doenças clínicas⁷⁰.

Observações em camundongos demonstraram que células TCD8 CD44 "altas" expressam receptores tanto da imunidade inata quanto da celular. Essas células T, diferentemente das de memória convencionais, proliferam e se tornam ativadas através da IL-2 e podem ter um papel único na monitorização de células do hospedeiro que se tenham infectado ou transformado⁵⁷.

As células T desenvolvidas fora do timo, em ratos, expressam receptores de células T específicos para auto-antígenos, proliferam em resposta à IL-2 e à IL-15, independentemente da estimulação antigênica, de maneira similar a células NK. Além disso, ambas as citocinas induzem a produção de interferon γ nessas células T⁷¹. O fato de essas observações terem sido feitas em animais não diminui a importância delas. No entanto, uma comprovação em humanos seria interessante.

A agressão da circulação extracorpórea pode levar à indução de uma resposta antigênica tão exacerbada que produza de imediato uma reação protetora e apoptose das células citotóxicas ativadas. Linfócitos citotóxicos e células NK,

através da ativação da CD44, ligam-se ao hialuronan imobilizado e também ativado no endotélio, provocando a citólise e o extravasamento de constituintes plasmáticos. Essas são hipóteses que ainda precisam ser provadas.

O presente trabalho é relevante porque demonstra um comportamento de células CD44 (+) no pós-CEC, compatível com estudos da SVC experimental. É também importante do ponto de vista clínico, pois os resultados mostram um estado grave de imunossupressão celular pós-CEC, o que pode aumentar, e muito, a incidência de infecções. Essa tese também demonstra, nas primeiras oito horas de UTI, que um importante processo imunológico celular está em curso, o que pode alterar desfavoravelmente o resultado.

É possível que a modulação negativa da resposta imunológica antes da iniciação do processo possa diminuir um pouco a síndrome do vazamento capilar. Uma vez encontrados os elementos responsáveis pelo mecanismo, o tratamento, utilizando supressores das moléculas envolvidas, pode impedir o estabelecimento da SVC, fenômeno desagradável para todos os envolvidos com as crianças.

O conhecimento dos mecanismos celulares e moleculares que determinam se um processo inflamatório vai se resolver ou vai progredir para a destruição tecidual pode levar ao desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais efetivas.



CONCLUSÕES

A análise dos dados do presente estudo nos permite concluir que:

- ❖ Durante as primeiras quatro horas do pós-operatório, acontece um processo imunológico intenso, com uma diminuição significativa na proporção de linfócitos TCD44+;
- ❖ Ocorre também uma diminuição significativa na proporção de células NK CD44+, no mesmo período de tempo;
- ❖ As demais células brancas, CD3- CD44+, sofrem um processo inverso, com aumento significativo na proporção, com pico na oitava hora do pós- operatório;
- ❖ As células TCD4+ apresentam uma diminuição duas vezes maior que as células TCD8+.



REFERÊNCIAS

1. Seghaye MC, Grabitz RG, Duchateau J, Busse S, Dabritz S, Koch D, et al. Inflammatory reaction and capillary leak syndrome related to cardiopulmonary bypass in neonates undergoing cardiac operations. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1996 Sep;112(3):687-97.
2. Stiller B, Sonntag J, Dahnert I, Alexi-Meskishvili V, Hetzer R, Fischer T, et al. Capillary leak syndrome in children who undergo cardiopulmonary bypass: clinical outcome in comparison with complement activation and C1 inhibitor. *Intensive Care Med.* 2001 Jan;27(1):193-200.
3. Rosenstein M, Ettinghausen SE, Rosenberg SA. Extravasation of intravascular fluid mediated by systemic administration of recombinant interleukin 2. *J Immunol.* 1986 Sep;137(5):1735-42.
4. Rafi-Janajreh AQ, Chen D, Schmits R, Mak TW, Grayson RL, Sponenberg DP, et al. Evidence for the involvement of CD44 in endothelial cell injury and induction of vascular leak syndrome by IL-2. *J Immunol.* 1999 Aug;163(3):1619-27.
5. Assaly R, Olson D, Hammersley J, Fan PS, Liu J, Shapiro JI, et al. Initial evidence of endothelial cell apoptosis as a mechanism of systemic capillary leak syndrome. *Chest.* 2001 Oct;120(4):1301-8.
6. Paparella D, Yau T M, Young E. Cardiopulmonary bypass induced inflammation: pathophysiology and treatment. An update. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2002 Feb; 21(2):232-44.
7. Brix-Christensen V. The systemic inflammatory response after cardiac surgery with cardiopulmonary bypass in children. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2001 Jul; 45(6):671-9.

8. Holmes JH, Connolly NC, Paull DL, Hill ME, Guyton SW, Ziegler SF, et al. Magnitude of the inflammatory response to cardiopulmonary bypass and its relation to adverse clinical outcomes. *Inflamm Res*. 2002 Dec; 51(12):579-86.
9. Kozik DJ, Tweddell JS. Characterizing the inflammatory response to cardiopulmonary bypass in children. *Ann Thorac Surg*. 2006 Jun; 81(6):S2347-54.
10. Abrahamov D, Erez E, Tamariz M, Dagan O, Pearl E, Abrahamov Y, et al. Plasma vascular endothelial growth factor level is a predictor of the severity of postoperative capillary leak syndrome in neonates undergoing cardiopulmonary bypass. *Pediatr Surg Int*. 2002 Jan;18(1):54-9.
11. Brudney CS, Gosling P, Manji M. Pulmonary and renal function following Cardiopulmonary Bypass is associated with systemic capillary leak. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2005 Apr;19(2):188-92.
12. Levy JH, Tanaka KA. Inflammatory response to cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg*. 2003 Feb;75(2):S715-20.
13. Abbott NJ. Inflammatory mediators and modulation of blood-brain barrier permeability. *Cell Mol Neurobiol*. 2000 Apr;20(2):131-47.
14. Mojcik CF, Levy JH. Aprotinin and the systemic inflammatory response after cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg*. 2001 Feb;71(2):745-54.
15. Edmunds LH Jr. Inflammatory response to cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg*. 1998 Nov; 66(5 Suppl):S12-6.
16. Boyle E, Pohlman TH, Johnson M, Verrier ED. Endothelial cell injury in cardiovascular surgery; the systemic inflammatory response. *Ann Thorac Surg*. 1997 Jan;63(1):277-84.
17. Tarnok A, Hamsch J, Schneider P. Cardiopulmonary bypass-induced increase interleukin-10 in children. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1998 Feb;115(2):475-7.

18. Franke A, Lante W, Fackeldey V, Becker HP, Thode C, Kuhlmann WD. et al . Pro-inflammatory cytokines after different kinds of cardio-thoracic surgical procedures: is what we see what we know? *Ann Thorac Surg.* 2002 Aug;74(2):363-70.
19. Schulze C, Conrad N, Schütz A, Egi K, Reichenspurner H, Reichart B, et al Reduced expression of systemic proinflammatory cytokines after off-pump versus conventional coronary artery bypass grafting. *Thorac Cardiovasc Surg.* 2000 Dec;48(6):364-9.
20. Carvalho MV, Maluf MA, Catani R, La Rotta CA, Gomes WJ, Salomao R, et al. Cytokines and pediatric open heart surgery with cardiopulmonary bypass. *Cardiol Young.* 2001 Jan;11(1):36-43.
21. Burns SA, Newburger JW, Xiao M, Mayer JE Jr, Walsh AZ, Neufeld EJ, et al. Induction of interleukin-8 messenger RNA in heart and skeletal muscle during pediatric cardiopulmonary bypass. *Circulation.* 1995 Nov;92(9 Suppl):II315-21.
22. Franke A, Lante W, Fackeldey V, Becker HP, Thode C, Kuhlmann WD, et al Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines after cardiac operation: different cellular sources a different times. *Ann Thorac Surg.* 2002 Aug;74(2):363-70.
23. Brasil LA, Gomes WJ, Salomão R, Buffolo E. Inflammatory response after myocardial revascularization with or without cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg.* 1998 Jul;66(1):56-9.
24. Bocsi J, Hamsch J, Osmancik P, Schneider P, Valet G, Tarnok A. Preoperative prediction of pediatric patients with effusions and edema following cardiopulmonary bypass surgery by serological and routine laboratory data. *Crit Care.* 2002 Jun;6(3):226-33.
25. Ilton MK, Langton PE, Taylor ML, Misso NL, Newman M, Thompson PJ, et al. Differential expression of neutrophil adhesion molecules during coronary artery

- surgery with cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1999 Nov;118(5):930-7.
26. Akbas H, Erdal A C, Demiralp E, Alp M . Effects of coronary artery bypass grafting on cellular immunity with or without cardiopulmonary bypass: changes in lymphocytes subsets. *Cardiovasc Surg.* 2002 Dec;10(6):586-9.
27. Franke A, Lante W, Kurig E, Zoller LG, Weinhold C, Markewitz A. 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? *Eur J Cardiothorac Surg.* 2006 Jul;30(1):64-71.
28. Aydin NB, Gercekoglu H, Aksu B, Ozkul V, Sener T, Kiygil I, et al. Endotoxemia in coronary artery bypass surgery: a comparison of the off-pump technique and conventional cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2003 Apr;125(4):843-8.
29. Ruel M, Bianchi C, Khan TA, Xu S, Liddicoat JR, Voisine P, et al. Gene expression profile after cardiopulmonary bypass and cardioplegia arrest. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2003 Nov;126(5):1521-30.
30. Shastri KA, Logue GL, Stern MP, Rehman S, Raza S. Complement activation by heparin-protamine complexes during cardiopulmonary bypass: effect of C4A Null allele. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1997 Sep;114(3):482-8.
31. Anselmi A, Abbate A, Girola F, Nasso G, Biondi-Zoccai GG, Possati G, et al. Myocardial ischemia, stunning inflammation, and apoptosis during cardiac surgery: a review of evidence. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2004 Mar;25(3):304-11.
32. Caldarone CA, Barner EW, Wang L, Karimi M, Mascio CE, Hammel JM, et al. Apoptosis-related mitochondrial dysfunction in early postoperative neonatal lamb heart. *Ann Thorac Surg.* 2004 Sep;78(3):948-55.

33. Aebert H, Kirchner S, Keyser A, Birnbaum DE, Holler E, Andreesen R, et al. Endothelial apoptosis is induced by serum of patients after cardiopulmonary bypass. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2000 Nov;18(5):589-93.
34. Underhill C. CD44: the hyaluronan receptor. *J Cell Sci*. 1992 Oct;103 (Pt 2):293-8.
35. Underhill C, Dorfman A. The role of hyaluronic acid in intercellular adhesions of culture mouse cell. *Exp Cell Res*. 1978 Nov;117(1):155-64.
36. Scott JE. Secondary structures in hyaluronan solutions: chemical and biological implications. *Ciba Found Symp*. 1989;143:6-15; discussion 15-20, 281-5.
37. Underhill C. The interaction of hyaluronate with the cell surface :the hyaluronate receptor and the core protein. *Ciba Found Symp*. 1989;143:87-99; discussion 100-6, 281-5.
38. Lesley J, Howes N, Perschl A, Hyman R. Hyaluronan binding function of CD44 is transiently activated on T cells during in vivo immune response. *J Exp Med*. 1994 Jul;180(1):383-7.
39. Nandi A, Estess P, Siegelman MH. Hyaluronan anchoring and regulation on the surface of vascular endothelial cells is mediated through the functionally active form of CD44. *J Biol Chem*. 2000 May 19; 275(20):14939-48.
40. Mohamadzadeh M, DeGrendele H, Arizpe H, Estess P, Siegelman M. Proinflammatory stimuli regulate endothelial hyaluron expression and Cd44/HÁ dependent primary adhesion. *J Clin Invest*. 1998 Jan 1;101(1):97-108.
41. Gee K, Kozlowski M, Kumar A. Hyaluronan-adhesive CD44 by activating sialidase through p38 mitogen-activated protein kinase in lipopolysaccharide-stimulated human monocytic cells. *J Biol Chem*. 2003 Sep 26;278(39):37275-87 .
42. Bonder CS, Clark SR, Norman MU, Johnson P, Kubes P. Use of CD44 by CD4+ Th1 and Th2 lymphocytes to roll and adhere. *Blood*. 2006 Jun;107(12):4798-806.

43. Masayuki M, editor. Tumor-metastasis related adhesion molecule CD44: its structure and function. [Thesis on the Internet], Japan; Department of Bioregulation, Osaka University Medical School, 2-2, Yamada-oka, Suita, 1998 [cited 2007 Oct 21]. Available from: <http://pharm.ushizuoka-ken.ac.jp/~forum98..>
44. Rouschop KM, Roelofs JJ, Claessen N, da Costa Martins P, Zwaginga JJ, Pals ST, et al. Protection against renal ischemia reperfusion injury by CD44 disruption. *J Am Soc Nephrol.* 2005 Jul;16(7):2034-43.
45. Sague SL, Tato C, Puré E, Hunter CA. The regulation and activation of cd44 by natural killer (NK) cells and its role in the production of IFN- γ . *J Interferon Cytokine Res.* 2004 May;24(5):301-9.
46. Ross ME, Caligiuri MA. Cytokine-Induced apoptosis of human natural killer cells identifies a novel mechanism to regulate the innate immune response. *Blood.* 1997 Feb;89(3):910-8.
47. Noble PW, McKee CM, Cowman M, Shin HS. Hyaluronan fragments activate an NF- κ B/I- κ B α autoregulatory loop in murine macrophages. *J Exp Med.* 1996 May;183(5):2373-8.
48. Mustafa A, editor. CD44-Hyaluronic acid interactions in IL-2 induced vascular leak syndrome. [Thesis on the Internet], Blacksburg; Department of biology, Virginia Polytechnic Institute and State University; 2001 [cited 2007 Oct 21] Available from: <http://www.scholar.lib.vt.edu/theses /available/etd-06302001-016181/>
49. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M editores. Imunidade mediada por células T .In: *Imunobiologia, O sistema imune na saúde e na doença.* 5ª ed. Porto Alegre; Artmed; 2001. p.337-42.

50. D'Souza W, Lefrançois L. Frontline: An in- depth evaluation of the production of IL-2 by antigen specific CD8T cells in vivo. *Eur J Immunol.* 2004 Nov; 34(11):2977-85.
51. Spierings DC, Lemmens EE, Grewal K, Schoenberger SP, Green DR. Duration of CTL activation regulates IL-2 production required for autonomous clonal expansion. *Eur J Immunol.* 2006 Jul;36(7):1707-17.
52. Krammer PH, CD95's deadly mission in the immune system. *Nature.* 2000 Oct 12;407(6805):789-95.
53. Refaeli Y, Van Parijs L, London CA, Tschopp J, Abbas AK. Biochemical mechanisms of IL-2-regulated Fas-mediated T cell apoptosis. *Immunity.* 1998 May;8(5):615-23.
54. McKallip RJ, Do Y, Fisher MT, Robertson JL, Nagarkatti PS, Nagarkatti M. Role of CD44 in activation-induced cell death: CD44-deficient mice exhibit enhanced T cell response to conventional and superantigens. *Int Immunol.* 2002 Sep;14(9):1015-26.
55. Bielawska-Pohl A, Crola C, Caignard A, Gaudin C, Dus D, Kieda C, et al. Human NK cells lyse organ-specific endothelial cells: analysis of adhesion and cytotoxic mechanisms. *J Immunol.* 2005 May;174(9):5573-82.
56. Lieberman J. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol.* 2003 May;3(5):361-70.
57. Dhanji S, Teh HS. IL-2-activated CD8+CD44high cells express both adaptive and innate immune system receptors and demonstrate specificity for syngeneic tumor cells. *J Immunol.* 2003 Oct; 171(7):3442-50.
58. Rathmell JC, Thompson CB. Pathways of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis and disease. *Cell.* 2002 Apr;109 Suppl:S97-107.

59. Damle NK, Doyle LV, Bender JR, Bradley EC. Interleukin 2-activated human lymphocytes exhibit enhanced adhesion to normal vascular endothelial cells and cause their lyses. *J Immunol.* 1987 Jun; 138(6):1779-85.
60. Fujita S, Puri RK, Yu ZX, Travis WD, Ferrans VJ. An ultrastructural study of in vivo interactions between lymphocytes and endothelial cells in the pathogenesis of the vascular leak syndrome induced by interleukin-2. *Cancer.* 1991 Nov; 68(10):2169-74.
61. Assier E, Jullien V, Lefort J, Moreau JL, Di Santo JP, Vargaftig BB, et al. NK cells and polymorphonuclear neutrophils are both critical for IL-2-induced pulmonary vascular leak syndrome. *J Immunol.* 2004 Jun;172(12):7661-8.
62. Sconocchia G, Titus JA, Segal DS. CD44 is a cytotoxic triggering molecule in human peripheral blood NK cells. *J Immunol.* 1994;153:5473-81.
63. McKallip RJ, Fisher M, Do Y, Szakal AK, Gunthert U, Nagarkatti PS, et al. Targeted deletion of CD44v7 exon leads to decreased endothelial cell injury but not tumor cell killing mediated by interleukin-2-activated cytolytic lymphocytes. *J Biol Chem.* 2003 Oct;278(44):43818-30.
64. Ankersmit HJ, Tugulea S, Spanier T, Weinberg AD, Artrip JH, Burke EM, et al. Activation-induced T-cell death and immune dysfunction after implantation of left-ventricular assist device. *Lancet.* 1999 Aug;354(9178):550-5.
65. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Schmiege RE Jr, Hui JJ, Chang KC, et al. Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. *J Immunol.* 2001 Jun;166(11):6952-63.
66. Tárnock A, Schneider P. Induction of transient immune suppression and Th1/Th2 disbalance by pediatric cardiac surgery with cardiopulmonary bypass. *Clinical Applied Immunol Rev.* 2001 May ;1 (5) :291-313.

67. Rafi AQ, Zeytun A, Bradley MJ, Sponenberg DP, Grayson RL, Nagarkatti M, et al. Evidence for the involvement of Fas Ligand and Perforin in the induction of Vascular Leak Syndrome. *J Immunol.* 1998 Sep 15;161(6):3077-86.
68. Cicardi M, Berti E, Caputo V, Radice F, Gardinali M, Agostoni A. Idiopathic capillary leak syndrome: evidence of CD-8 positive lymphocytes surrounding damaged endothelial cells. *J Allergy Clin Immunol.* 1997 Mar;99(3):417-9.
69. DeGrendele HC, Kosfischer M, Estess P, Siegelman MH. CD44 Activation and associated primary adhesion is inducible via T cell receptor stimulation. *J Immunol.* 1997 Sep 15; 159(6):2549-53.
70. Rafi-Janajreh AQ, Nagarkatti PS, Nagarkatti M. Role of CD44 in CTL and NK cell activity. *Front Biosci.* 1998 Jul 1;3:d665-71.
71. Yamada H, Nakamura T, Matsuzaki G, Iwamoto Y, Nomoto K. TCR-Independent activation of extrathymically developed, self antigen-specific T cells by IL-2/IL-15. *J Immunol.* 2000 Feb 15;164(4):1746-52.



ANEXOS

ANEXO 1

BANCO DE DADOS Nº 1 DOS PROCEDIMENTOS IMUNOLÓGICOS

PACIENTE										
CD3+	LINFÓCITOS QUE NÃO EXPRESSAM CD44									
CD3+ CD44+	LINFÓCITOS QUE EXPRESSAM CD44									
CD3- CD44-	CÉLULAS QUE NÃO EXPRESSAM CD44 E NÃO SÃO LINFÓCITOS									
CD44+ CD3-	TODAS AS CÉLULAS QUE NÃO SÃO LINFÓCITOS E EXPRESSAM CD44 (CD 44 PODE ESTAR PRESENTE EM TODOS OS LEUCÓCITOS)									
PACIENTE 1 A C V										
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
CD3+	0,5	0,1	0,1	0	0,1	0,1	0,1	0,1		
CD3+ CD44+	16,2	14,6	7,7	5,5	12,4	18,4	12,4	18,4		
CD3- CD44-	18,5	11,3	14,2	17,2	17,5	16,5	17,5	16,5		
CD44+	65,3	74	78,3	77,3	69,0	64,8	69,0	64,8		

PACIENTE 2 A M S										
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
CD3+	0,1	0,1	0	0	0	0				
CD3+ CD44+	15,5	10,6	4,7	5,9	7,9	13,9				
CD3- CD44-	62,4	63,6	67,6	54,7	40,7	33,4				
CD44+	22,0	25,7	27,7	39,5	51,3	52,7				

PACIENTE 3 E S B										
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
CD3+	0	0,1	0	0	0,1	0				
CD3+ CD44+	8,4	7,2	5,3	4,2	7,1	2,9				
CD3- CD44-	83,2	84,5	81,0	78,1	64,6	80,4				
CD44+	8,4	8,2	13,7	17,8	28,3	16,7				

PACIENTE 4 G L S										
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
CD3+	0,1	0,1	0	0,1	0	0	0	0	0	0,2
CD3+ CD44+	19,4	18,6	9,6	7,1	8,0	8,2	7,7	6,7	13,8	16,7
CD3- CD44-	45,1	27,9	28,3	23,5	26,1	29,3	31,6	29,3	30,0	31,5
CD44+	35,4	53,3	62,1	69,4	65,9	62,4	60,7	64,0	56,2	51,7

PACIENTE 5 J F N S										
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
CD3+	0,1	0,2								
CD3+ CD44+	20,3	29,5	ÓBITO							
CD3- CD44-	28,5	14,8								
CD44+	51,1	55,5								

PACIENTE 6 R A										
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
CD3+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
CD3+ CD44+	4,8	2,0	1,3	1,4	2,3	2,1	2,5	0,4	3,2	
CD3- CD44-	21,9	21,0	16,7	17,6	15,7	19,1	18	15,3	19,9	
CD44+	73,3	77,0	82,1	80,9	82,0	78,8	79,5	84,3	76,9	

PACIENTE 7 M C G P										
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
CD3+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CD3+ CD44+	5,3	1,1	0,8	2,0	0,7	0,8	1,2	1,0	0,9	1,0
CD3- CD44-	39,5	53,4	42,3	28,2	44,8	49,6	28,7	41,0	31,4	24,4
CD44+	55,3	45,5	56,9	69,9	54,5	49,6	70,0	57,3	67,6	74,6

PACIENTE 8 S L B											
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11
CD3+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CD3+ CD44+	2,5	8,8	6,2	6,2	7,6	15,4	10,2	14,5	20,6	20,5	7,2
CD3- CD44-	15,3	7,6	11,9	13,2	10,9	9,9	18,2	10,9	8,8	8,4	11,8
CD44+	82,2	83,6	81,9	80,6	81,5	74,8	71,7	74,7	70,6	71,1	81,0

PACIENTE 9 A F P S										
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
CD3+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
CD3+ CD44+	9,6	16,1	10,7	10	15,4	19,1	10,1	13,6	13,2	
CD3- CD44-	10,3	3,2	5,6	5,0	5,0	3,6	5,1	5,5	6,8	
CD44+	80,1	80,7	83,6	85,0	79,6	77,2	84,8	80,9	80,0	

PACIENTE 10 A P N O										
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
CD3+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CD3+ CD44+	16,2	10,9	5,8	6,2	6,8	7,3	10,1	7,9	5,9	4,7
CD3- CD44-	15,7	8,0	10,3	9,3	9,6	13,2	9,7	13,5	13,1	15,1
CD44+	68,1	81,1	83,9	84,5	83,7	79,5	80,2	78,6	80,9	80,1

PACIENTE 11 G C A										
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
CD3+	0,2	0	0	0	0	0	0	0	0,1	0,1
CD3+ CD44+	25	16,4	4,5	6,2	3,0	3,5	2,2	1,7	3,0	2,5
CD3- CD44-	10,5	8,6	10,7	4,7	6,0	5,1	5,6	29,3	15,2	12,7
CD44+	64,3	75,0	84,7	89,1	90,8	91,4	92,2	68,9	81,7	84,7

PACIENTE 12 D H A										
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
CD3+	0,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CD3+ CD44+	15,6	6,1	12,5	13	16,3	12,9	9,2	6,8	8,4	3,9
CD3- CD44-	43,5	19,8	10,1	15,1	18,1	14,3	8,1	9,1	5,2	4,9
CD44+	40,7	74,1	77,4	71,9	65,6	72,8	82,7	84,1	86,4	91,3

PACIENTE 13 E A S										
	T1	T2	T3*	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
CD3+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CD3+ CD44+	14,4	9,9	2,1	2,1	2,7	3,1	3,7	4,6	3,6	3,1
CD3- CD44-	27,6	12,2	22,5	9,3	6,6	5,4	8,2	6,3	3,7	4,0
CD44+	57,9	77,9	75,4	88,6	90,7	91,6	88,1	89,1	92,7	92,9

PACIENTE 14 B G N										
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
CD3+	0,1	0	0	0	0	0	0	0		
CD3+ CD44+	23,2	10,8	1,8	2,6	3,3	3,3	4,5	4,9		
CD3- CD44-	19,7	8,4	8,0	3,7	7,2	3,5	3,2	2,3		
CD44+	57	80,8	90,1	93,7	89,6	93,3	92,2	92,8		

PACIENTE 15 M G M F										
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
CD3+	0	0	ÓBITO							
CD3+ CD44+	19,6	12,4								
CD3- CD44-	35,2	17,1								
CD44+	45,1	70,5								

PACIENTE 16 G F										
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
CD3+	0	0	0	0	0	0	0,1			
CD3+ CD44+	26,3	7,6	5,1	5,2	4,9	6,1	8,5	ÓBITO		
CD3- CD44-	18,4	15,7	10,5	7,5	6,7	5,7	8,3			
CD44+	55,3	76,7	84,4	87,2	88,4	88,2	83,1			

PACIENTE 17 J V M										
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
CD3+	0,2	0,1	0,1	0,1						
CD3+ CD44+	16,6	8,9	3,6	1,8	ÓBITO					
CD3- CD44-	56,8	17,2	12,6	12,9						
CD44+	26,5	73,8	83,7	85,2						

BANCO DE DADOS N° 2 DOS PROCEDIMENTOS IMUNOLÓGICOS

PACIENTE 1										
CD3+	LINFÓCITOS QUE NÃO EXPRESSAM CD8 (LINFÓCITOS CD4+, NA MAIORIA LINFÓCITOS AUXILIARES)									
CD3+ CD8+	LINFÓCITOS CD8 (LINFÓCITOS T CITOTÓXICOS)									
CD3- CD8-	OUTROS LEUCÓCITOS									
CD8+	OUTRAS CELULAS NÃO CONSIDERAR									
PACIENTE 1 A C V										
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
CD3+	8,9	9,2	1,6	2,0	1,8	1,9	2,2	2,9		
CD3+ CD8+	2,0	3,2	0,7	1,0	1,0	0,7	1,1	1,1		
CD3- CD8-	88,8	86,8	97,4	96,6	96,8	97,2	96,5	95,7		
CD8+	0,3	0,9	0,2	0,4	0,4	0,2	0,3	0,4		
PACIENTE 2 A M S										
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
CD3+	4,8	3,0	1,3	1,4	1,8	1,3				
CD3+ CD8+	5,1	5,9	1,6	2,2	1,7	2,1				
CD3- CD8-	89,6	90,3	96,9	96,2	96,4	96,4				
CD8+	0,5	0,7	0,2	0,2	0,1	0,1				
PACIENTE 3 E S B										
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
CD3+	3,9	3,7	2,9	0,9	2,0	1,1				
CD3+ CD8+	1,3	1,6	1,0	0,5	1,0	0,7				
CD3- CD8-	94,5	94,5	96,0	98,5	96,8	98				
CD8+	0,4	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2				
PACIENTE 4 G L S										
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
CD3+	9,9	8,1	3,7	3,1	3,2	3,3	2,8	3,3	2,5	4,6
CD3+ CD8+	3,5	4,1	2,2	1,7	1,7	3,2	1,4	1,6	1,0	1,9
CD3- CD8-	85,3	86,4	92,8	94,7	94,6	92,5	95,5	94,8	96,3	93,3
CD8+	1,1	1,4	1,2	0,5	0,5	1,0	0,4	0,3	0,2	0,2
PACIENTE 5 J F N S										
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
CD3+	6,2	8,2	ÓBITO							
CD3+ CD8+	15,8	23,7								
CD3- CD8-	74,4	66,9								
CD8+	3,7	1,1								
PACIENTE 6 R A										
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
CD3+	5,5	2,5	1,1	1,4	2,8	1,8	2,9	2,4	2,1	
CD3+ CD8+	1,0	0,7	0,4	0,4	1,0	0,7	0,8	0,6	0,6	
CD3- CD8-	91,8	95,3	97,8	97,5	95,4	95,9	94,7	96,6	97,1	
CD8+	1,7	1,5	0,7	0,7	0,9	1,7	1,6	0,4	0,2	

PACIENTE 7 M C G P										
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
CD3+	10,7	5,1	6,7	9,0	3,7	4,8	4,2	3,6	0,4	2,8
CD3+ CD8+	5,1	1,8	2,9	4,5	2,0	2,5	2,3	2,0	0,2	1,6
CD3- CD8-	83,0	92,6	89,6	85,1	94,1	92,4	93,3	94,2	99,3	95,4
CD8+	1,2	0,5	0,8	1,4	0,2	0,3	0,3	0	0	0,1

PACIENTE 8 S L B											
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11
CD3+	2,7	3,7	3,5	3,8	3,9	6,1	7,3	8,2	8,6	7,7	5,5
CD3+ CD8+	0,6	0,9	0,9	1,0	1,1	1,7	2,1	2,3	2,2	1,9	1,0
CD3- CD8-	96,7	95,7	95,5	95,2	95,0	92	90,4	89,3	89	90,2	93,8
CD8+	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1

PACIENTE 9 A F P S										
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
CD3+	9,2	13,3	6,1	5,0	7,9	11,6	7,0	7,6	7,6	
CD3+ CD8+	2,4	4,0	2,3	2,2	2,8	3,6	2,2	3,0	2,7	
CD3- CD8-	88,2	82,6	91,6	92,8	89,2	84,7	90,7	89,3	89,7	
CD8+	0,1	0,1	0,1	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	

PACIENTE 10 A P N O										
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
CD3+	20,8	10,4	4,7	5,4	5,2	5,2	7,0	4,2	3,7	3,1
CD3+ CD8+	2,8	2,0	1,0	1,0	0,8	0,8	1,3	0,6	0,6	0,5
CD3- CD8-	75,9	87,4	94,2	93,5	93,9	93,9	91,6	95,1	95,7	96,4
CD8+	0,5	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0

PACIENTE 11 G C A										
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
CD3+	35,8	19,9	4,8	3,7	1,9	1,2	1,7	2,8	2,2	1,9
CD3+ CD8+	9,4	6,4	2,4	2,4	1,4	0,7	1,0	1,3	1,4	1,4
CD3- CD8-	54,5	73,6	92,7	93,9	96,7	98,1	97,2	95,7	96,3	96,6
CD8+	0,3	0,2	0,1	0,1	0,1	0	0,1	0,2	0,1	0,1

PACIENTE 12 D H A										
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
CD3+	20,2	5,2	6	8,2	8,9	6,3	4,1	1,8	3,3	0,9
CD3+ CD8+	7,7	3,0	5,9	8,0	7,7	4,6	2,6	1,2	2,2	0,5
CD3- CD8-	71,6	91,5	87,8	82,9	83,0	88,7	93	96,9	94,3	98,5
CD8+	0,5	0,3	0,3	0,8	0,4	0,4	0,3	0,1	0,2	0,1

PACIENTE 13 E A S										
	T1	T2	T3*	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
CD3+	15,2	8,0		1,8	1,4	1,4	1,5	1,3	0,8	0,9
CD3+ CD8+	3,0	2,0		0,6	0,4	0,4	0,5	0,3	0,3	0,4
CD3- CD8-	81,0	89,2		97,6	98,1	98,1	97,9	98,2	98,7	98,6
CD8+	0,7	0,8		0,1	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2

* COAGULADO

PACIENTE 14 B G N										
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
CD3+	12,3	5,3	0,8	1	1,2	1,4	2,1	3,4		
CD3+ CD8+	3,0	2,2	0,3	0,4	0,6	0,4	0,6	1,0		
CD3- CD8-	84,1	91,5	98,6	98,5	98,1	98,1	97,2	95,4		
CD8+	0,7	1	0,3	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2		

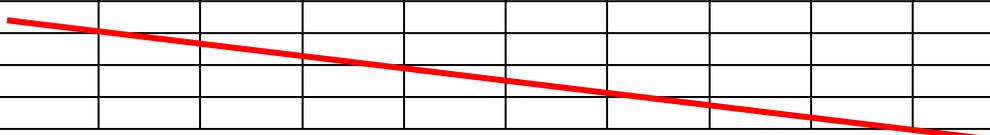
PACIENTE 15 M G M F										
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
CD3+	20,6	8,3	ÓBITO							
CD3+ CD8+	9,2	4,4								
CD3- CD8-	69,5	85,4								
CD8+	0,7	1,8								

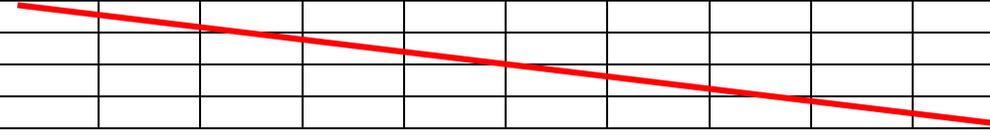
PACIENTE 16 G F										
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
CD3+	19,8	5,0	2,0	2,0	2,0	2,6	5,3			
CD3+ CD8+	5,2	2,4	1,2	1,4	1,3	1,8	3,1	ÓBITO		
CD3- CD8-	72,9	90,0	96,3	95,5	96,3	95,2	90,9			
CD8+	2,1	2,6	0,6	0,5	0,5	0,4	0,7			

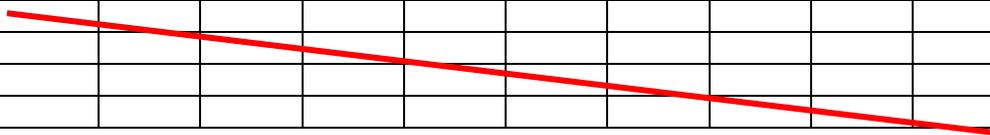
PACIENTE 17 J V M										
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
CD3+	25,4	9,6	3,1	1,5						
CD3+ CD8+	8,6	5,8	2,5	1,1	ÓBITO					
CD3- CD8-	64,5	81,8	93,4	97,1						
CD8+	1,5	2,8	0,9	0,3						

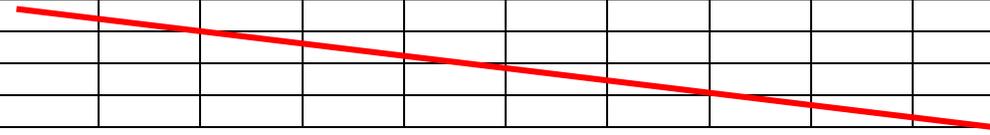
BANCO DE DADOS N° 3 DOS PROCEDIMENTOS IMUNOLÓGICOS

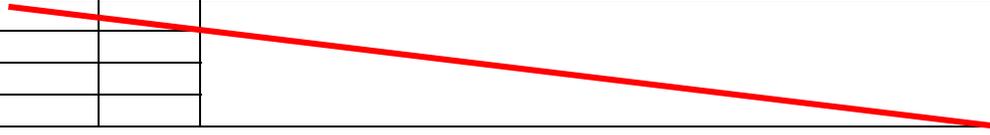
PACIENTE 1										
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
CD56+	CÉLULAS NK									
CD56+CD44+	CÉLULAS NK QUE EXPRESSAM CD44									
CD56-CD44-	OUTROS LEUCÓCITOS QUE NÃO EXPRESSAM CD44									
CD44+	LEUCÓCITOS QUE EXPRESSAM CD44									

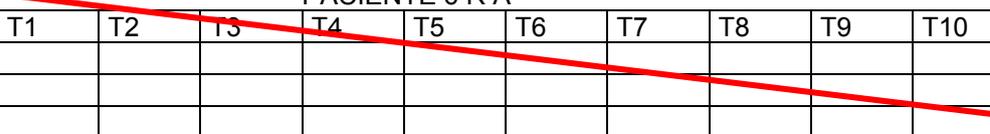
PACIENTE 1 A C V										
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
CD56+										
CD56+CD44+										
CD56-CD44-										
CD44+										

PACIENTE 2 A M S										
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
CD56+										
CD56+CD44+										
CD56-CD44-										
CD44+										

PACIENTE 3 E S B										
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
CD56+										
CD56+CD44+										
CD56-CD44-										
CD44+										

PACIENTE 4 G L S										
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
CD56+										
CD56+CD44+										
CD56-CD44-										
CD44+										

PACIENTE 5 J F N S										
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
CD56+										
CD56+CD44+										
CD56-CD44-										
CD44+										

PACIENTE 6 R A										
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
CD56+										
CD56+CD44+										
CD56-CD44-										
CD44+										

PACIENTE 7 M C G P										
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
CD56+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
CD56+CD44+	0,8	0,4	0,4	0,5	0,3	0,4	0,8	0,1	0,2	
CD56-CD44-	61,8	51,3	43,8	46,2	47,8	39,6	30,9	59,1	31,7	
CD44+	37,4	48,2	55,8	53,3	51,9	60	68,3	40,8	68,0	

PACIENTE 8 S L B											
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11
CD56+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CD56+CD44+	0,4	0,4	0,2	0,1	0,4	0,9	0,8	0,7	1,1	3,1	0,5
CD56-CD44-	14,4	10,1	12,2	13,9	9,6	10,9	7,7	9,2	10,6	10,8	9,1
CD44+	85,1	89,6	87,6	85,9	90	88,3	91,5	90,1	88,3	86,2	90,3

PACIENTE 9 A F P S										
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
CD56+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
CD56+CD44+	0,9	0,6	0,4	0,3	1,0	1,0	0,2	0,3	0,3	
CD56-CD44-	8,0	2,6	3,8	3,5	4,8	2,1	5,4	4,9	6,9	
CD44+	91,1	96,7	95,7	96,2	94,2	96,9	94,4	94,8	92,7	

PACIENTE 10 A P N O										
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
CD56+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CD56+CD44+	0,3	0,3	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1
CD56-CD44-	19,1	8,5	10,0	9,1	9,7	12,8	10,5	21,4	8,8	8,6
CD44+	80,5	91,1	89,8	90,8	90,2	87,1	89,4	78,5	91	91,3

PACIENTE 11 G C A										
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
CD56+	0	0	0	0	0	0	0	0,4	0,7	0,6
CD56+CD44+	0,3	0,4	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,9	1,7	1,1
CD56-CD44-	13,1	9,7	12	4,5	5,4	4,9	10,3	7,7	3,4	4,6
CD44+	86,5	89,9	87,9	95,2	94,4	95	89,6	91	94,9	93,7

PACIENTE 12 D H A										
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
CD56+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CD56+CD44+	0,4	0,3	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
CD56-CD44-	55,6	24,9	21,9	24,7	21,5	20,2	22,6	6,4	8,7	8,4
CD44+	43,9	74,7	77,9	75,2	78,4	79,7	77,3	93,5	91,2	91,4

PACIENTE 13 E A S										
	T1	T2	T3*	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
CD56+	0,2	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0
CD56+CD44+	0,5	0,3	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2
CD56-CD44-	52,5	25,8	73,3	19,3	14	10,9	12,6	11,0	10,1	13,6
CD44+	46,9	73,8	26,5	80,5	85,9	88,9	87,3	88,8	89,8	86,2

PACIENTE 14 B G N										
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
CD56+	0,1	0,1	0	0	0	0	0	0		
CD56+CD44+	0,4	0,3	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1		
CD56-CD44-	26,4	14,1	9,2	5,7	6,6	4,2	3,9	3,3		
CD44+	73	85,5	90,7	94,2	93,3	95,8	95,9	96,6		

PACIENTE 15 M G M F										
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
CD56+	0	0	ÓBITO							
CD56+CD44+	0,1	0,2								
CD56-CD44-	46,4	25,4								
CD44+	53,5	74,3								

PACIENTE 16 G F										
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
CD56+	0,1	0	0	0	0	0	0			
CD56+CD44+	0,3	0,1	0,1	0,1	0,1	0	0,1	ÓBITO		
CD56-CD44-	26,2	18,1	14,9	11,1	7,3	10,8	12,8			
CD44+	73,4	81,8	85,0	88,7	92,6	89,2	87,1			

PACIENTE 17 J V M										
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
CD56+	0,1	0,1	0	0,1						
CD56+CD44+	0,3	0,2	0,3	0,2	ÓBITO					
CD56-CD44-	33,0	72,4	15,2	17,1						
CD44+	66,6	27,2	84,4	82,7						

ANEXO 2



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. N.º 123/2007 - CEP/CCS

Recife, 30 de maio de 2007

Registro do SISNEP FR – 102595

CAAE – 0190.0.172.172-06

Registro CEP/CCS/UFPE Nº 183/06

Título: “Expressão de CD44 em linfócitos e células NK no sangue total de neonatos submetidos a cirurgia cardíaca com circulação extracorpórea”

Pesquisador Responsável: Sheila Maria Vieira Hazin

Senhora Pesquisadora:

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE) registrou e analisou, de acordo com a Resolução N.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, o protocolo de pesquisa em epígrafe, aprovando-o e liberando-o para início da coleta de dados em 29 de maio de 2007.

Ressaltamos que o pesquisador responsável deverá apresentar relatório ao final da pesquisa.

Atenciosamente



Prof. Geraldo Bosco Lindoso Couto
Coordenador do CEP/CCS/UFPE

A
Doutoranda Sheila Maria Vieira Hazin
Programa de Pós-Graduação em Cirurgia – CCS/UFPE



ANEXO 3

PROTOCOLO DE PESQUISA

“EXPRESSÃO DA CD44 EM CÉLULAS BRANCAS DO SANGUE TOTAL DE NEONATOS E LACTENTES SUBMETIDOS À CIRURGIA CARDÍACA COM CIRCULAÇÃO EXTRACORPÓREA”

1.IDENTIFICAÇÃO

PROTOCOLO N°

NOME

REGISTRO HOSPITALAR

SEXO

PESO

IDADE

2.DIAGNÓSTICO

3.CIRURGIA

TEMPO DE CEC

TEMPO DE ISQUEMIA MIOCÁRDICA

4.DADOS CLÍNICOS DA UTI

À ADMISSÃO:

VENTILAÇÃO MECÂNICA (SIM) (NÃO)

DROGAS VASOATIVAS (SIM) (NÃO)

DIURESE (Anúria) (1<ml/Kg) (>1ml/Kg)

GASOMETRIA ARTERIAL

EDEMA

1-não apresentou edema

2-edema de pequeno a moderado (edema bipalpebral)

3-edema generalizado

6h PO

VENTILAÇÃO MECÂNICA (SIM) (NÃO)

DROGAS VASOATIVAS (SIM) (NÃO)

DIURESE (Anúria) (1<ml/Kg) (>1ml/Kg)

GASOMETRIA ARTERIAL

EDEMA

1-não apresentou edema

2-edema de pequeno a moderado (edema bipalpebral)

3-edema generalizado

12h PO

VENTILAÇÃO MECÂNICA (SIM) (NÃO)

DROGAS VASOATIVAS (SIM) (NÃO)

DIURESE (Anúria) (1<ml/Kg) (>1ml/Kg)

GASOMETRIA ARTERIAL

EDEMA

1-não apresentou edema

2-edema de pequeno a moderado (edema bipalpebral)

3-edema generalizado

24h PO

VENTILAÇÃO MECÂNICA (SIM) (NÃO)

DROGAS VASOATIVAS (SIM) (NÃO)

DIURESE (Anúria) (1<ml/Kg) (>1ml/Kg)

GASOMETRIA ARTERIAL

EDEMA

1-não apresentou edema

2-edema de pequeno a moderado (edema bipalpebral)

3-edema generalizado

ANEXO 4

TERMO DE CONSENTIMENTO ESCLARECIDO

Título da pesquisa: Expressão de CD44 em linfócitos e células NK(matadoras naturais) no sangue total de neonatos e lactentes submetidos a cirurgia cardíaca com circulação extra corpórea.

Pesquisador Responsável- Sheila Maria Vieira Hazin

Justificativa,Objetivos e procedimentos da Pesquisa:

Através de um exame laboratorial utilizando uma quantidade mínima de sangue vamos verificar se existe ativação de uma molécula chamada CD44 no sangue de neonatos e lactentes submetidos a correção cirúrgica intra cardíaca . Se essa ativação ficar provada será muito mais fácil inibir o processo inflamatório que acontece nessas crianças após a cirurgia e dessa forma diminuir de significativamente a mortalidade nesses casos.

Desconforto e possíveis riscos associados a pesquisa:

O método utilizado , citometria, utilizará 0. 5ml de sangue do paciente a ser colhido através de cateter previamente introduzido para a cirurgia num total de dez coletas. A quantidade de sangue por ser muito pequena não produz alterações no paciente e sua coleta através do cateter é indolor. Não há aumento de risco pois a coleta de sangue já se faz de rotina por razões médicas e somente 0.5ml desse sangue por vez será encaminhado para pesquisa.

Benefícios da pesquisa:

Durante a cirurgia intra cardíaca a circulação do sangue se faz através de uma máquina por isso se chama circulação extra corpórea ou fora do corpo Se a ativação da CD44 na circulação extra corpórea for estabelecida,a síndrome do vazamento capilar (perda de líquidos para os tecidos) da circulação extra corpórea poderá vir a ser minimizada diminuindo em muito tanto a mortalidade quanto a morbidade

Métodos alternativos existentes:

É o meio mais simples e com menor morbidade para o paciente.

Forma de acompanhamento e assistência:

Quando necessária a família do paciente poderá obter esclarecimentos sobre os procedimentos utilizados ou assistência referentes aos procedimentos da pesquisa. A pesquisadora Dra . Sheila Maria Hazin pode ser encontrada pelo seu telefone de trabalho no NCT (Núcleo de cirurgia cardíaca e torácica) (81)34231350 ou pessoal(81) 99742150,e também no endereço Hospital português Av. Portugal n 163,Recife PE.

Esclarecimentos e Direitos

Em qualquer momento o voluntário(responsável) poderá obter esclarecimentos sobre todos os procedimentos utilizados na pesquisa e nas formas de divulgação dos resultados. Tem também a liberdade e o direito de recusar a participação ou retirar o consentimento em



qualquer fase da pesquisa, sem prejuízo no atendimento usual fornecido pelos pesquisadores.

Confidencialidade e avaliação dos registros

As identidades dos participantes serão mantidas em total sigilo por tempo indeterminado, tanto pelo executor como pela instituição onde será realizada. Os resultados dos procedimentos executados na pesquisa serão analisados e alocados em tabelas, figuras ou gráficos e divulgados em palestras, conferência, periódicos científicos ou outra forma de divulgação que propicie o repasse dos conhecimentos para a sociedade e para as autoridades normativas em saúde nacionais ou internacionais, de acordo com as normas/leis legais regulatórias de proteção nacional e internacional.

Consentimento Pós informação

Eu, _____, portador da carteira de identidade nº _____ expedida pelo órgão _____, por me considerar devidamente informado e esclarecido sobre o conteúdo deste termo de pesquisa a ser desenvolvida, livremente expresse o meu consentimento para inclusão do meu filho(a). Fui informado que meu número de registro da pesquisa é _____ e recebi cópia desse documento por mim assinado.

Assinatura do Responsável _____

Assinatura do responsável pelo estudo _____

Testemunha _____

Testemunha _____

Data

ANEXO 5

Normatização

Esta tese está de acordo com:

International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Sample References *Updated February 2006*

Last reviewed: 22 May 2007

Last updated: 25 April 2007

First published: 09 July 2003

Metadata | Permanence level: Permanent: Dynamic Content

Copyright, Privacy, Accessibility

U.S. National Library of Medicine, 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD
20894

National Institutes of Health, Health & Human Services

www.icmje.org/

www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html