CHIARA SCAGLIONI TESSMER GATTO

**Análise da adesão das células sanguíneas no filtro arterial por
microscopia eletrônica de varredura e reação em cadeia da
polimerase em tempo real em pacientes submetidos a cirurgia
cardíaca: estudo clínico observacional**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade
de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Anestesiologia

Orientadora: Profa. Dra. Filomena Regina Barbosa Gomes
Galas

São Paulo

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Gatto, Chiara Scaglioni Tessmer
Análise da adesão das células sanguíneas no
filtro arterial por microscopia eletrônica de
varredura e reação em cadeia da polimerase em tempo
real em pacientes submetidos a cirurgia cardíaca :
estudo clínico observacional / Chiara Scaglioni
Tessmer Gatto. -- São Paulo, 2020.
Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Anestesiologia.
Orientadora: Filomena Regina Barbosa Gomes Galas.

Descritores: 1.Circulação extracorpórea 2.Cirurgia
torácica 3.Microscopia eletrônica de varredura
4.Expressão gênica 5.Coagulação sanguínea

USP/FM/DBD-040/20

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

A Deus, pelo dom da vida e por sempre olhar por mim.

Aos meus pais Ervino e Laura, que não mediram esforços para transformar os meus sonhos em realidade. Por terem sido exemplos sólidos de amor e de trabalho.

Ao meu irmão Mateus, pelas melhores memórias e pela certeza de que nunca estarei sozinha.

Ao meu marido Bruno, meu amor genuíno. Pela família que formamos, pela amizade e pela proteção. Por acreditar em mim sempre, mesmo em dias que tive dúvidas.

À minha filha Alice, luz da minha vida, minha fonte de inspiração diária, que me ensina todos os dias a ser uma pessoa melhor.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Filomena Regina Barbosa Gomes Galas, minha orientadora, pelos ensinamentos iniciados na residência médica e por toda ajuda nos dias mais difíceis de trabalho. Por ser grande exemplo de dedicação aos seus pacientes.

Ao Prof. José Otávio Auler Júnior, pelo incentivo à pesquisa. Por buscar contribuir intelectualmente, enriquecendo a área médica do nosso país.

À Dra. Maride Albuquerque Piccioni por ter me incentivado na realização dessa tese de doutorado, por sempre acreditar no meu potencial e por ter me ajudado tanto nos cuidados dos nossos pacientes como na produção desta pesquisa científica.

À Dra. Célia Maria Cássaro Strunz e toda equipe do Laboratório de Análises Clínicas do InCor, pela dedicação para realização dessa tese. Pela competência na realização de cada exame, ajudando milhares de pacientes e tornando nosso hospital um centro de excelência.

À Profa. Dra. Idágene Aparecida Cestari e toda equipe da Bioengenharia do InCor pela dedicação pessoal para o desenvolvimento do método deste trabalho. Pelo exemplo de exímios pesquisadores, ajudando no desenvolvimento da ciência pelo bem da humanidade.

Ao Prof. Dr. Wilson Mathias Jr., por ter acreditado no meu potencial e por ser um grande exemplo de ensino, pesquisa e competência médica.

À Equipe da Aorta do InCor, Dr Ricardo Dias, Dra. Maria Paula Martin Ferro e Dr. José Augusto Santiago Duncan, meu muito obrigado pela amizade, por fazer alegres os dias mais difíceis e por serem meus exemplos de dedicação incansável para salvar a vida do próximo.

À enfermeira Lígia Câmara, pelo apoio técnico e científico e, principalmente, pela amizade e dedicação irrestritas.

Ao Dr. Luiz Guilherme Villares da Costa por contribuir na minha formação como anesthesiologista e me motivar a aprender mais sobre pesquisa.

Aos cirurgiões, aos anesthesiologists, aos perfusionistas, à equipe de enfermagem e a todos os profissionais responsáveis por tornar o centro cirúrgico do InCor um exemplo na saúde pública do nosso país. E por terem contribuído na execução deste trabalho.

Aos médicos assistentes da Anesthesiologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, por terem me ensinado a especialidade, dividindo conhecimento e experiência com amor e paciência.

Aos meus amigos de residência, pela parceria e companheirismo, nessa etapa da minha formação médica, tornaram a jornada leve e feliz.

À Tia Elzira Bonow e à Regina Viveiros da Silva, pelos cuidados comigo e minha família sempre com tanto carinho e amor.

Ao meu sogro Ruy e à minha sogra Efigênia, minha eterna gratidão, por serem minha família aqui em São Paulo e por cuidarem na minha filha nas muitas vezes em que eu e meu marido tivemos que nos ausentar para nos dedicarmos aos nossos pacientes e à nossa carreira.

Aos pacientes, pela confiança, por terem sempre me recebido e me ouvido com amor e esperança.

A Nossa Senhora das Graças, por iluminar meu caminho e atender aos meus pedidos, em todas as horas.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*.

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentações; 2011.

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

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE GRÁFICOS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVO	4
3 REVISÃO DA LITERATURA	6
3.1 Coagulação sanguínea	7
3.2 Coagulação e circulação extracorpórea	9
3.3 Sangramento em cirurgia cardíaca	13
3.4 Avaliação do perfil da coagulação em cirurgia cardíaca e na circulação extracorpórea	13
3.5 Circuito da circulação extracorpórea – Filtro arterial	18
3.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do filtro arterial	19
3.7 Análise da expressão gênica por reação de cadeia da polimerase (PCR) em tempo real	24
4 MÉTODOS	27
4.1 Desenho do estudo	28
4.2 Pacientes do estudo	29
4.3 Procedimento cirúrgico e admissão na unidade de terapia intensiva	29
4.4 Avaliação dos dados clínicos, demográficos, laboratoriais e coleta de dados	33
4.4.1 Dados pré-operatórios	34
4.4.2 Dados intraoperatórios	34
4.4.3 Dados pós-operatórios	36
4.5 Descrição dos exames do estudo da coagulação sanguínea analisados	37
4.5.1 Testes padrão da coagulação sanguínea	37
4.5.2 Testes especiais da coagulação sanguínea	38
4.5.3 Exames Hematológicos	39
4.6 Retirada e preparo do filtro arterial para microscopia eletrônica de varredura (MEV)	41
4.7 Análise da adesão do sangue no filtro arterial do circuito da CEC	45
4.7.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	45
4.7.2 Avaliação da expressão gênica da glicoproteína Ib (plaquetas) e CD45 (leucócitos) em material extraído do filtro arterial	46

4.8 Descrição dos exames do perfil da coagulação do filtro arterial	47
4.8.1 Microscopia eletrônica de varredura: Contagem dos campos obstruídos dos filtros	47
4.8.2 Microscopia eletrônica de varredura: Análise qualitativa do filtro	48
4.8.3 PCR em tempo real da expressão gênica da glicoproteína Ib (plaquetas) e CD45 (leucócitos) de fragmentos do filtro arterial	48
4.9 Definição dos desfechos	48
4.10 Definição das complicações clínicas e desfechos	50
4.11 Análise estatística	52
5 RESULTADOS	53
5.1 Pacientes	54
5.2 Análise do filtro arterial	58
5.3 Análise dos exames laboratoriais	72
5.4 Análise dos desfechos clínicos	76
6 DISCUSSÃO	78
7 CONCLUSÃO	84
8 ANEXOS	86
Anexo A - Reometria de oscilação livre	87
Anexo B - Traçado dos respectivos exames viscoelásticos: <i>ROTEM®</i> (A), <i>TEG®</i> (B) e <i>ReoRox®</i> (C e D)	88
Anexo C - Comparação dos testes equivalentes do <i>ROTEM®</i> e do <i>ReoRox®</i>	89
Anexo D – Aprovação Comitê de Ética	90
Anexo E – Aprovação do Comitê de Ética: Adendo	93
Anexo F – Termo de consentimento livre e esclarecido	100
Anexo G – Ficha de Coleta do Estudo	103
Anexo H - Bomba centrífuga, modelo adulto Bio-Console 560 <i>Speed Controller System</i> , da marca Medtronic Biomedicus®, Minneapolis, MN	110
Anexo I - Oxigenador de membrana acoplado ao reservatório de sangue venoso (cardiotomia) modelo adulto da marca Braile®, São José do Rio Preto, SP, Brasil	111
Anexo J - Especificações técnicas Oxigenador de Membrana Braile®	112
Anexo K - Reservatório de sangue venoso (cardiotomia) modelo adulto 4000 da marca Braile®, São José do Rio Preto, SP, Brasil	113
Anexo L - Filtro arterial modelo adulto da marca Braile®, São José do Rio Preto, SP, Brasil	114
Anexo M - Algoritmo institucional de transfusão sanguínea	115
9 REFERÊNCIAS	116

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS	Ácido acetil salicílico
ADR	Teste de agregação plaquetária com adrenalina
ADP	Teste de agregação plaquetária com adenosina 5-difosfato
AKIN	<i>Acute Kidney Injury Network</i>
AVC	Acidente Vascular Cerebral
BIA	Balão intraórtico
CAPPesq	Comissão de ética para análise de projetos de pesquisa
CEC	Circulação extracorpórea
CD45 $\Delta\Delta$ Cq	Expressão gênica do CD45 em leucócitos no sangue total
CD45 $\Delta\Delta$ Cq_filtro	Expressão gênica do CD45 em leucócitos no filtro arterial
CFT	Tempo de formação do coágulo
<i>Clot</i> SR	Retração do coágulo
cm	Centímetro
CNPq	Conselho nacional de desenvolvimento científico e tecnológico
COT1	Tempo de coagulação
COT2	Tempo de formação do coágulo
CPB	<i>Cardiopulmonary bypass</i>
CKMB	Fração MB da creatinofosfoquinase
Cq	Limiar do ciclo, <i>quantitative cycle</i> ou <i>threshold cycle</i>
CT	Tempo de coagulação
DDAVP	Desmopressina
dL	Decilitro
EAT	Elasticidade em 10 minutos
ECMO	Membrana de oxigenação extracorpórea
ETO	Óxido de etileno
EuroSCORE	<i>European system for cardiac operative risk</i>
FC	Frequência cardíaca
FEVE	Fração de ejeção do ventrículo esquerdo
FiO ₂	Fração inspirada de oxigênio

FvW	Fator de <i>von Willebrand</i>
g	Grama
GMAX	Firmeza máxima do coágulo no sangue total
GPIb	Glicoproteína Ib
GPI $\Delta\Delta$ Cq	Expressão gênica da GPIb na plaqueta
GPI $\Delta\Delta$ Cq_filtro	Expressão gênica da GPIb na plaqueta no filtro
Hb	Hemoglobina
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HNF	Heparina não fracionada
Ht	Hematócrito
IAM	Infarto agudo do miocárdio
IC 95%	Intervalo de confiança de 95%
IMC	Índice de massa corporal
InCor	Instituto do Coração
INR	Razão normatizada Internacional
IQR	Intervalo interquartil 25 - 75%
IRA	Insuficiência renal aguda
Kg	Quilograma
L	Litro
m	Metro
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
μ g	Micrograma
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
ML	Lise máxima do coágulo
mm	Milímetro
mmHg	Milímetro de mercúrio
mmoL	Milimol
ng	Nanograma
nm	Nanômetro

Pa	Pascal
Pa/min	Pascal/minuto
PCR	Reação em cadeia polimerase
PEEP	Pressão positiva expiratória final
PFC	Plasma fresco congelado
pH	Potencial hidrogeniônico
PO	Pós-operatório
POC	<i>Point-of-care</i>
POI	Pós-operatório imediato
PPP	Plasma pobre em plaquetas
PSI	Libra-força por polegada quadrada ou <i>pound force per square inch</i>
rpm	Rotações por minuto
RM	Revascularização do miocárdio
s	Segundo
<i>SLOPE</i>	Cinética de formação do coágulo
TCA	Tempo de coagulação ativada
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TP	Tempo de protrombina
TTPa	Tempo de tromboplastina parcial ativado
UI	Unidade(s)
UI/Kg	Unidades/quilograma
UTI	Unidade de terapia intensiva
<	Menor
>	Maior
°C	Grau Celsius
Δ	Delta
α	Ângulo alfa
x	Vezes

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características demográficas e clínicas dos pacientes do estudo	55
Tabela 2 - Características intraoperatórias dos pacientes do estudo	57
Tabela 3 - Coeficientes de correlação (<i>Spearman</i>) entre a variação delta de diferentes variáveis laboratoriais e a contagem de campos obstruídos no filtro e o tempo de CEC	69
Tabela 4 - Coeficientes de correlação (<i>Spearman</i>) entre a variação delta de diferentes variáveis laboratoriais e a contagem de campos obstruídos no filtro e o tempo de CEC	71
Tabela 5 - Coeficientes de correlação (<i>Spearman</i>) entre a variação delta de diferentes variáveis da coagulação e a contagem de campos obstruídos no filtro e o tempo de CEC	71
Tabela 6 - Valores medianos e IQR das principais variáveis laboratoriais medidas no início filtro e no final da CEC	73
Tabela 7 - Frequência das principais variáveis da coagulação sanguínea, segundo categorias, medidas no início da CEC e no final da CEC	75
Tabela 8 - Desfechos pós-operatórios dos pacientes estudados	77

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma da coleta dos exames do estudo	36
Figura 2 - Método de abertura e retirada do filtro arterial para análise	43
Figura 3 - Análise da MEV microscópio <i>HITACHI</i> TM 3000 de amostras fixadas e secas do filtro arterial	44
Figura 4 - Fluxograma do método de análise do filtro arterial	46
Figura 5 - Método esquemático de contagem de campos dos filtros	47
Figura 6 - Avaliação macroscópica da membrana de poliéster do filtro arterial	59
Figura 7 - Exemplo 1 da MEV de fragmento do filtro arterial	60
Figura 8 - Exemplo 2 da MEV de fragmento do filtro arterial	60
Figura 9 - Exemplo ilustrativo de MEV de fragmento do filtro arterial	61
Figura 10 - MEV de um filtro novo de controle	61
Figura 11 - Método de contagem de campos obstruídos de amostra do filtro arterial por material originado da CEC	63

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** - Representação em *boxplot* da expressão gênica da GPIb nas plaquetas no filtro arterial e da contagem de campos nos filtros arteriais utilizados durante a CEC nos pacientes do estudo 64
- Gráfico 2** - Representação em *boxplot* das medidas de expressão gênica de GPIb em plaquetas no sangue total no início e final da CEC 65
- Gráfico 3** - Representação em *boxplot* das medidas de expressão gênica do CD45 em leucócitos no sangue total no início e final da CEC 66
- Gráfico 4** - Dispersão em dois eixos da expressão gênica da GPIb nas plaquetas medida no sangue no final da CEC e a variável *Clot SR* no final da CEC 67
- Gráfico 5** - Dispersão em dois eixos da variação delta da expressão gênica da GPIb nas plaquetas no sangue total e o tempo de CEC 68
- Gráfico 6** - Dispersão em dois eixos da variação delta dímero-D e a contagem de campos obstruídos dos filtros arteriais 70
- Gráfico 7** - Valores medianos e intervalo interquartil das variáveis laboratoriais em diferentes momentos do estudo 72

RESUMO

Gatto CST. Análise da adesão das células sanguíneas no filtro arterial por microscopia eletrônica de varredura e reação em cadeia da polimerase em tempo real em pacientes submetidos a cirurgia cardíaca: estudo clínico observacional [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

Introdução: Os efeitos deletérios no sistema de coagulação causados pela circulação extracorpórea são decorrentes, em parte, das reações do contato do sangue com a superfície não endotelizada do circuito da circulação extracorpórea. O filtro arterial é o componente do circuito da circulação extracorpórea onde o sangue é exposto a elevado estresse mecânico e onde há maior agregação celular. **Objetivo:** Analisar a adesividade do sangue no filtro arterial durante a circulação extracorpórea por microscopia eletrônica de varredura e por reação em cadeia de polimerase em tempo real. **Método:** Estudo clínico e observacional realizado no Instituto do Coração da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, após aprovação do comitê de ética institucional. O estudo incluiu 28 pacientes. Ao final da cirurgia, o filtro arterial era retirado do circuito da circulação extracorpórea e preparado para ser analisado pela microscopia eletrônica de varredura. Foi realizada reação em cadeia da polimerase em tempo real no material biológico extraído de dez amostras de locais e tamanhos pré-determinados do filtro arterial para avaliação da expressão gênica da glicoproteína Ib na plaqueta e do CD45 em leucócito. A função hemostática foi avaliada durante circulação extracorpórea. Os pacientes foram acompanhados até a alta ou até 28 dias depois da cirurgia. **Resultados:** Os filtros estudados apresentaram algum grau de adesão de elementos sanguíneos na microscopia eletrônica de varredura. Os filtros estudados foram positivos para expressão gênica da glicoproteína Ib na plaqueta e 15% dos filtros tiveram expressão gênica do CD45 em leucócitos. A dosagem sanguínea da expressão gênica da glicoproteína Ib na plaqueta diminuiu no final da circulação extracorpórea em relação ao início ($P=0,019$).

Houve correlação negativa entre a dosagem da expressão gênica da glicoproteína Ib na plaqueta e o *Clot SR* (Hepscreen2 ReoRox®) ($r=0,635$; $p=0,027$). A mediana da contagem de campos obstruídos do filtro foi de 3,4%. A contagem de campos obstruídos do filtro teve correlação com a dosagem de dímeros-D ($r=0,828$; $p<0,001$). **Conclusão:** Houve adesão de células sanguíneas, especialmente de plaquetas nucleadas, em todos os filtros arteriais estudados. Embora o filtro arterial tenha funcionado como um dispositivo de segurança, que provavelmente evitou a embolização arterial, a obstrução parcial do filtro também pode ter causado maior hiperfibrinólise durante a circulação extracorpórea.

Descritores: Circulação extracorpórea; Cirurgia torácica; Microscopia eletrônica de varredura; Expressão gênica; Coagulação sanguínea.

ABSTRACT

Gatto CST. *Blood cell adhesion to arterial filters analysis by scanning electron microscopy and real-time polymerase chain reaction assay in cardiac surgery patient: observational clinical study* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2020".

Introduction: Deleterious effects in the coagulation system of cardiopulmonary bypass are partly sequelae of blood-foreign surface reactions. The arterial filter is the part of the cardiopulmonary bypass circuit where blood cells are exposed to high mechanical stress and where cellular aggregates may fasten in large quantities. **Objective:** The aim of this study was to analyse blood adhesiveness in the arterial filter during extracorporeal circulation through scanning electron microscopy and real-time polymerase chain reaction assay. **Method:** Clinical and observational study performed on 28 patients undergoing cardiac surgery with cardiopulmonary bypass, who satisfy inclusion and exclusion criteria, in the surgical center and intensive care unit of the Heart Institute from Faculty of Medicine, University of São Paulo. Once the surgery was completed, the arterial filter was taken from the cardiopulmonary bypass circuit in order to be prepared and analysed by the scanning electron microscopy. Real-time polymerase chain reaction assay was performed in extracted material from ten arterial filter samples for analysis of platelets glycoprotein Ib gene expression and leucocyte CD45 gene expression. The hemostatic function was analysed at the beginning and in the end of cardiopulmonary bypass. Patients were followed until hospital discharge or 28 days after surgery. **Results:** All studied arterial filters used in the subject patients showed a degree of adhesion from blood elements at scanning electron microscopy. All studied filters were positive for platelets glycoprotein Ib gene expression and 15% had CD45 leucocyte gene expression. The glycoprotein Ib platelet gene expression in blood lowered at the end of cardiopulmonary bypass ($p=0,019$). There was a negative correlation between quantitative blood glycoprotein Ib platelet gene expression and *Clot SR* (Hepscreen2 ReoRox®) ($\rho=0,635$; $P=0,027$). The median counting of filter

fields was 3,4%. The filter fields count was correlated to the D-dimer dosage ($\rho = 0,828$; $P < 0,001$). **Conclusion:** There was adhesion of blood elements, especially nucleated platelets, on all arterial filters studied. Although the arterial filter worked as a safety device that probably prevented arterial embolization, it also may have caused greater hyperfibrinolysis during cardiopulmonary bypass.

Descriptors: Extracorporeal circulation; Thoracic surgery; Microscopy electron scanning; Blood coagulation.

1 INTRODUÇÃO

O contato do sangue com superfícies não endotelizadas, durante a circulação extracorpórea (CEC), ativa os sistemas hemostáticos podendo resultar na formação de microtrombos durante a CEC¹. Os pacientes submetidos a cirurgia cardíaca podem apresentar alterações no sistema hemostático, secundárias a adesão das células sanguíneas na superfície do circuito da CEC^{2,3}. Essas alterações podem determinar complicações trombóticas no período pós-operatório, o que pode contribuir para o aumento da morbimortalidade perioperatória¹.

A heparinização sistêmica durante CEC inibe parcialmente a ativação do sistema de coagulação diminuindo o risco de coagulação intravascular catastrófica. Entretanto, doses elevadas de heparina estão associadas a aumento de sangramento pós-operatório⁴. Além disso, mesmo com o tempo de coagulação ativada maior do que 400 segundos após a administração de heparina, ainda ocorre a produção de trombina que aumenta progressivamente durante a CEC⁵. A trombina é uma protease potente⁶ que cliva primariamente o fibrinogênio em fibrina, ativa diretamente as plaquetas através de um receptor específico de trombina⁷ e estimula as células endoteliais a produzirem o ativador do plasminogênio tecidual⁸. Quando a trombina é gerada constantemente pode ocorrer hiperfibrinólise e coagulopatia de consumo^{5,9,10}.

Na tentativa de diminuir a possibilidade da entrada de microêmbolos na corrente sanguínea dos pacientes, utilizam-se filtros de sangue no circuito da CEC. Esses filtros têm por finalidade aprisionar todo material estranho, originado do equipamento do campo cirúrgico ou do sangue circulante no circuito da CEC. O filtro arterial é um dispositivo do circuito extracorpóreo que aumenta a margem de segurança na CEC, prevenindo a ocorrência de embolia aérea ou de outra natureza¹¹. Porém, o filtro arterial também é a parte do circuito da CEC que está exposto ao maior índice de estresse mecânico e onde

agregados celulares podem se agregar rapidamente e em maiores quantidades¹².

Para o desenvolvimento de técnicas efetivas que controlem a trombose durante a CEC são necessários métodos qualitativos que avaliem a interação do sangue com os biomateriais. A complexa interação entre o sistema hemostático e fatores interdependentes como a dinâmica de fluxo, a trombogenicidade de cada material e a duração deste contato, tornam difícil o estudo *in vitro*¹³. Dessa forma, análises qualitativas e quantitativas de amostras representativas do circuito da CEC são necessárias para o entendimento da interação sanguíneo-biomaterial e para estudos da coagulação sanguínea do paciente.

O presente estudo avaliou a adesividade das células sanguíneas no filtro arterial do circuito da CEC por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real em pacientes submetidos a cirurgia cardíaca.

2 OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi analisar a adesividade das células sanguíneas no filtro arterial durante a circulação extracorpórea por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Coagulação sanguínea

O mecanismo hemostático inclui três processos: hemostasia primária (plaquetas), coagulação (hemostasia secundária - fibrinogênio) e fibrinólise (produtos de degradação da fibrina)¹⁴. Estes processos têm em conjunto a finalidade de manter a fluidez necessária do sangue, sem haver extravasamento pelos vasos ou obstrução do fluxo pela presença de trombos¹⁵.

Na hemostasia primária as plaquetas têm papel fundamental¹⁵. A adesão plaquetária na presença do fator de *Von Willebrand* (FvW) e do fator VIII (FVIII) é ativada no momento da lesão ou disfunção endotelial, pois expõe o sangue em contato com o colágeno da região subendotelial¹⁶. Quando isto ocorre, as plaquetas tornam-se ativadas e liberam o conteúdo dos grânulos citoplasmáticos¹⁷. Entre outras substâncias, estes grânulos contêm adenosina-difosfato (ADP), serotonina e tromboxano A₂ (TXA₂)¹⁸. O ADP é responsável pela ativação de outras plaquetas e pela modificação de sua forma, que passa de discoide para esférica com o aparecimento de pseudópodes¹⁶. Estas plaquetas ativadas se agregam umas às outras, formando um tampão que fornecerá a superfície adequada ao processo de coagulação do sangue, produzindo um coágulo resistente. Neste estágio, as plaquetas exteriorizam uma lipoproteína denominada fator plaquetário 3 (FP3)¹⁸, que desempenha papel na superfície fosfolipídica (superfície ativadora) e participa de inúmeras reações do sistema da coagulação¹⁷.

A coagulação sanguínea consiste na conversão de uma proteína solúvel, o fibrinogênio, em um polímero insolúvel, a fibrina, por ação da enzima denominada trombina¹⁹. A fibrina forma uma rede de fibras elásticas que consolida o tampão plaquetário e o transforma em tampão hemostático¹⁶. A coagulação constitui uma série de reações químicas entre várias proteínas que convertem pró-enzimas (zimógenos) em enzimas (proteases). Essas pró-

enzimas e enzimas são denominadas fatores de coagulação²⁰. A ativação destes fatores é provavelmente iniciada pelo endotélio ativado e finalizada na superfície das plaquetas ativadas e tem como produto essencial a formação de trombina que promoverá modificações na molécula de fibrinogênio liberando monômeros de fibrina na circulação²¹. Estes últimos vão unindo suas terminações e formando um polímero solúvel (fibrina S) que, sob a ação do fator XIIIa (fator XIII ativado pela trombina) e íons de cálcio, produz o alicerce de fibras quem mantém estável o agregado de plaquetas previamente formado¹⁶.

A fibrinólise é a última etapa do processo hemostático, após hemostasia primária e coagulação. A fibrinólise remove a fibrina formada em excesso e o sangue volta a fluir normalmente no interior do vaso restaurado²⁰. A plasmina, proteína que faz a lise da rede de fibrina, é derivada do plasminogênio que está ligado internamente à rede de fibrina¹⁷. O ativador tecidual do plasminogênio, liberado pelo endotélio que circula a área da lesão, é responsável pelo desencadeamento do processo que limita a progressão desnecessária da trombose²². A antiplasmina, presente no plasma, combina-se com o excesso de plasmina liberada, impedindo o aparecimento de fibrinólise generalizada. Essa proteína está presente na circulação plasmática dez vezes maior que a plasmina¹⁸.

A plasmina não restringe sua ação apenas à fibrina. Também é capaz de quebrar o fibrinogênio ou agir diretamente sobre a fibrina, que, polimerizada ou não, forma os produtos de degradação da fibrina (PDFs)²³. Os PDFs são removidos da circulação principal pelo fígado e pelo sistema reticuloendotelial²². Entretanto, se a produção de PDFs superar a capacidade de clareamento, ocorre acúmulo do excedente produzido, podendo atingir níveis tais que passam a inibir a coagulação normal, através da interferência com a polimerização da fibrina, induzindo alteração funcional das plaquetas²⁴.

3.2 Coagulação e circulação extracorpórea

Durante a cirurgia cardíaca com circulação extracorpórea (CEC) ocorre ativação dos processos hemostáticos, incluindo a coagulação e fibrinólise levando ao aumento do risco de sangramento pós-operatório, e predisposição para trombose. A alteração da hemostasia é consequência dos vários fatores: contato do sangue com a superfície não endotelizada do circuito da CEC ativando o sistema de coagulação, o sistema fibrinolítico, e as interleucinas e calicreínas, que irão desencadear aumento da resposta inflamatória sistêmica^{25,26}. A administração de doses elevadas de heparina durante a CEC, assim como, de protamina no fim da cirurgia, podem afetar a coagulação, a fibrinólise e a função plaquetária^{27,28}.

A ativação da resposta hemostática pela cirurgia, assim como a hipotermia e hemodiluição com cristalóides podem causar aumento do consumo dos fatores de coagulação e disfunção plaquetária²⁹⁻³².

No início da CEC ocorre adsorção e deposição de proteínas do plasma nas superfícies internas dos tubos, oxigenadores e filtros, especialmente fibrinogênio, gamaglobulinas e em menor proporção, a albumina. Forma-se uma verdadeira camada de revestimento proteico, que em cinco segundos tem a espessura de cerca de cinco angstrons (Å) e, em um minuto de perfusão, alcança a espessura de 125 Å³³.

Outras proteínas, inclusive fatores de coagulação e lipoproteínas, são também adsorvidas, porém, em menores quantidades que o fibrinogênio. Sobre esse revestimento proteico, rico em fibrinogênio, depositam-se plaquetas que são, dessa forma, sequestradas da circulação. Antes do início da perfusão, certos produtos liberados pela incisão dos tecidos, como a tromboplastina tissular, estimulam as plaquetas na redução de 40% da resposta ao estímulo agregante da adenosina. Esta redução da capacidade funcional das plaquetas

coincide com a elevação do nível de tromboxano B2 no plasma, de duas a quatro vezes o valor inicial. Nos primeiros minutos da perfusão, ocorre um rápido desaparecimento das plaquetas do sangue circulante. Essa redução do número de plaquetas independe da hemodiluição com os oxigenadores de bolhas, e de membranas, sendo, contudo, mais acentuada nos oxigenadores de bolhas, devido à interface com o gás³³.

O contato das plaquetas com os circuitos da circulação extracorpórea causa redução da capacidade de agregação plaquetária, além de alterações na hemostasia, que podem ser responsáveis pelo sangramento no final da CEC³³.

Durante a CEC, as plaquetas sofrem alterações que dificultam a hemostasia e a coagulação alterando a sua forma tornando-se arredondada, diminuindo a agregação primária e a secundária com depleção granular. A ativação das plaquetas pode ocorrer por vários mecanismos, dentre eles a incisão cirúrgica, administração de heparina, hipotermia e contato direto com o circuito da CEC³⁴.

A trombina, gerada pelo contato do sangue com a superfície não endotelizada da CEC, é um potente agonista plaquetário. Durante o procedimento, outros fatores promovem a ativação plaquetária, tais como complemento (C5b-9), leucotrienos, plasmina e collagenase³⁵. Após a ativação, estas aderem ao fibrinogênio, fator de *von Willebrand* e fibronectina presentes na superfície do circuito. As plaquetas expressam receptores para glicoproteína IIb/IIIa, o que permite a adesão entre elas através das pontes de fibrinogênio, e também expressam P-selectina, o que contribui para a formação dos conjugados de neutrófilos e monócitos³⁶. A expressão da P-selectina estimula os monócitos a expressar o fator tecidual, contribuindo para a formação do trombo³⁷.

O contato do sangue com as superfícies não endotelizadas do circuito de CEC também ativa o fator XII (fator *Hageman*) imediatamente após o início

da CEC, ativando o sistema de coagulação, o sistema fibrinolítico e o sistema das calicreínas. Existe uma íntima relação entre estes sistemas no processo de ativação de suas funções^{38,39}. A bradicinina produzida pela ativação do sistema calicreína promove aumento da permeabilidade vascular e dilatação arteriolar. Os níveis de bradicinina permanecem elevados durante e após a cirurgia, devido à exclusão da circulação pulmonar, principal sítio de metabolização da bradicinina^{40,41}.

O sistema fibrinolítico ativado determina a formação dos produtos da degradação da fibrina (PDFs) capazes de promover contração do músculo liso, potencialização da bradicinina e histamina, agregação plaquetária e citotoxicidade ao endotélio⁴². A trombogenicidade das superfícies do circuito extracorpóreo começa com a formação de uma capa de proteínas plasmáticas, seguida de aderência e agregação plaquetária, geração de tromboxano A₂, e ativação da via intrínseca do sistema de coagulação, levando à formação de trombina e deposição de fibrina.

A heparina não fracionada (HNF) é o anticoagulante de escolha utilizado na CEC, devido ao seu rápido início de ação e por ter um agente neutralizador, a protamina. A heparina é um mucopolissacarídeo sulfatado aniônico de peso molecular variável extraído comercialmente dos mastócitos de pulmão bovino ou de intestino de porco. A heparina se liga à antitrombina III circulante, que então reage com as proteases séricas dos fatores de coagulação II, IX, XI e XII, resultando em rápida inativação destes fatores. A agregação plaquetária e a ativação estimulada pela heparina são contrabalançadas por uma interferência com a ligação e a ativação dos fatores de coagulação ao nível da membrana das plaquetas⁴³. A dependência da heparina com a antitrombina causa a variabilidade do potencial anticoagulante da heparina de acordo com características individuais de cada paciente e em cada situação em que é empregada⁴⁴. Entretanto, os níveis de antitrombina

não predizem a habilidade da heparina não fracionada de atingir os valores desejados de tempo de coagulação ativada (TCA)⁴⁵. Outros fatores como heterogenicidade do comprimento das cadeias da HNF e sua variabilidade na ligação com as células endoteliais, macrófagos e proteínas plasmáticas afetam sua biodisponibilidade⁴⁶.

Por esta variabilidade é preciso monitorizar frequentemente a efetividade da anticoagulação pela HNF, que geralmente é realizada através da medida do tempo de coagulação ativado (TCA). O TCA também tem suas significativas limitações, como a ausência de consenso sobre que valor de TCA reflete uma anticoagulação adequada⁴⁷. Os valores do TCA não se correlacionam bem com a concentração atual de heparina⁴⁸ e a trombina é ainda ativada mesmo com valores de TCA acima de 480 segundos^{9,49}. Estudos têm sido realizados na tentativa de administrar uma dose mais adequada de heparina medindo-se os níveis com concentração plasmática da heparina. Apesar de alguns estudos demonstrarem redução da ativação do sistema hemostático^{50,51}, outros não mostraram diferença quando comparada a dosagem plasmática da concentração de heparina com o TCA⁵².

Além dos problemas relacionados à dosagem, há outras características a impedir que a HNF seja um anticoagulante ideal. A própria heparina causa ativação plaquetária e estimula a fibrinólise⁵³. A heparina também induz a liberação do inibidor da via do fator tecidual levando as reservas do inibidor do fator tecidual endotelial à exaustão⁵⁴. A trombocitopenia induzida por heparina (HIT) também tem sido bastante estudada⁵⁵. A HIT é causada por anticorpos formados a partir de um complexo formado pela heparina e pelo fator plaquetário. Cerca de 25-50% dos pacientes irão desenvolver anticorpos, num intervalo de cinco a dez dias de pós-operatório, que podem causar complicações trombóticas caso a terapia com heparina seja necessária no período pós-operatório⁵⁶.

3.3 Sangramento em cirurgia cardíaca

Sangramento excessivo é uma das maiores complicações durante a cirurgia cardíaca com circulação extracorpórea⁵⁷. As recomendações para nova exploração cirúrgica são as seguintes: sangramento maior do que 500 ml na primeira hora, maior do que 400 ml/h por duas horas, maior do que 300 ml/h por três horas ou maior do que 200 ml/h por seis horas. Os fatores intra-operatórios e pós-operatórios envolvidos incluem alteração do número e função plaquetária pela circulação extracorpórea (CEC) e por hipotermia, efeito da heparina, diminuição dos níveis de fator I, II, V, VII, IX, X, XIII pela CEC devido à hemodiluição e diminuição de fator de *Von-Willebrand*⁵⁸.

Há também aumento da fibrinólise devido à ativação endotelial e liberação de ativador do plasminogênio e aumento de dímero-D⁵⁸.

3.4 Avaliação do perfil da coagulação em cirurgia cardíaca e na circulação extracorpórea

Os testes de coagulação convencionais foram desenvolvidos no momento em que o sistema de coagulação estava sendo descrito e foram padronizados para monitorizar pacientes que faziam uso de antagonistas de vitamina K e heparina¹⁴. Apesar de os testes não terem propósitos terapêuticos para manejo hemorrágico e *trigger* transfusional, ainda são utilizados para este fim. Os testes de coagulação convencionais requerem um tempo maior para processamento e leitura e, em muitos casos, não refletem a complexidade e precocidade de distúrbios hemostáticos⁵⁹.

A tromboelastografia e a tromboelastometria são metodologias de primeira linha para avaliação do modelo celular da coagulação. Entretanto são exames *point-of-care*, possuem equipamentos portáteis, podendo ser utilizados à beira leito, com a obtenção dos resultados e em menor tempo. Após cinco a 30 minutos do início do exame já é possível obter informações sobre a dinâmica de formação do coágulo, estabilização e fibrinólise²⁰. Esses são os chamados testes viscoelásticos, porque promovem uma representação gráfica do processo de polimerização da fibrina com avaliação funcional do fibrinogênio, plaquetas e fibrinólise, demonstrando de forma singular a iniciação, formação e estabilização do coágulo⁶⁰. Dessa forma, a tromboelastografia e a tromboelastometria são exames que refletem a hemostasia *in vivo*, sendo capazes de promover informações de maior utilidade clínica do que os exames tradicionais da coagulação.

A tromboelastografia (TEG®), descrita em 1948 por Hellmut Hartert, permite a avaliação global do processo de geração da trombina⁶¹. O princípio da tromboelastografia, TEG®, envolve a incubação de 360 µl de sangue a 37°C em um copo cilíndrico aquecido²⁴. O copo oscila durante 10 segundos em um ângulo de 4°45', com um pino suspenso livremente em uma taça por um fio de torção⁶². Ocorrem, então, alterações bioquímicas de pH, eletrólitos e temperatura, promovendo interatividade entre células do sangue e subsequente ligação entre fibrinas e plaquetas que através do movimento rotativo do copo transmite para o pino imerso uma cadência de movimento⁶². Desse modo, a magnitude da expressão gráfica está diretamente relacionada com a resistência do coágulo formado²⁴. Após a retração do coágulo, ocorre a sua lise. As ligações são quebradas e a transferência do movimento do copo é reduzida. O movimento de rotação do pino através do transdutor mecânico é convertido em sinal elétrico, graficamente manifesto¹⁹.

A tromboelastometria rotacional (*ROTEM*®), ao contrário do TEG®, é o pino de aço que faz uma rotação de 4,75° em relação ao copo²⁴. Essa movimentação se transmite por meio de uma leitura óptica para um *software* que produz uma representação gráfica de amplitude em relação ao tempo de todo processo de formação do coágulo, desde a iniciação, à máxima formação até a sua lise⁶³.

A tromboelastometria rotacional (*ROTEM*®) é a expressão gráfica da formação viscoelástica da polimerização da fibrina. Suas variáveis são tempo, dinâmica, tamanho e firmeza do coágulo. Avalia o coágulo da sua formação à lise⁶⁴. A vantagem que o *ROTEM*® oferece, sobre o TEG®, é sua capacidade de apresentar resultados depois de um intervalo de cinco a 30 minutos, graças aos reagentes aceleradores e inibidores do processo de coagulação⁶⁴.

Gronchi *et al.*⁶⁵ realizaram um estudo clínico, observacional e prospectivo de validação do *ROTEM*® durante a CEC no qual foram incluídos 20 pacientes submetidos a revascularização do miocárdio com CEC. Foram analisados os testes EXTEM, INTEM e HEPTM antes da administração de heparina (T0), dez minutos após o início da CEC (T1), no final da CEC (T2) e dez minutos após a administração de protamina (T3). O estudo demonstrou que o INTEM foi diferente do HEPTM no T1 para o tempo de coagulação (CT), no A10 e no ângulo alfa. No T2, todos os parâmetros do EXTEM e do HEPTM relacionados à interação plaquetas-fibrina se deterioraram significativamente em relação ao T1. No T3, EXTEM e INTEM eram comparáveis ao EXTEM e HEPTM no T2. O estudo concluiu que as medidas do HEPTM e do EXTEM eram válidas mesmo quando realizadas em situações com a utilização de altas doses de heparina, podendo ser feitas antes da administração de protamina em pacientes submetidos a cirurgia cardíaca com CEC.

Um novo teste viscoelático da coagulação, *ReoRox*® (Medirox AB, Sweden) baseado em reometria de oscilação livre foi desenvolvido e já está sendo utilizado na prática clínica. À diferença do *ROTEM*®, que usa um pino para rodar a amostra, o *ReoRox*® é livre de qualquer força externa enquanto ocorre a formação do coágulo⁶⁶. O copo contendo a amostra de sangue é colocado em oscilação livre por um dispositivo de fio de torção, o amortecimento e a frequência da mudança no movimento oscilante são gravados e traduzidos pelo sistema em parâmetros de viscosidade e elasticidade, respectivamente⁶⁷⁻⁷⁰. O tempo de formação do coágulo e as mudanças na elasticidade do coágulo são registrados em um gráfico através de uma curva⁶⁸ (anexo A).

Comparado ao *ROTEM*®, a reometria por oscilação livre tem maior sensibilidade para detectar alterações da elasticidade do coágulo⁷¹. O método do *ReoRox*® permite detectar a qualidade da fibrina do coágulo utilizando um inibidor de plaquetas em adição ao ativador da tromboplastina. O inibidor de plaquetas utilizado no teste Fibscreen2 do *ReoRox*® é o abciximab, já o teste FIBTEM do *ROTEM*® utiliza a citocalasina D como agente inibidor das plaquetas⁷¹.

Solbeck *et al.* compararam o *ROTEM* com o *ReoRox*® em um ensaio clínico⁶⁷. Este estudo prospectivo envolveu 40 pacientes vítimas de trauma e realizou os dois exames em todos os pacientes. Os parâmetros comparados foram a máxima firmeza do coágulo (MCF) do teste FIBTEM do *ROTEM*® com a elasticidade máxima (GMAX) do teste Fibscreen2 do *ReoRox*®, associado a correlação desses parâmetros com a dosagem sérica do fibrinogênio. Os autores demonstraram que houve correlação significativa do MCF com o GMAX (Coeficiente de correlação de *Spearman* $r=0.69$, $p<0,001$).

Tynngard *et al.* compararam o *ROTEM*® com o *ReoRox*® utilizando amostras de sangue de voluntários saudáveis para demonstrar que os testes

viscoelásticos da coagulação podem ser utilizados para monitorizar fibrinólise. As amostras destes voluntários sofreram os efeitos da hemodiluição para serem estudadas com o hidroxietilamido (HES) 10%. Os autores observaram que a diminuição do GMAX do teste Fibscreen2 do *ReoRox*® foi menor que a diminuição do MCF do FIBTEM do *ROTEM*®⁷¹.

Solomon *et al.* também compararam o MCF do FIBTEM do *ROTEM*® com o GMAX do Fibscreen2 do *ReoRox*® utilizando amostras de sangue de oito voluntários saudáveis. As amostras desses voluntários foram analisadas com hemodiluição e sem hemodiluição. A hemodiluição foi realizada a 33% e a 50% com soro fisiológico 0,9%, gelatina (Gelofusin®) e hidroxietilamido 6% (Voluven®). Os dois testes sofreram alterações com a hemodiluição. Houve alteração mais importante dos resultados quando as amostras foram hemodiluídas com a gelatina e o hidroxetilamido 6%. Porém, houve baixa correlação dos parâmetros do MCF do FIBTEM do *ROTEM*® com o GMAX do Fibscreen2 do *ReoRox*® ($r^2 = 0.37$, $p < 0,001$). O estudo concluiu que o teste Fibscreen2 do *ReoRox*® tem alto coeficiente de variação e sua aplicação em situações de hemodiluição tem comparatividade limitada com o FIBTEM do *ROTEM*®⁶⁶.

Outra vantagem do *ReoRox*®, em relação aos testes convencionais da coagulação, é a possibilidade de avaliar a coagulação do paciente mesmo em situações com anticoagulação plena por heparina através do teste Hepscreen2, o qual foi empregado neste estudo para avaliar a coagulação do paciente durante a CEC.

Uma revisão de literatura de Tynngard *et al.* de 2015⁷² comparou diversos testes de coagulação (anexo B e C).

3.5 Circuito da circulação extracorpórea – Filtro arterial

Na cirurgia cardíaca, durante a CEC, podem ser acidentalmente introduzidos no sistema arterial do paciente, trombos, bolhas de ar, agregados plaquetários, partículas de plástico ou fios de sutura microêmbolos¹¹. Para diminuir a possibilidade de introdução de microêmbolos na corrente sanguínea do paciente adota-se o uso de filtros de sangue no circuito da CEC. Esses filtros têm por finalidade aprisionar todo material estranho, originado no equipamento ou no campo cirúrgico, do sangue circulante no circuito da CEC. Pode-se dizer que o filtro arterial é um dispositivo do circuito extracorpóreo que aumenta a margem de segurança na CEC, prevenindo a ocorrência de embolia aérea ou de outra natureza¹¹.

Um filtro de sangue ideal deve gerar a menor queda de pressão possível e não deve danificar as células sanguíneas. As características mais importantes de um filtro arterial são, o volume de enchimento, a área útil de filtração e a sua porosidade.

A maioria dos filtros arteriais tem um volume de enchimento entre 180 e 260 mL, conexões de 3/8 de polegada (9,52 mm), área útil de filtração variável entre 500 e 1.800 cm² e porosidade de 40 µm. Uma grande área útil de filtração e um pequeno volume de enchimento são obtidos pela acomodação do tecido do filtro no seu interior, sendo mais comum o formato semelhante a um fole.

O balanço adequado entre uma grande área útil de filtração e um pequeno volume de enchimento, é obtido pela acomodação do tecido do filtro no seu interior, de diversos modos, dos quais o mais comum, é o “fole” de sanfona.

A membrana filtrante promove a retenção de partículas e microbolhas presentes no sangue, e o sentido de fluxo possibilita a retirada de macrobolhas de ar. Os filtros para uso na linha arterial são projetados para funcionar com fluxo sanguíneo de até 6 L/min, com baixo gradiente de pressão e sem causar hemólise excessiva. Possuem um volume de enchimento (*“priming”*) relativamente baixo, fácil evacuação do ar do seu interior e, ainda, permitem a monitoração da pressão da linha arterial¹¹.

3.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do filtro arterial

Para análise da microestrutura de materiais, como o filtro arterial do circuito CEC, as técnicas mais utilizadas são a microscopia ótica e a microscopia eletrônica.

No caso da microscopia ótica, o contraste da imagem é resultado da diferença de refletividade da luz nas diversas regiões da microestrutura, uma vez que o sistema é constituído basicamente pela fonte de iluminação e pelo sistema de lentes. Para materiais que são opacos à luz visível, como é o caso dos metais, da maioria dos cerâmicos e dos polímeros, somente a superfície pode ser observada e a mesma precisa ser cuidadosamente preparada de maneira a revelar os detalhes da microestrutura⁷³.

Uma das limitações da microscopia ótica é o aumento máximo conseguido que fica em torno de 2000 vezes. Como consequência, pequenos detalhes estruturais não são possíveis de serem detectados através desta técnica. No caso da MEV, a área ou o microvolume a ser analisado é irradiado por um fino feixe de elétrons ao invés da radiação da luz. Como resultado da interação do feixe de elétrons com a superfície da amostra, uma série de radiações são emitidas e quando captadas corretamente irão fornecer

informações características sobre a amostra (topografia da superfície, composição, cristalografia, etc)⁷³.

Na MEV, os sinais de maior interesse para a formação da imagem são os elétrons secundários e os retroespalhados. À medida que o feixe de elétrons primários vai varrendo a amostra, estes sinais vão sofrendo modificações de acordo com as variações da superfície. Os elétrons secundários fornecem imagem de topografia da superfície da amostra e são os responsáveis pela obtenção das imagens de alta resolução, já os retroespalhados proporcionam imagem característica de variação de composição⁷³.

Borowiec *et al.*¹² analisaram a adesão do sangue no filtro arterial da CEC por MEV. Como método para estimar a adesão celular na superfície do filtro arterial foi criado um escore de graduação de adesão do sangue no filtro arterial, numa escala de um a dez. O escore da adesão variava de acordo com as modificações na morfologia das células e com o grau de cobertura de fibrina das imagens realizadas do filtro arterial pela MEV. Neste escore, o grau 1 corresponde à ausência de adesão de elementos do sangue no filtro arterial e nenhuma alteração morfológica da célula. O grau 3 tinha sinais discretos de ativação celular com mudanças na superfície das células como o aparecimento de pseudópodes e ocasionais fibras de fibrina. No grau 6 a ativação era mais expressiva, eram observadas numerosas células, pseudópodes multiformes, além de aglomerados de plaquetas e leucócitos. No grau 10 a adesão era extremamente avançada, com grandes depósitos e não era possível distinguir os tipos celulares. Também se observava grande abundância de debris de fibrina. Para realizar esta escala foram realizadas vinte amostras com aumento de mil vezes do filtro arterial do circuito de CEC de 31 pacientes submetidos a revascularização do miocárdio com CEC.

Borowiec *et al.*¹² utilizaram essa escala para comparar diferentes tipos de circuitos e diferentes doses de heparina. Esse estudo clínico prospectivo contou com 31 pacientes submetidos a revascularização do miocárdio com CEC. Os pacientes foram divididos em cinco grupos. O grupo C foi o grupo controle, que recebeu dose padrão de heparina (300 UI/Kg) antes do início da CEC. Esse grupo utilizava o circuito e o filtro arterial da CEC padrão, ou seja, não recobertos por heparina. O grupo HC baixa dose de heparina recebia 150 UI/Kg, e utilizava circuito e filtro arterial recobertos por heparina. O grupo HC dose maior de heparina recebia 225 UI/Kg de heparina. Esse grupo usava circuito e filtro arterial recobertos por heparina. O grupo FC utilizou dose padrão de heparina e utilizava filtro arterial recoberto por heparina, com o restante do circuito não recoberto. O grupo OC recebia dose padrão de heparina e utilizava circuito recoberto de heparina e filtro arterial padrão. Foram realizadas análises de MEV de amostras dos filtros arteriais desses cinco grupos.

A MEV demonstrou que os filtros arteriais dos pacientes que utilizavam filtros arteriais recobertos por heparina praticamente não apresentavam adesão sanguínea na sua superfície, mesmo naqueles que utilizaram o resto do circuito não recoberto. Também houve diferença no escore de adesão já citado. O grupo HC (circuito e filtro arterial recobertos por heparina) teve escore significativamente menor ($2,2 \pm 0,27$ [média $\pm$ desvio padrão da média]) que o grupo C (controle) ($5,4 \pm 0,53$; $p < 0,001$). No grupo FC (filtro recoberto) a adesão foi marginalmente maior do que a do grupo HC mas significativamente menor que o grupo OC (filtro não recoberto) ($2,6 \pm 0,68$; $p = 0,05$). O estudo concluiu que os filtros arteriais recobertos com heparina têm menor adesão celular em sua superfície durante a circulação extracorpórea. Esse efeito parece ser independente das características do resto do circuito da CEC.

Kundu SK *et al.*¹³ realizaram um estudo experimental para quantificar o grau de trombose de circuitos de oxigenação extracorpórea por membrana (ECMO). Quatro coelhos foram submetidos a ECMO venoarterial. Os animais foram anestesiados e receberam heparina sistêmica 300 UI/Kg antes canulação e 50 UI/Kg/h em infusão contínua, permanecendo com o TCA ficou acima de 500s. O circuito da ECMO consistia em tubo de ¼ de polivinil (PVC) (*Tygon, Norton Health Care Products, Akron, OH*) e membrana de oxigenação de silicone (*ScieMe Life Systems, Minneapolis, MN*, 0,4m² de superfície de área). Foram coletadas seis amostras dos tubos de polivinil do circuito e seis amostras da membrana de silicone da ECMO de quatro circuitos utilizados para análise da MEV. Cada amostra foi fotografada com aumento inicial de 15 vezes. Uma grade (90x92mm) foi sobreposta à fotografia e dividida em 80 retângulos iguais. Cada retângulo foi focado e aumentado 1500 vezes para análise quantitativa da MEV. Os resultados obtidos indicaram ausência de diferença estatística de aderência do sangue nos tubos e na membrana. Mais de 60% da superfície examinada não tinha componentes sanguíneos presentes. A adesão de plaquetas morfolologicamente ativadas foi predominante. A fibrina também foi encontrada significativamente. Hemácias, leucócitos e coágulos foram observados, porém em quantidade não substancial. O estudo concluiu que os resultados deste indicam que há um grau de interação do sangue com o circuito de PVC e a membrana de oxigenação mesmo com a heparinização sistêmica completa. Cerca de 20% da área de superfície do circuito estava recoberta por plaquetas após cinco horas de exposição e a maioria delas tinha morfologia de plaquetas ativadas. Apesar de menos relevantes, também estiveram presentes graus avançados de trombose como a presença de trombos grosseiros e rede de fibrina.

Kim WG *et al.*⁷⁴ realizaram um estudo clínico observacional que com imagens de MEV de filtros arteriais. O estudo foi feito com 12 pacientes

submetidos a cirurgia cardíaca com CEC. A dose de heparina que foi utilizada antes da canulação foi de 300 UI/Kg. O circuito da CEC consistia em bomba de rolete (Sarns 900, Sarns 3M Healthcare) e oxigenador por membrana (Univox, Baxter Healthcare Corporation). O filtro arterial tinha tamanho de poros de 40µm (Baxter). Após o término da cirurgia os filtros arteriais foram retirados dos circuitos e preparados para análise de MEV. De cada filtro foram retiradas dez amostras, totalizando 120 amostras. Como resultado o estudo demonstrou que não foram encontradas partículas embólicas maiores que o tamanho do poro do filtro. Foram encontradas partículas de fibra de algodão, fibra sintética e cristais minerais.

Nakajima T *et al.*⁷⁵ realizaram um estudo clínico que também examinou o filtro arterial utilizado na CEC através da MEV e da microscopia eletrônica de transmissão (MET). O estudo incluiu 23 pacientes submetidos a revascularização do miocárdio com CEC. Os circuitos da CEC utilizados eram os recobertos com heparina. Para heparinização sistêmica, o grupo controle utilizou 300 UI/kg de heparina e o grupo com baixa dose de heparina utilizou 200 UI/Kg. Heparina adicional era administrada se o TCA estivesse abaixo de 400s no grupo controle e abaixo de 300s no grupo baixa dose de heparina. Como resultado, o estudo demonstrou que a contagem de plaquetas séricas foi maior no grupo que usou baixa dose de heparina ($p < 0,001$). Não houve diferença entre os grupos na reação de liberação de plaquetas, medidos pela concentração de beta-tromboglobulina e fator 4 plaquetário. Nenhum trombo macroscópico foi visualizado na superfície do filtro arterial. A MEV dos filtros dos pacientes que utilizaram baixa dose de heparina demonstrou pouca ou nenhuma aderência de células na superfície do filtro.

Já no grupo controle, a MEV evidenciou componentes fibrosos aderindo às superfícies de uma metade da malha de filtro. A MET demonstrou pela avaliação morfológica das células, que a maioria das células aderidas

ao filtro arterial eram neutrófilos. Os filtros arteriais obtidos do grupo com baixa dose de heparina tiveram menor adesão de células que os filtros do grupo controle ($p < 0,001$). O estudo concluiu que a redução da dose de heparina sistêmica utilizando circuitos revestidos com heparina reduz a perda plaquetária durante a circulação extracorpórea, mas não suprime a reação de liberação de plaquetas. A redução da dose de heparina também reduziu a adesão de neutrófilos no filtro.

3.7 Análise da expressão gênica por reação de cadeia da polimerase (PCR) em tempo real

No final da década de 90, um novo método quantitativo de diagnóstico, a reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real, passou a ser utilizado para a quantificação de vírus em humanos, como, por exemplo, hepatite B⁷⁶ e HIV⁷⁷. A simplicidade conceitual e prática, em conjunto com a combinação de velocidade, sensibilidade, e especificidade em um mesmo ensaio, tornaram a técnica de PCR em tempo real como referência para a quantificação de ácidos nucleicos⁷⁸ e uma poderosa ferramenta para quantificação da expressão gênica⁷⁹.

Na PCR em tempo real, o acúmulo de produtos da PCR é detectado e monitorado diretamente pela leitura do aumento da fluorescência do composto fluorescente utilizado, enquanto na PCR tradicional os produtos precisam ser posteriormente analisados por eletroforese.

O principal fundamento na utilização pela PCR em tempo real é o chamado limiar do ciclo, ou *threshold cycle* (Cq). O Cq é definido como o ciclo da reação de PCR no qual o sinal fluorescente do corante sinalizador atravessa uma linha arbitrária denominada limiar. Para apresentar os dados na forma de

Cq, deve-se certificar que o limiar está delimitado na fase exponencial de amplificação, acima do ruído de fundo e abaixo da fase de platô da reação de PCR. O valor numérico do Cq é inversamente proporcional à quantidade inicial do transcrito de interesse na reação, ou seja, quanto menor o valor de Cq, maior a quantidade inicial do transcrito na amostra⁷⁹. Ou seja, o método de PCR em tempo real consiste na transcrição reversa do mRNA para DNA e sua quantificação por reação em cadeia de polimerase, permitindo a identificação da expressão gênica de células no sangue, no tecido e até mesmo em material não biológico, como foi realizado neste estudo. A PCR em tempo real também permite a identificação da expressão gênica mesmo com pequena quantidade de material biológico e sua técnica de extração celular não lesa o material biológico tornando-se uma técnica sensível e específica para identificação dos genes investigados pelo presente estudo⁸⁰.

Existem dois diferentes métodos para analisar os resultados de um experimento utilizando PCR em tempo real: quantificação absoluta e quantificação relativa. Quantificação absoluta determina o número exato de cópias do transcrito de interesse, geralmente relacionando o sinal da PCR a uma curva padrão. Já a quantificação relativa descreve a alteração na expressão do gene alvo relacionado a algum grupo de referência como um controle não-tratado ou uma amostra tempo zero. Quantificação absoluta é utilizada quando se quer conhecer a quantidade de amplicons, por exemplo, na quantificação em cálculos de carga viral. O custo-benefício da quantificação absoluta é menor devido ao maior número de horas dedicadas às análises e ao maior gasto com reagentes, necessários para gerar as curvas padrão⁸¹.

No presente estudo foi realizado a PCR em tempo real relativa para avaliar a expressão gênica da glicoproteína Ib (GPIb) na plaqueta e do CD45 no leucócito. A glicoproteína Ib e o receptor CD45 foram escolhidos para identificar a plaqueta e o leucócito, respectivamente, porque os elementos são

comumente encontrados nas plaquetas (GPIb)⁸² e em todos os tipos de leucócitos (CD45)⁸³.

4 MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo

O Protocolo do estudo e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foram submetidos à Comissão Científica do Instituto do Coração (InCor) e aprovados pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), em sessão de três de dezembro de 2015, sob o nº 1.348.920 (anexo D). Um adendo ao projeto original foi submetido à Comissão Científica do Instituto do Coração (InCor) e aprovados pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), em sessão de 11 de janeiro de 2017, sob o n.º 1.888.806 e em sessão de 19 de fevereiro de 2020, sob o nº 3.848.609 (anexo E).

Foram obtidas as anuências no TCLE (anexo F) de todos os pacientes participantes do estudo ou de seus parentes mais próximos, quando os pacientes se apresentavam incapacitados para fornecê-las.

A ficha de coleta de dados foi estabelecida antes do início do estudo (anexo G). O trabalho foi registrado no *ClinicalTrials.gov* sob o identificador NCT03882593.

Foi realizado um estudo clínico, observacional e unicêntrico. O método do estudo foi feito de acordo com o *Strobe Statement*⁸⁴⁻⁸⁶.

Pacientes com indicação de cirurgia cardíaca com circulação extracorpórea foram avaliados, na noite anterior à cirurgia, quanto aos critérios de elegibilidade. Estando apto, o paciente foi convidado a participar do estudo e lhe foi entregue o TCLE, para a apreciação, além de dirimidas quaisquer dúvidas concernentes à sua participação na pesquisa.

O estudo foi realizado no Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo (InCor - HCFMUSP).

4.2 Pacientes do estudo

Para serem elegíveis ao estudo, os pacientes deveriam preencher os critérios de inclusão e exclusão abaixo:

Critérios de inclusão

- a) Indicação de cirurgia cardíaca com circulação extracorpórea;
- b) Pacientes maiores de 18 anos;
- c) Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado;

Critérios de exclusão

- a) Infecção
- b) Coagulopatia
- c) Uso de terapia antiplaquetária com até dez dias da cirurgia (exceto o ácido acetil salicílico (AAS))
- d) Recusa em participar do estudo;
- e) Cirurgia de emergência;
- f) Disfunção hepática (bilirrubina total maior que 1,5 mg/dL)
- g) Plaquetopenia (menor que 100000/mm³)
- h) Uso de anticoagulantes (exceto enoxaparina que poderia ser utilizado em doses profiláticas até 24 horas antes do procedimento cirúrgico).

4.3 Procedimento cirúrgico e admissão na unidade de terapia intensiva

A medicação pré-anestésica padronizada consistiu na administração de bromazepam 3 mg, via oral, trinta minutos antes da cirurgia. Todos os

pacientes foram monitorizados com cardioscópio contínuo de cinco derivações, oximetria de pulso, analisador de gases, sonda vesical de demora, pressão arterial invasiva em artéria radial, termômetro esofágico, cateter venoso central ou cateter de artéria pulmonar inserido pela veia jugular interna ou pela veia subclávia, quando aplicável, e ecotransesofágico, quando indicado.

A anestesia geral foi induzida com etomidato 0,2 mg/kg, midazolam 0,05 mg/kg, fentanil 3 a 5 µg/kg e pancurônio 0,1 mg/kg ou cisatracúrio 0,15 mg/kg como bloqueador neuromuscular, todos por via intravenosa. Após a intubação orotraqueal, o paciente foi mantido em assistência ventilatória mecânica com fração inspirada de oxigênio (FiO₂) entre 40 a 60%, volume corrente de 6 a 8 ml/kg, pressão positiva no final da expiração (PEEP) de 5 a 8 mmHg, em sistema circulatório valvular com absorvedor de CO₂ para manter uma saturação arterial de oxigênio acima de 94%.

A manutenção da anestesia foi realizada com a administração de isoflurano por via inalatória associado a uma mistura de oxigênio e ar comprimido; doses adicionais de midazolam, fentanil e pancurônio foram administradas conforme a necessidade para manutenção da profundidade anestésica adequada. Durante a CEC a anestesia foi mantida com a administração de midazolam, fentanil e pancurônio conforme a necessidade para manutenção da profundidade anestésica adequada.

A profilaxia antibiótica foi realizada com cefuroxima 1,5 g à indução anestésica e dose adicional de 750 mg após quatro horas do início do procedimento cirúrgico por via intravenosa. Todos os pacientes receberam terapia anti-fibrinolítica com ácido épsilon aminocaproico (IPSILON® - ácido aminocaproico 200mg/ml – Zydus Nikkho farmacêutica Ltda – Rio de Janeiro – RJ – Brasil) 100 mg/kg na indução anestésica e mantido por todo o procedimento cirúrgico, em infusão contínua cm taxa de 30 mg/kg/h.

A hidratação foi realizada com solução cristaloide de *Hartmann* (Ringer com lactato). A administração de fármacos inotrópicos e vasoativos foi guiada por parâmetros hemodinâmicos da monitorização pelo médico assistente de acordo com o protocolo específico da instituição.

A equipe de anestesistas e cirurgiões foi homogênea os quais garantiram a técnica anestésica e a técnica cirúrgica padronizadas.

A anticoagulação foi realizada com dose inicial de heparina não fracionada (HNF) (Hepamax-S[®], heparina sódica suína, 5000 UI/ml, Blau Farmacêutica S.A. – Cotia – SP – Brasil), dose de 500 UI/Kg administrada em veia central antes do início da CEC, com um tempo de coagulação ativado (TCA) (*Cascade* POC da *Helena Laboratories*, Beaumont – Texas – USA) necessariamente acima de 450 segundos. Também foram adicionadas 1000 IU de HNF na solução de preenchimento da CEC. Heparina adicional poderia ser utilizada durante a CEC para alcançar o alvo.

O circuito da CEC era formado pelos seguintes componentes: bomba centrífuga, oxigenador de membrana com trocador de calor incorporado e integrado a um reservatório venoso com filtro venoso, filtro arterial e três sistemas de aspiração integrados ao reservatório venoso.

A bomba centrífuga utilizada foi da marca Medtronic Biomedicus[®], Minneapolis, MN (anexo H).

O oxigenador de membrana adulto utilizado foi da marca Braile[®], São José do Rio Preto, SP, Brasil (anexo I e J). O oxigenador de membrana é constituído com material microporoso de polipropileno, com fluxo sanguíneo máximo de 7,0l/min, volume do prime de 390ml e área efetiva da membrana 2,2m². O oxigenador de membrana é composto por câmara de oxigenação com membrana microporosa, com um trocador de calor incorporado, constituído de capilares impermeáveis de fibra de poliéster, com área efetiva de 0,68m², temperatura máxima da água de 42°, área efetiva de 0,68m² e pressão máxima

da água de 40PSI. O produto é integralmente manufaturado com materiais poliméricos apropriados para aplicações médico-farmacêuticas e esterilizáveis em Óxido de Etileno (ETO). O oxigenador de membrana é integrado a um reservatório venoso de cardiectomia.

O reservatório venoso de cardiectomia utilizado foi o modelo adulto 4000 da marca Braile® São José do Rio Preto, SP, Brasil (anexo K). É manufaturado em policarbonato, possui válvula de segurança, escala volumétrica e filtro de poliuretano siliconizado revestido por tela de poliéster, que possibilita o rompimento de bolhas e filtração de sangue. O produto vem preparado para drenagem a vácuo. É indicado para filtração, rompimento de bolhas e armazenamento do sangue aspirado em procedimento de circulação extracorpórea. Tem fluxo sanguíneo máximo de 7l/min, volume máximo de 3700 mL, volume mínimo de 400mL, vácuo máximo de 75mmHg e filtro da cardiectomia com espessura de $150 \pm 5 \mu\text{m}$.

O filtro de sangue arterial adulto utilizado foi da marca Braile® São José do Rio Preto, SP, Brasil (anexo L). O filtro arterial é constituído de um corpo em policarbonato, com membrana filtrante de poliéster plissado de porosidade 40 μm , e uma linha de *bypass* em PVC acoplada. O fluxo sanguíneo máximo do filtro é de 6l/min, o volume do prime é de 210 mL e a área de filtração 660cm². O produto é integralmente manufaturado com materiais apropriados para aplicações médico-farmacêuticas e esterilizáveis a Óxido de Etileno (ETO). A membrana filtrante promove a retenção de partículas e microbolhas presentes no sangue, e o sentido de fluxo possibilita a retirada de macrobolhas de ar do circuito.

O perfusato do circuito da CEC foi constituído de 1500 mL de solução de Ringer com lactato, manitol a 20% na dose de 1 g/kg e 10000 IU de HNF. Durante a CEC, a temperatura corporal foi mantida entre 28 e 32 °C. Durante a hipotermia, o manuseio dos gases sanguíneos foi realizado através da

regulação "*alfa-stat*" na gasometria arterial⁸⁷. Durante a CEC, o fluxo pulsátil foi mantido entre 2 a 2,4 L/min/m² e pressão arterial média entre 50 e 80 mmHg. A proteção miocárdica foi realizada por meio de cardioplegia cristaloide anterógrada intermitente. A cardioplegia foi repetida em intervalos de 20 a 30 minutos. Ao final da CEC, a heparina total administrada foi revertida através da administração de protamina (Protamina 1000® - cloridrato de protamina 1000UI/mL – Valeant Farmacêutica - São Paulo – SP – Brasil) em uma relação de 1:1. Protamina adicional poderia ser administrada até alcançar os níveis iniciais do TCA.

Quando ocorreu sangramento significativo associado aos distúrbios da coagulação a administração de concentrado de hemácias, plaquetas, plasma e crioprecipitado seguiu o critério do protocolo institucional (anexo M).

Durante o ato cirúrgico, os níveis de glicemia foram mantidos entre 140 e 180 mg/dL e, se necessário, insulina intravenosa contínua era administrada.

Todos os pacientes foram transferidos para a UTI após o procedimento cirúrgico antes da recuperação da anestesia e sob ventilação mecânica. Os pacientes foram extubados na UTI após recuperação completa da anestesia, estando estáveis hemodinamicamente, com a temperatura controlada e gases arteriais dentro da normalidade. Os pacientes receberam alta da UTI quando preenchiam os critérios estabelecidos pelo protocolo específico da instituição.

4.4 Avaliação dos dados clínicos, demográficos, laboratoriais e coleta de dados

Um instrumento de coleta de dados foi criado para obtenção e organização das informações exigidas pelo estudo (anexo G).

Após a inclusão, foram obtidos dados clínicos e demográficos de cada paciente. Informação necessária para avaliação de gravidade foi obtida, sendo calculados os índices EuroSCORE I aditivo e logístico (calculados usando a versão online disponível no site: www.euroscore.org).

4.4.1 Dados pré-operatórios

Foram obtidos por meio de anamnese e avaliação do prontuário dos pacientes dados sobre a história clínica, antecedentes pessoais, comorbidades, medicações prévias e dados antropométricos. Exames laboratoriais coletados na admissão ou até 12 horas antes da cirurgia eram avaliados (hemoglobina, hematócrito, creatinina, tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa), tempo de protrombina (TP), INR, contagem de plaquetas, proteína C reativa e leucograma. O ecocardiograma pré-operatório foi analisado para registro da função ventricular esquerda.

4.4.2 Dados intraoperatórios

Foram coletados os seguintes exames de rotina do intraoperatório, sendo:

- após indução da anestesia: hemoglobina, hematócrito, gasometria arterial e venosa, cálcio iônico, lactato sérico e tempo de coagulação ativado (TCA).

- após administração de protamina e revisão de hemostasia: hemoglobina, hematócrito, gasometria arterial, cálcio iônico, lactato sérico e TCA.

Para avaliação da coagulação durante a CEC foram coletados os exames do circuito da CEC dez minutos após o início da CEC e ao final da CEC (figura 1). Os exames coletados foram os seguintes:

1. TCA;
2. Fibrinogênio;
3. Dímero-D;
4. Contagem de plaquetas
5. Agregação plaquetária com adrenalina;
6. Agregação plaquetária com ADP;
7. Tromboelastograma : *ReoRox®* , exame Hepscreen 2
8. Leucograma;
9. Proteína C reativa;
10. PCR em tempo real da expressão gênica de Glicoproteína Ib (plaquetas) e CD45 (leucócitos) no sangue total.

CEC, circulação extracorpórea; POI, pós-operatório imediato; PO, pós-operatório; Hb, hemoglobina; Ht, hematócrito; INR, razão normatizada internacional; TP, tempo de protrombina; TTPA, tempo de tromboplastina parcial ativado; TCA, tempo de coagulação ativado.

Figura 1 - Fluxograma da coleta dos exames do estudo

Além dos exames laboratoriais, foram registrados os seguintes dados clínicos: procedimento cirúrgico realizado, tempo de anestesia, tempo de cirurgia, tempo de CEC e de anóxia cardíaca, dose total de heparina, dose total de protamina, TCA, diurese, temperatura esofágica, balanços hídrico e sanguíneo, utilização de fármacos inotrópicos e vasoativos, infusão de líquidos, terapia hemostática e transfusão sanguínea.

Eventos clinicamente significativos tais como sangramento e instabilidade hemodinâmica importante também foram coletados.

4.4.3 Dados pós-operatórios

Foram coletados os exames de rotina na admissão da UTI e no 1ºPO, sendo:

- admissão UTI: hemoglobina, hematócrito, gasometria arterial e venosa, cálcio iônico, lactato sérico, TP, TTPA, INR, contagem de plaquetas, leucograma e proteína C reativa.
- 1º PO: hemoglobina, hematócrito, gasometria arterial e venosa, cálcio iônico, lactato sérico, TP, TTPA, INR, contagem de plaquetas, leucograma, proteína C reativa e creatinina.

Foram anotados o débito sanguíneo dos drenos cirúrgicos, balanço hídrico e sanguíneo, transfusão sanguínea e terapia hemostática do pós-operatório imediato e 24h após a admissão na UTI.

Durante o período de internação hospitalar, foram registrados dados sobre transfusão de hemácias, medicações administradas, tempo de ventilação mecânica, tempo de internação em UTI e hospitalar, infecção, complicação neurológica (AVC e delirium) ou cardiovascular (IAM) e necessidade de diálise e/ou intervenção cirúrgica, ocorrência de complicações clínicas e óbito.

4.5 Descrição dos exames do estudo da coagulação sanguínea analisados

4.5.1 Testes padrão da coagulação sanguínea

Fibrinogênio: determinação quantitativa do fibrinogênio no plasma citratado por método Clauss. Valor de referência: 200 a 393 mg/dL.

Dímero-D: realizado por metodologia em Látex imunoenzimático. Os resultados de dímero-D foram expressos em ng/mL. Valor de referência até 500 ng/mL.

4.5.2 Testes especiais da coagulação sanguínea

Tempo de Coagulação Ativado (TCA): utilizou-se o aparelho de modelo *Cascade POC* da *Helena Laboratories* (Beaumont – Texas – USA). Valores de referência: 80-120 segundos.

Agregação Plaquetária por transmitância de Luz: Avalia a função plaquetária *in vitro* por sistema óptico ou turbidimétrico. As amostras foram coletadas em tubo com citrato de sódio 3,2% e centrifugadas por quatro a seis minutos, em 1000 a 1500 rpm para obtenção de plasma rico em plaquetas (PRP). O equipamento *AggRAM* (*Helena Laboratories*) detecta a transmissão luminosa através do plasma citratado rico em plaquetas em suspensão. À medida que as plaquetas se agregam por adição de um agente agregante (Adenosina 5-difosfato e Adrenalina), ocorre diminuição da turbidez e um aumento proporcional da transmissão de luz detectado por uma célula fotoelétrica e registrado sob curva de agregação plaquetária.

Os resultados foram expressos em amplitude máxima de agregação (valores normais amplitude maior que 70%) ou qualitativamente (normoagregante, hipoagregante ou hiperagregante). O teste foi realizado dentro de quatro horas após a coleta das amostras em temperatura ambiente.

Tromboelastografia: foi realizada pela reometria de oscilação livre (FOR) (*ReoRox G2 Medirox AB*, Sverige) (anexo A), que é um teste viscoelástico da coagulação com sangue total, o qual utiliza uma metodologia de análise da coagulação livre de qualquer força externa enquanto ocorre a

formação do coágulo. A amostra é colocada em oscilação livre e as alterações no movimento oscilatório são calculadas em parâmetros viscoelásticos. O tempo de formação do coágulo e as mudanças na elasticidade do coágulo são medidas e registradas num gráfico em curva⁶⁸. No presente estudo foi utilizado o reagente Hepscreen2 que contém reagente neutralizador da heparina para estudar a coagulação sanguínea dos pacientes durante a CEC. Os parâmetros medidos pelo *ReoRox®* Hepscreen2 estão descritos no quadro abaixo (quadro 1):

Quadro 1 - Parâmetros mensurados pelo *ReoRox®* Hepscreen2

Parâmetro	Sigla	Valor de referência
Tempo de Coagulação	COT1	24 a 54 segundos
Tempo de formação do coágulo	COT2	61 a 139 segundos
Cinética de formação do coágulo	<i>SLOPE</i>	34 a 206 Pa/min
Máxima firmeza do coágulo	GMAX	1039 a 2825 Pa
Firmeza do coágulo em 10 minutos	EAT	700-1600 Pa
Retração do coágulo	<i>CLOT SR</i>	<7,5%

4.5.3 Exames Hematológicos

O sangue total foi coletado em tubo com anticoagulante EDTA e processado em equipamento automatizado *Sysmex XE 2100* (*Sysmex America, Inc, Mundelein, IL*), baseado na medição da impedância elétrica.

Contagem de plaquetas: valor de referência de 150000 a 450000/mm³.

Volume plaquetário médio (VPM): marcador da ativação plaquetária que reflete a reatividade e o tamanho das plaquetas. Valor de referência de 6,5 a 12 fl.

PCR em tempo real da expressão gênica da GPIb na plaqueta e do CD45 em leucócito no sangue total: a extração de RNA foi realizada através da adição de 1 ml de Trizol (*Life Technologies*) ao sangue total coletado em EDTA. Após homogeneização foram adicionados 200 µL de clorofórmio (*Merck*) e mantidos em temperatura ambiente por dez minutos. A amostra foi centrifugada a 13000 rpm por 15 minutos a 4 °C. À fase aquosa foram acrescentados 500 µL de isopropanol (*Sigma*), seguido de centrifugação a 13000 rpm por 15 minutos a 4 °C. O precipitado obtido foi lavado com etanol 75% e dissolvido em água tratada com dietil pirocarbonato (*DEPC – Life Technologies*).

A quantificação do RNA total foi realizada por espectrofotômetro (*Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA*) nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. O grau de pureza das amostras foi verificado através da análise da relação das absorbâncias 260 e 280nm. Foram utilizadas amostras com razão 260/280 maiores que 1,7, o que é indicativo de baixa contaminação proteica. A integridade do RNA foi vista após eletroforese em gel de agarose 1%, na qual todas as amostras apresentaram as bandas de RNA ribossômico 28S e 18S preservadas.

Para eliminar possíveis contaminações com DNA, as amostras de RNA foram submetidas ao tratamento com a enzima DNase I, e em seguida, foi realizada a transcrição reversa. O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado partindo de 1 µg de RNA total, utilizando-se o *kit Superscript II Transcriptase Reverse (Life Technologies)* de acordo com as recomendações do fabricante.

As reações de PCR em tempo real foram realizadas no equipamento CFX 96 (*Bio-Rad, Richmond, CA, EUA*) utilizando-se o sistema *TaqMan* inventoriado para o gene da glicoproteína Ib (Hs01887764_s1, *Life Technologies*) e CD45 (Hs04189704_m1, *Life Technologies*). Para o preparo da reação foram utilizados 5 µL do *Universal Master Mix* (*Life Technologies*) com 2,5 µL de cDNA diluído 1/2 e 0,5 µL da mistura de *primers* e sonda (20x).

A reação de PCR em tempo real foi realizada de acordo com o seguinte protocolo: ativação enzimática por 2 minutos a 50 °C, desnaturação inicial de dez minutos a 95 °C, seguida por quarenta ciclos de desnaturação de 15s a 95°C; intervalos de 20s de “*annealing*” a 60 °C. As reações foram conduzidas em triplicata e o número de cópias transcritas do gene foi determinado com base nos valores de Cq (“*quantitative cycle*”). Para os cálculos, o valor de Cq do gene normalizador (GAPDH Rn01775763_g1, *Life Technologies*), foi subtraído do gene alvo (ΔCq).

Os critérios de validação interna das reações de RT-PCR foram:

- I) controles negativos (mix dos *primers* e *Taqman*) sem amplificação;
- II) curva de amplificação com padrão exponencial e platô;
- III) ocorrência de amplificação do gene de interesse com Cq de até 35;
- IV) diferença aceitável entre os Cqs das triplicatas $<0,4$.

4.6 Retirada e preparo do filtro arterial para microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Após o paciente ter sido encaminhado para UTI, foi retirado o filtro arterial do circuito da CEC para preparo e análise pela MEV com o seguinte método:

Após a drenagem do sangue presente no circuito da CEC, o filtro arterial foi retirado e realizava-se duas lavagens com 500 mL de soro fisiológico 0.9% gelado de modo a se retirar o excesso de sangue presente. O filtro foi encaminhado imediatamente para as instalações do Departamento de Mecânica da Divisão de Bioengenharia.

Dentro de uma capela de exaustão e com auxílio de uma pinça forte, a mangueira de saída do filtro foi bloqueada e foram adicionados 150 mL de paraformaldeído 4% (PFA) a 25 °C, durante 15 minutos por meio da mangueira de entrada do filtro e um funil de vidro. Transcorrido o tempo de fixação, o PFA foi retirado do filtro abrindo-se a pinça forte posicionada na mangueira de saída.

A abertura do filtro arterial foi realizada com auxílio de um torno IMOR P-400 II. Após o filtro ser posicionado e preso na placa do torno pelo lado da entrada do filtro a abertura foi realizada pelo lado oposto do filtro e feita de forma manual com um bedame de aço rápido com espessura de 2,5 mm. O filtro é composto por uma tela que recobre uma membrana filtrante (40 µm).

Em seguida à abertura do filtro, foi levado novamente para dentro da capela de exaustão para que a tela e a membrana filtrante fossem retiradas e visualizadas no microscópio eletrônico de varredura. Com auxílio de bisturi, pinça e tesoura, das amostras da tela e da membrana foram retirados fragmentos medindo 5,6 mm de diâmetro a cada dobra do filtro arterial; no total eram retirados dez fragmentos de cada filtro (figura 2).

Figura 2 - Método de abertura e retirada do filtro arterial para análise

As amostras obtidas foram colocadas dentro de uma câmara de fluxo laminar para evaporação do PFA residual e secagem. Com as amostras fixadas e secas, as imagens de MEV foram obtidas com microscópio *HITACHI TM 3000* com voltagem de aceleração 5000 volts e corrente de filamento 1750 mA, em diversas magnificações (figura 3).

Também foi realizada abertura e preparo para MEV de um filtro arterial controle novo e não utilizado.

Figura 3 - Análise da MEV microscópio *HITACHI* TM 3000 de amostras fixadas e secas do filtro arterial

4.7 Análise da adesão do sangue no filtro arterial do circuito da CEC

4.7.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Após o preparo do filtro arterial, foram obtidas dez amostras retiradas da membrana filtrante de local pré-estabelecido. O tamanho de cada amostra foi de 5,6mm diâmetro.

De cada amostra foram obtidas quatro imagens, por meio de MEV, utilizando o microscópio *HITACHI* TM 3000 (figura 4), sendo:

- 1) aumento de 30x; vista panorâmica; área total da amostra = 25 mm²;
- 2) imagem com área representativa da imagem acima = 15 mm²;
- 3) aumento de 400x;
- 4) aumentos de até 1000x de acordo com os achados para ilustração.

Destas imagens de MEV foram realizadas as seguintes análises (figura 4):

1) Contagem de campos obstruídos dos filtros: para análise de microscopia eletrônica de varredura quantitativa de adesividade do sangue no filtro arterial do circuito da CEC, de três imagens de MEV com aumento de 30x de cada filtro arterial;

2) Análise qualitativa do filtro: de microscopia eletrônica de varredura qualitativa e ilustrativa de adesividade celular no filtro arterial do circuito da CEC, de uma imagem com aumento de 400x.

Figura 4 - Fluxograma do método da análise do filtro arterial do circuito de CEC

4.7.2 Avaliação da expressão gênica da glicoproteína Ib (plaquetas) e CD45 (leucócitos) em material extraído do filtro arterial

Através de amostra de dez fragmentos medindo 5,6 mm de diâmetro retirados de locais pré-estabelecidos do filtro arterial de cada paciente, que foram enviados para laboratório de análises clínicas, foi extraído material desses fragmentos do filtro e para realização de avaliação dos níveis de expressão gênica da glicoproteína Ib (plaquetas) e CD45 (leucócitos).

4.8 Descrição dos exames do perfil da coagulação do filtro arterial

4.8.1 Microscopia eletrônica de varredura: Contagem dos campos obstruídos dos filtros

Foram registradas imagens de MEV (*HITACHI* TM 3000) de três fragmentos de regiões pré-determinadas de cada filtro para cada paciente. As imagens foram contadas em *power point*. Cada figura com aumento de 30x foi dividida em quatro partes. Para cada parte foi determinada uma área padronizada (18cm altura x 19cm largura) e esta foi dividida em mais quatro partes. A partir desta divisão foi realizada a contagem dos elementos.

Foram contados os espaços preenchidos (campos obstruídos) e somados o total final de cada filtro. O número é dado em percentagem de campos obstruídos (figura 5).

Figura 5 - Método esquemático de contagem de campos dos filtros

4.8.2 Microscopia eletrônica de varredura: Análise qualitativa do filtro

Foram avaliadas a adesividade celular no filtro arterial do circuito da CEC de uma amostra com aumento de 400x. Neste aumento somente foi avaliado se havia adesividade de elementos do sangue ou outro material. Não houve quantificação do grau de adesividade. A amostra de 400x foi somente ilustrativa para o estudo.

4.8.3 PCR em tempo real da expressão gênica da glicoproteína Ib (plaquetas) e CD45 (leucócitos) de fragmentos do filtro arterial

A extração de RNA foi realizada através da adição de 1 ml de Trizol (*Life Technologies*) em dez fragmentos extraídos randomicamente de toda a extensão do filtro arterial. Após homogeneização o procedimento de extração de mRNA, transcrição para DNA complementar e quantificação por PCR em tempo real foi o mesmo utilizado para sangue total.

4.9 Definição dos desfechos

Desfecho primário

- Avaliação da adesividade de células sanguíneas no filtro arterial do circuito de CEC.

Desfechos secundários

- Correlação da adesividade das células sanguíneas no filtro arterial com as alterações dos exames de coagulação sanguínea coletados no início e no final da CEC;
- Alterações dos exames de coagulação sanguínea coletados no início e no final da CEC;
- Alterações dos exames da inflamação sanguínea coletados no início e no final da CEC;

Outros Desfechos

- Sangramento cirúrgico mensurado pelo volume dos drenos em 48h;
- Transfusão de hemocomponentes em 48h;
- Reoperação por sangramento em 48h;
- Acidente Vascular Cerebral (AVC);
- Delirium;
- Infarto Agudo do Miocárdio (IAM);
- Infecção;
- Insuficiência renal;
- Trombose;
- Tempo de ventilação mecânica;
- Tempo de UTI;
- Tempo de internação hospitalar;
- Mortalidade em 30 dias.

4.10 Definição das complicações clínicas e desfechos

Sangramento

Foi definido como clinicamente significativo quando as perdas sanguíneas excediam 100 a 300 mL/h, após admissão na UTI⁸⁸. A reoperação era indicada caso houvesse sangramento de 500 mL na primeira hora de admissão; 300 mL por duas horas consecutivas ou quando a perda sanguínea fosse maior que 1L nas primeiras oito horas de pós-operatório⁸⁹.

Insuficiência renal aguda (IRA)

Definida através da classificação de *AKIN (Acute Kidney Injury Network)*, que caracteriza a lesão renal aguda como uma redução abrupta (em 48 horas) na função renal, caracterizada por elevação absoluta da creatinina maior ou igual a 0,3 mg/dL ($\geq 26,4 \mu\text{mol/L}$); aumento percentual da creatinina maior ou igual a 50% (1,5 vezes a creatinina basal); ou redução do débito urinário para menor que 0,5 ml/kg/h por seis horas ou mais⁹⁰. A necessidade de diálise foi baseada em indicação clínica e avaliação laboratorial diária.

Infarto agudo do miocárdio (IAM)

Foi considerado quando houve elevação de enzimas cardíacas (CKMB 10 vezes superior ao valor de referência e/ou troponina 1 a 5 vezes superior ao valor de referência, durante as primeiras 48 horas após a cirurgia, associado a um dos seguintes critérios: aparecimento de nova onda Q patológica, oclusão arterial coronariana nova documentada angiograficamente, ou evidência de deficit segmentar novo⁹¹.

Infecção

Infeções novas, sepse e choque séptico. Pneumonia foi diagnosticada se estivesse presente infiltrado pulmonar novo, persistente, ou progressivo à radiografia de tórax associado a, pelo menos, dois dos seguintes critérios: temperatura maior ou igual a 38°C; contagem de leucócitos maior que 12000 células/mm³ ou menor que 3000 células/mm³; ou secreção endotraqueal purulenta. A infecção de corrente sanguínea foi definida por isolamento do mesmo microorganismo em hemocultura periférica e na cultura de ponta do cateter removido. Infecção de ferida operatória definida pela presença de hiperemia e secreção purulenta local, associada ou não à infecção sistêmica⁹².

Choque séptico

Pacientes que apresentam critérios da síndrome da resposta inflamatória sistêmica, apresentando um foco infeccioso suspeito ou confirmado, associado à hipotensão refratária com necessidade de fármaco vasopressor⁹³.

Mortalidade

Óbito durante a internação da cirurgia ou óbito ocorrido após a alta hospitalar até 30 dias após o procedimento, exceto se a causa da morte não fosse claramente relacionada à cirurgia.

4.11 Análise estatística

Inicialmente foi realizada a caracterização da amostra, onde as variáveis categóricas foram descritas em valor absoluto e frequência relativa enquanto as variáveis contínuas foram descritas com medidas de tendência central e dispersão ou posição.

O método de *Spearman* foi empregado para testar correlações entre as variáveis da coagulação sanguínea estudadas.

Para testar a influência do filtro sobre as variáveis da coagulação foram realizadas comparações pareadas segundo o teste não-paramétrico de *Wilcoxon*, e em seguida, foi computada uma nova variável (delta) que expressa o valor do marcador no final da CEC, subtraído do valor medido no início da CEC. O método de *Spearman* também foi aplicado para testar correlações entre as variáveis delta⁹⁴⁻⁹⁷.

Para assegurar a reprodutibilidade das análises executadas, todos os códigos utilizados foram armazenados eletronicamente e poderão ser disponibilizados.

Foram considerados achados estatisticamente significativos, aqueles com valor p ou probabilidade de erro tipo I inferior a 5%.

As análises foram realizadas com auxílio do pacote estatístico SPSS (*Statistical Package for Social Science*) versão 21.0.

5 RESULTADOS

5.1 Pacientes

Foram incluídos no estudo 28 pacientes submetidos a cirurgia cardíaca com circulação extracorpórea no Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (InCor - HCFMUSP).

A amostra estudada foi predominantemente masculina (53,6%), com idade média de $55,4 \pm 12,2$ anos, sendo 12 pacientes (42,9%) com idade igual ou superior a 60 anos. A maior parte dos pacientes (82,1%) declararam-se como de cor branca. A valvopatia (75%) foi a comorbidade mais frequente da amostra, seguido pela hipertensão arterial (57,1%), dislipidemia (35,7%), insuficiência coronariana (25%), diabetes mellitus (21,4%) e fibrilação atrial (21,4%).

A fração de ejeção média na amostra foi de $62,1 \pm 8,7\%$ e apenas quatro pacientes apresentavam fração de ejeção inferior a 55%. Não obstante, pouco mais da metade da amostra (57,1%) apresentava classe funcional III ou IV, segundo critérios da NYHA. O uso regular de medicamentos de ação cardiovascular foi bastante frequente na amostra.

Seis pacientes estavam em uso de AAS. Um paciente fazia uso domiciliar de clopidogrel e sete pacientes de varfarina. Esses pacientes descontinuaram estas medicações conforme protocolo institucional pré-operatório (tabela 1).

Tabela 1 - Características demográficas e clínicas dos pacientes do estudo

Variável	N=28	%
Idade (anos), média e DP	55,4 ±12,2	
Sexo (Masculino)	15	53,6
Raça (Branco)	23	82,1
Peso (kg) , média e DP	69,6 ±12,6	
IMC (kg/m ²), média e DP	25,9 ±3,8	
FEVE(%), média e DP	62,1 ±8,7	
NYHA		
I-II	12	42,8
III-IV	16	57,1
Comorbidades		
Valvopatia	21	75,0
Hipertensão arterial	16	57,1
Dislipidemia	10	35,7
Insuficiência coronariana	7	25%
Diabetes mellitus	6	21,4
Fibrilação atrial	6	21,4
Obesidade (IMC ≥30 kg/m ²)	5	17,8
Hipertensão Pulmonar	5	17,8
IAM prévio	4	14,3
Insuficiência Renal	4	14,3
AVC prévio	4	14,3
DPOC	2	7,1
Hepatopatia	1	3,5
Hipotireoidismo	1	3,5
Medicações		
Varfarina	6	21,4
Enoxaparina	1	3,6
AAS	6	21,4
Clopidogrel	1	3,6

DP, desvio-padrão; IMC, índice de massa corpórea; FEVE, fração de ejeção do ventrículo esquerdo; NYHA, *New York Heart Association*; IAM, infarto agudo do miocárdio; AVC, acidente vascular cerebral; DPOC, doença pulmonar obstrutiva crônica; AAS, ácido acetil salicílico.

Os procedimentos para correção de lesões valvares foram os mais frequentes, representando 67,8% da amostra estudada. Desses, 11 procedimentos se deram para correção de doenças na valva mitral, outros seis procedimentos foram para correção de doenças da válvula aórtica e houve três procedimentos combinados envolvendo tratamento cirúrgico da valva mitral e da valva aórtica. Cinco pacientes (25,6%) eram casos de reoperação, ou seja, tinham cirurgia cardíaca prévia. O escore de risco cirúrgico (Euroscore) mediano dos pacientes foi de três pontos (1-5) (tabela 2).

No intraoperatório, a mediana do TCA após a heparina antes do início da CEC foi de 623 s (IQR 387 - 850s). Um paciente teve TCA menor que 450s após a administração de heparina e recebeu 5000 UI de heparina adicional antes do início da CEC. No início da CEC, a mediana do TCA foi de 629s (IQR 524-702 s). No final da CEC, a mediana do TCA foi de 582s (IQR 517,2-672 s). O TCA retornou aos valores iniciais após a administração da protamina.

Na mediana os pacientes receberam 20 g de Ypsilon® (IQR 20,0-24,0 g) e tiveram um balanço sanguíneo mediano negativo de 330 ml. O tempo mediano de CEC foi de 97 minutos e de pinçamento aórtico de 72 minutos (tabela 2).

Receberam transfusão sanguínea intraoperatória 39% dos pacientes. Sete pacientes (25%) receberam concentrado de hemácias, cinco pacientes (17,8%) receberam plaquetas, três pacientes (10,7%) receberam plasma fresco e nenhum paciente recebeu crioprecipitado (tabela 2).

Tabela 2 - Características intraoperatórias dos pacientes do estudo

Variável	N=28
Tipo de cirurgia, n (%)	
RM	5 (17,9)
Tratamento cirúrgico da valva (aórtica ou mitral)	17 (60,7)
Tratamento cirúrgico valva aórtica+mitral	3 (10,7)
RM + tratamento cirúrgico valva aórtica	2 (7,1)
Exérese de tumor cardíaco	1 (3,6)
Cirurgia cardíaca prévia, n (%)	5 (25,6)
EuroScore, mediana (IQR)	3 (1 – 5)
Cirurgia, mediana (IQR)	
Tempo de anestesia (min)	420,0 (360,0 – 490,0)
Tempo de cirurgia (min)	290,0 (250,0 – 330,0)
Tempo de CEC (min)	97,0 (76,0 – 115,0)
Tempo de pinçamento (min)	72,0 (50,0 – 85,0)
Hemostasia, mediana (IQR)	
TCA inicial (s) ⁺⁺	113,5 (70,0 – 110,0)
TCA após heparina (s) ⁺	623,0 (387,0 – 850,0)
TCA CEC início CEC (s) ⁺⁺	629,0 (524,0 – 702,5)
TCA CEC final CEC (s) ⁺⁺⁺	582,0 (517,2 – 672,0)
TCA após protamina (s) ⁺⁺	111,0 (70,0 – 168,0)
Dose heparina (UI)	35,000 (25,000 – 50,000)
Dose protamina (UI)	45,000 (25,000 – 60,000)
Ypsilon (g)	20,0 (20,0 – 24,0)
Balanco sanguíneo (mL)	(330,0) ((630,0) – 320,0)

Tabela 2 - Características intraoperatórias dos pacientes do estudo (continuação)

Variável	N=28
Peso das compressas (g)	254,0 (100,0 – 640,0)
Reposição volêmica, mediana (IQR)	
Cristalóide (mL) ⁺	2 450 (1 000,0 – 5 518,0)
Transfusão, mediana (IQR)	
Concentrado de hemácias (u)	0 (0 – 3)
Concentrado de plaquetas (pool)	0 (0 – 2)
Plasma (u)	0 (0 – 2)
Crioprecipitado (u)	----

CEC , circulação extracorpórea; IQR , intervalo interquartilico; () = Valores negativos.

⁺ Valores ausentes n=1 (3,7%) ; ⁺⁺Valores ausentes n=3 (11,1%); ⁺⁺⁺Valores ausentes n=12 (42,8%)

Durante a circulação extracorpórea não foi observada a formação de nenhum trombo macroscópico no circuito de CEC. Também não foram observados trombos macroscópios no filtro arterial após o procedimento de lavagem com soro fisiológico 0,9% no centro cirúrgico.

5.2 Análise do filtro arterial

No laboratório de Bioengenharia, na avaliação macroscópica das membranas, já fixadas com formaldeído, observou-se que todas as membranas dos filtros apresentavam algum grau de aderência de material oriundo da CEC (figura 6).

Amostra pós fixação com solução de formaldeído 4% a 25 °C. Imagem da macroscopia evidenciando sinais de aderência de materiais (placas brancas) no filtro durante a CEC.

Figura 6 - Avaliação macroscópica da membrana de poliéster do filtro arterial

A MEV revelou adesão de elementos sanguíneos na membrana do filtro arterial (figura 7 e 8). Foram realizadas imagens de MEV com diversos aumentos para caráter ilustrativo do estudo (figura 9). Também foi realizada MEV em fragmentos da membrana de poliéster de um filtro arterial controle (figura 10).

Todavia, não foi possível identificar quais elementos do sangue estavam presentes na membrana somente com as imagens da MEV. Para se identificar quais tipos celulares estavam aderidos à membrana foi realizada PCR em tempo real.

Filtro nº 11 utilizado na CEC de paciente submetido a troca de valva mitral com tempo de CEC de 76 minutos. A: aumento 30x; B: aumento 400x.

Figura 7 - Exemplo 1 da MEV de fragmento do filtro arterial

Filtro nº23 utilizado na CEC de paciente submetido a troca de valva aórtica com tempo de CEC de 109 minutos. A: aumento 30x; B: aumento 400x.

Figura 8 - Exemplo 2 da MEV de fragmento do filtro arterial

Filtro arterial número 7 utilizado na CEC de paciente submetido a reoperação de troca de valva mitral com tempo de CEC de 102 minutos. A: aumento 200x, B: aumento 400x, C: aumento 800x.

Figura 9 – Exemplo 3 ilustrativo de MEV de fragmento do filtro arterial

A: aumento 300x; B: aumento 1000x

Figura 10 - MEV de um filtro arterial novo de controle

A análise por PCR em tempo real da expressão gênica da GPIb da plaqueta no filtro (GPI $\Delta\Delta Cq_{\text{filtro}}$), ou seja, “adesão no filtro da plaqueta

nucleada” foi positiva em todos os filtros estudados (n=13). A “adesão no filtro da plaqueta nucleada” - GPI $\Delta\Delta\text{Cq}_{\text{filtro}}$, não esteve correlacionada com a variação delta de nenhuma das variáveis estudadas.

A análise da expressão gênica do CD45 em leucócitos no filtro arterial (CD45 $\Delta\Delta\text{Cq}_{\text{filtro}}$) foi positiva no filtro em dois casos (n=2) entre os 13 filtros analisados.

A distribuição dos valores da contagem de campos obstruídos no filtro da CEC apresentou um valor mediano de 3,4% (IQR 1,9 – 8,2). A figura 11 exemplifica o método de contagem de campos obstruídos dos filtros da amostra de um paciente.

A: MEV aumento 30x dividido em 4 campos de análise - fragmento filtro arterial nº 22; B: Análise de contagem de campos obstruídos de fragmento do filtro arterial nº 22 por material originado da CEC dividido em 4 campos detalhados – Total de campos obstruídos= 4,2% da amostra.

Figura 11 - Método de contagem de campos obstruídos de amostra do filtro arterial por material originado da CEC

A expressão gênica da GPIb nas plaquetas aderidas no filtro da CEC, em mediana, 0,138 (0,074 – 0,224) (gráfico 1).

Gráfico 1 - Representação em *boxplot* da expressão gênica da GPIb nas plaquetas no filtro arterial e da contagem de campos obstruídos nos filtros arteriais utilizados durante a CEC nos pacientes do estudo

GPI $\Delta\Delta Cq_{\text{filtro}}$, expressão gênica da GPIb da plaqueta nos filtros arteriais; IQR, intervalo interquartil.

A mediana da expressão gênica da GPIb nas plaquetas (GPI $\Delta\Delta Cq$) medida no sangue no início da CEC foi 0,0195 (0,011 – 0,032) e de 0,0090 (0,006 – 0,019) no final da CEC (*Wilcoxon*; $p = 0,019$) (gráfico 2).

Gráfico 2 - Representação em *boxplot* das medidas de expressão gênica de GPIb em plaquetas no sangue total no início e final da CEC

GPI $\Delta\Delta Cq$, expressão gênica das plaquetas no sangue; CEC, circulação extracorpórea; IQR, intervalo interquartilico

A expressão gênica do CD45 em leucócitos manteve-se estável com valor mediano de 0,4825 (0,3172 – 3,686) no início da CEC e de 0,4845 (0,2802 – 3,810) (*Wilcoxon*; $p = 0,642$) no final da CEC (gráfico 3).

Gráfico 3 - Representação em *boxplot* das medidas de expressão gênica do CD45 em leucócitos no sangue total no início e final da CEC

PTP $\Delta\Delta Cq$, expressão gênica do CD45 em leucócitos no sangue; CEC, circulação extracorpórea; IQR, intervalo interquartilico.

A expressão gênica da GPIb nas plaquetas no sangue, medida no final da CEC, esteve significativamente correlacionada com a variável *Clot SR* no final da CEC ($r\hat{o} = -0,635$; $P = 0,027$) (gráfico 4).

Gráfico 4 - Dispersão em dois eixos da expressão gênica da GPIb nas plaquetas medida no sangue no final da CEC e a variável *Clot SR* no final da CEC

GPI ΔΔCq, expressão gênica das plaquetas no sangue; *Clot SR*, retração do coágulo.

A variação delta, do final para o início da CEC, da expressão gênica da GPIb na plaqueta no sangue total não se correlacionou com a expressão gênica desta variável medida no filtro de CEC (“adesão no filtro” - GPI $\Delta\Delta Cq_{\text{filtro}}$) ($r\hat{o} = 0,376$; $p = 0,254$). No entanto, o tempo de CEC esteve diretamente correlacionado com a variação delta da expressão gênica da GPIb nas plaquetas medidas no sangue ($r\hat{o} = 0,492$; $p = 0,053$), embora com significância estatística marginal (tabela 3 e gráfico 5).

Vale ressaltar que as variações delta dessas variáveis não tiveram correlação estatisticamente significativa com repercussões clínicas como o peso das compressas intraoperatórias e o sangramento total em 48 horas.

Gráfico 5 - Dispersão em dois eixos da variação delta da expressão gênica da GPIb nas plaquetas no sangue total e o tempo de CEC

Δ GPI $\Delta\Delta Cq$, variação delta da expressão gênica da GPIb nas plaquetas no sangue; CEC, circulação extracorpórea.

Não foi possível observar correlações significativas entre a contagem de campos obstruídos no filtro da CEC e: a variação delta da expressão gênica da GPIb nas plaquetas (GPI) ($rô = 0,082$; $p = 0,781$); a expressão gênica da GPIb nas plaquetas no filtro da CEC ($rô = 0,278$; $p = 0,408$) e a variação delta da expressão gênica do CD45 em leucócitos ($rô = 0,106$; $p = 0,719$).

Tabela 3 - Coeficientes de correlação (*Spearman*) entre a variação delta de diferentes variáveis laboratoriais e a contagem de campos obstruídos no filtro e o tempo de CEC

Variável	Exames laboratoriais sanguíneos		Filtro		Tempo de CEC
	$\Delta CD45\Delta\Delta Cq$	$\Delta GPI\Delta\Delta Cq$	$GPI\Delta\Delta Cq$	Campos	
Campos Filtros (n=14)	0,106	0,082	0,278	1,00	(0,128)
Tempo de CEC (n=16)	(0,208)	0,492 [#]	0,107	(0,128)	1,00

CEC, circulação extracorpórea; $\Delta CD45\Delta\Delta Cq$, variação delta expressão gênica do CD45 em leucócitos, $\Delta GPI\Delta\Delta Cq$, variação delta da expressão gênica da GPIb nas plaquetas.

() = Valores negativos # $p < 0,10$ * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$

A despeito do que foi observado para a variação delta das outras variáveis da coagulação, a variação delta dímero-D esteve diretamente correlacionada com a contagem de campos obstruídos no filtro de CEC ($rô = 0,828$; $p < 0,001$) (gráfico 6 e tabela 4).

Gráfico 6 - Dispersão em dois eixos da variação delta dímero-D e a contagem de campos obstruídos dos filtros arteriais

Neste sentido, foi observado ainda que a variação delta do PCR também esteve correlacionada com a contagem de campos obstruídos no filtro da CEC ($r = 0,570$; $p < 0,05$). O tempo de CEC também se correlacionou significativamente com a variação delta do hematócrito (tabela 4).

Tabela 4 - Coeficientes de correlação (*Spearman*) entre a variação delta de diferentes variáveis laboratoriais e a contagem de campos obstruídos no filtro e o tempo de CEC

Variável	Δ Fibrinogênio	Δ dímero-D	Δ plaquetas	Δ Ht	Δ Leuco	Δ Proteína C reativa
Campos Filtro (n=14)	0,181	0,828**	0,385	(0,164)	(0,042)	0,570*
Tempo de CEC (n=27)	0,148	0,096	0,161	0,440*	0,099	(0,321)

Δ , variação delta; Ht, hematócrito; Leuco, leucócitos; CEC, circulação extracorpórea.

() = Valores negativos # p<0,10 * p < 0,05 **p<0,01

A Tabela 5 apresenta os coeficientes de correlação entre a variação delta de diferentes variáveis da coagulação e a contagem de campos obstruídos no filtro, bem como o tempo de CEC. Porém, de maneira geral, não foi possível observar correlações significativas entre estas variáveis.

Tabela 5- Coeficientes de correlação (*Spearman*) entre a variação delta de diferentes variáveis da coagulação e a contagem de campos obstruídos no filtro e o tempo de CEC

Variável	Δ COT1	Δ COT2	Δ Slope	Δ MCF-GMAX	Δ EAT	Δ Clot SR
Campos Filtro	(0,110)	(0,072)	(0,134)	0,529	(0,042)	(0,321)
Tempo de CEC	0,269	(0,058)	0,094	(0,135)	0,103	0,289

COT1, tempo de coagulação; COT2, tempo de formação do coágulo; Slope, cinética de formação do coágulo; GMAX, máxima firmeza do coágulo; EAT, firmeza do coágulo ; CLOT SR, retração do coágulo.

() = Valores negativos # p<0,10 * p < 0,05 ** p<0,01

5.3 Análise dos exames laboratoriais

O gráfico 7 ilustra a avaliação laboratorial segundo o comportamento das variáveis nos momentos: (1) basal ou pré-operatório; (2) início da CEC; (3) final da CEC e (4) após protamina ou nas primeiras 24 horas de pós-operatório (POI).

Gráfico 7 - Valores medianos e intervalo interquartil das variáveis laboratoriais em diferentes momentos do estudo

CEC, circulação extracorpórea; POI, pós-operatório imediato.

Foi realizada uma análise do comportamento dos valores medianos das principais variáveis da coagulação sanguínea e da inflamação em dois momentos: no início da CEC e no final da CEC (tabela 6).

A concentração de plaquetas passou de, em mediana, 92,0 mil/mm³ (IQR 63,0 – 125,0 mil/mm³) no início da CEC para 97,0 mil/mm³ (IQR 76,0 – 145,0 mil/mm³) (*Wilcoxon test*; $p = 0,046$) no final da CEC. Neste sentido, também foi possível observar uma mudança significativa no marcador dímero-D no início da CEC, passando de 307,0 ng/mL (IQR 215,0 – 822,0 ng/mL) para 636,0 ng/mL (IQR 215,0 – 1 252,0 ng/mL) (*Wilcoxon test*; $p = 0,001$) no final da CEC. Não foi possível observar mudanças significativas nos testes especiais da coagulação, estudados do início para o final da CEC (tabela 6).

Tabela 6 - Valores medianos e IQR das principais variáveis laboratoriais medidas no início e no final da CEC

Variável	N	Início CEC	Final CEC	p*
COT 1	21	40,0 (33,0 – 44,0)	40,0 (36,5 – 43,5)	0,862
COT 2	21	91,0 (83,0 – 108,5)	93,0 (83,0 – 135,5)	0,366
Slope	21	56,0 (25,5 – 87,5)	67,0 (21,5 – 98,5)	0,350
GMAX	21	1 344,0 (805,5 – 1 946,0)	1 386,0 (721,0 – 1 785,5)	0,794
EAT	21	487,0 (241,5 – 732,5)	536,0 (246,0 – 817,5)	0,394
Clot SR	22	9,0 (0,0 – 15,2)	9,0 (0,0 – 19,0)	0,555
ADP	24	56,6 (28,1 – 71,4)	46,0 (27,4 – 69,1)	0,089
ADR	24	40,3 (19,1 – 56,0)	27,8 (12,3 – 52,9)	0,175
Fibrinogênio	27	52,0 (37,0 – 83,0)	66,0 (36,0 – 94,0)	0,169
Plaquetas**	27	92,0 (63,0 – 125,0)	97,0 (76,0 – 145,0)	0,046
Dímero-D	27	307,0 (215,0 – 822,0)	636,0 (215,0 – 1 252,0)	0,001

Tabela 6 - Valores medianos e IQR das principais variáveis laboratoriais medidas no início e no final da CEC (continuação)

Variável	N	Início CEC	Final CEC	p*
Hematócrito	27	24,4 (19,8 – 28,9)	24,5 (17,3 – 27,7)	0,589
VCM	27	10,0 (8,2 – 11,6)	9,9 (9,0 – 11,8)	0,341
Proteína C reativa	17	2,06 (0,78 – 6,26)	73,3 (42,9 – 110,2)	< 0,001
Leucócitos**	27	3,63 (2,40 – 6,16)	6,57 (3,65 – 11,8)	0,003

COT1, tempo de coagulação; COT2, tempo de formação do coágulo; *Slope*, cinética de formação do coágulo; GMAX, máxima firmeza do coágulo; EAT, firmeza do coágulo ; *CLOT SR*, retração do coágulo; *ADR*, teste de agregação plaquetária com adrenalina; *ADP*, teste de agregação plaquetária com adenosina 5-difosfato; *VCM*, volume corpuscular médio.

*Wilcoxon test **Valores x 10³

Ao avaliar os resultados dos parâmetros do *ReoRox*®, conforme os pontos de normalidade previamente estabelecido, nota-se que a frequência de marcadores dentro dos limites de normalidade foi semelhante no início e no final da CEC. Vale ressaltar que 90% dos pacientes estavam com EAT diminuído no início da CEC e 85% manteve esse marcador diminuído no final da CEC. Por outro lado, quando se avalia o GMAX observa-se que muitos destes pacientes voltaram para valores dentro da normalidade. Além disso, aproximadamente 50% dos pacientes estavam em hiperfibrinólise tanto no início quanto no final da CEC, demonstrado pelo marcador *CLOT SR* alterado (tabela 7).

Tabela 7 - Frequência dos principais marcadores de coagulação sanguínea, segundo categorias, no início da CEC e no final da CEC

Variável	Início CEC (n%)	Final CEC (n%)
COT 1 (segundos)		
< 24	1 (4,8)	0 (---)
24 – 54 (normal)	19 (90,5)	21 (100)
> 54	1 (4,8)	0 (---)
COT 2 (segundos)		
61 – 139 (normal)	17 (81,0)	16 (76,2)
> 139	4 (19,0)	5 (23,8)
Slope (Pa/min)		
< 34	6 (28,6)	6 (28,6)
34 – 206 (normal)	15 (71,4)	15 (71,4)
GMAX (Pa)		
< 1039	8 (36,3)	6 (28,6)
1039 – 2825 (normal)	14 (63,6)	15 (71,4)
EAT		
< 700	19 (90,5)	18 (85,7)
700 – 1600 (normal)	2 (9,5)	3 (14,3)
Clot SR (%)		
< 7,5 (normal)	11 (50,0)	10 (54,5)
> 7,5	11 (50,0)	12 (54,5)

COT1, tempo de coagulação; COT2, tempo de formação do coágulo; *Slope*, cinética de formação do coágulo; GMAX, máxima firmeza do coágulo; EAT, firmeza do coágulo; *Clot SR*, retração do coágulo .

5.4 Análise dos desfechos clínicos

Nos eventos pós-operatórios, cinco pacientes (18%) apresentaram infecção, dois pacientes (7%) choque cardiogênico, dois pacientes (7%) taquiarritmia, dois pacientes (7%) bradiarritmia e 2 pacientes (7%) insuficiência renal aguda (IRA) não dialítica.

Somente um paciente foi reoperado no pós-operatório imediato por sangramento de causa cirúrgica. Dois pacientes (7%) apresentaram complicações tromboembólicas. Um paciente submetido a uma revascularização do miocárdio apresentou um tromboembolismo pulmonar no quinto dia de pós-operatório e teve boa evolução com alta hospitalar no 18º dia de PO. Esse paciente não recebeu hemoderivados, porém recebeu uma dose de DDAVP no POI e um grama de ácido tranexâmico no primeiro dia de PO.

Outro paciente submetido a troca de valva mitral apresentou um trombo no átrio esquerdo no sexto dia de PO teve boa evolução recebendo alta hospitalar no 12º dia de PO. Este paciente não havia recebido hemoderivados ou outros agentes hemostáticos no perioperatório. Um paciente submetido a troca da valva aórtica e mitral apresentou complicações no PO que evoluíram para um choque séptico e teve óbito no 20º dia de PO (tabela 8). Devido ao pequeno número de pacientes não foi possível estabelecer correlações entre eventos pós-operatórios e as variáveis laboratoriais estudadas.

Tabela 8 - Desfechos pós-operatórios dos pacientes estudados

Variável	N=28 (%)
Sangramento 48 horas (mL)	400,0 (253,7 – 657,5)
Uso de hemoderivados (u)	0,0 (---)
Reoperação	1 (3,6)
Uso de BIA	0,0 (---)
Choque cardiogênico	1 (3,6)
Taquiarritmias	2 (7,1)
AVC	0,0 (---)
Eventos tromboembólicos	2 (7,1)
IRA	2 (7,1)
Complicações infecciosas	5 (17,8)
Tempo de ventilação mecânica (horas)	14,8 (13,0 – 18,5)
Tempo de UTI (dias)	3,0 (2,0 – 6,5)
Tempo de internação pós-operatória (dias)	3,9 (2,1 – 9,4)

IQR, intervalo interquartil; UTI, unidade de terapia intensiva; BIA, balão intra-aórtico; AVC, acidente vascular cerebral; IRA, insuficiência renal aguda.

6 DISCUSSÃO

No presente estudo o filtro arterial foi escolhido para análise da interação do sangue com o circuito da CEC, por possibilitar a obtenção de amostras reprodutíveis para a avaliação da MEV. Além disso, o filtro arterial é a parte do circuito de CEC que está exposta a mais alto estresse mecânico e em que os agregados celulares são encontrados em maior quantidade¹².

A microscopia eletrônica de varredura revelou adesão de elementos sanguíneos na membrana do filtro arterial em todos os fragmentos dos filtros estudados, tanto no aumento 30X como no aumento 400X (figuras 3 e 4). Outros estudos já haviam demonstrado essa adesão dos elementos no sangue no filtro arterial pela MEV^{12,13,75,98}. Nesses estudos foram utilizados diferentes tipos de circuitos de CEC, ou seja, circuitos recobertos e não recobertos por heparina e de diferentes marcas. O estudo de Kim *et al*⁷⁴ não descreveu identificação de elementos do sangue no filtro. Esse estudo identificou partículas estranhas, como fibras sintéticas, fibras de algodão e cristais minerais na MEV do filtro arterial (*Baxter Healthcare Corporation*®).

No presente estudo, o filtro arterial reteve esses produtos da coagulação, provavelmente evitando que esses embolizassem durante a CEC. Estudos já demonstraram que o filtro arterial é um dos componentes mais importantes do circuito da CEC para proteção contra embolia arterial durante a CEC. Há evidência de que o uso dos filtros arteriais diminui a taxa de embolia arterial^{99,100}, assim como a incidência de distúrbios cognitivos^{99,101}.

Diferente do estudo de Borowiec *et al*.¹² que estimou a adesão celular na superfície do filtro arterial através de um escore numérico de graduação da adesão do sangue no filtro arterial, o presente estudo não utilizou esse escore porque as imagens da MEV adquiridas não demonstraram os detalhes da ativação das plaquetas descritos por Borowiec *et al*. Para estimar o grau de adesão do sangue no filtro arterial, o presente estudo utilizou como método a contagem dos campos obstruídos por elementos do sangue de 3 amostras de

cada filtro arterial com aumento de 30x de MEV, semelhante ao que foi realizado no estudo de Kundu *et al*¹³ que aplicou um escore em amostras de todo circuito de ECMO, em estudo experimental. O presente estudo teve uma mediana de obstrução do filtro arterial de 3,4% (IQR 1,9 – 8,2). Já Kundu *et al*.¹³ identificaram que cerca de 20% do circuito da ECMO estava recoberto por plaquetas após 5 horas de exposição.

À diferença dos estudos já publicados sobre análise do filtro arterial^{12,13,74,75,98}, o presente estudo realizou o PCR em tempo real, um exame mais preciso, para identificar quais tipos celulares estavam aderidos à membrana do filtro arterial⁸⁰. Foi realizada PCR em tempo real para avaliação da expressão gênica de plaquetas identificadas pelo receptor da glicoproteína Ib (GPIb) e da expressão gênica de leucócitos, identificados pelo receptor CD45. A expressão gênica da GPIb identifica as plaquetas nucleadas, ou seja, as plaquetas jovens circulantes. Todos os filtros estudados foram positivos para expressão gênica da GPIb na plaqueta e somente 15% dos filtros foram positivos para o CD45 de leucócito. Esse achado foi diferente do estudo de Nakajima *et al*⁷⁵, que através de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) encontraram neutrófilos aderidos e não identificaram plaquetas. Diferentemente do presente estudo, Nakajima *et al* utilizaram circuito de CEC recoberto por heparina (Duraflo II, Bentley/Baxter®).

As plaquetas contêm muitas moléculas que ativam o sistema trombogênico como a adenosina-di-fosfato, tromboxano, serotonina, protrombina e adenosina-mono-fosfato. Quando as plaquetas se depositam nos materiais de superfície não endotelial, essas substâncias são liberadas na circulação sanguínea e enviam mensagens químicas para outras plaquetas que subsequentemente causam ativação de deposição de mais plaquetas¹⁰²⁻¹⁰⁴. As plaquetas aderem e se agregam via ativação do receptor da GPIIb/IIIa¹⁰⁵,

emitem pseudópodes e liberam substâncias que provocam a formação de trombina através de sua ligação com o fibrinogênio¹⁰⁶.

Para avaliar o impacto da ativação do sistema de coagulação, durante a CEC, foi realizada a análise, no sangue circulante, da expressão gênica da GPIb na plaqueta nucleada, ou seja, plaqueta jovem. Observou-se, no estudo, que a expressão gênica da GPIb na plaqueta diminuiu no final da CEC, com diferença estatisticamente significativa em relação ao início da CEC (*Wilcoxon*; $p = 0,019$). Isso demonstra que as plaquetas jovens foram consumidas durante a CEC e um dos locais de consumo dessas plaquetas, demonstrado pelo estudo, foi o filtro arterial. Além disso, a correlação negativa entre expressão gênica da GPIb nas plaquetas no sangue, no final da CEC, com a variável *Clot SR* no final da CEC (gráfico 4), demonstrou que quanto maior era a hiperfibrinólise, maior era o consumo das plaquetas jovens.

Por outro lado, a mediana do número total de plaquetas teve um discreto aumento, estatisticamente significativo, no final da CEC. Esse fenômeno pode ser explicado pela liberação de plaquetas do baço, onde estão sequestradas de 25% a 30% do total das plaquetas corporais e que são liberadas quando ocorre o estímulo alfa-adrenérgico¹⁰⁷. Também a mediana do tempo de CEC foi de 97 minutos (IQ 76,0 – 115,0), que é inferior ao tempo relatado pelos estudos que demonstram queda no número de plaquetas durante a CEC. Kondo *et al.*¹⁰⁸ demonstraram que o nadir do número de plaquetas ocorre em torno de 120 minutos de CEC, quando a contagem de plaquetas cai em torno de 64% do valores antes da CEC.

Todos os pacientes receberam antifibrinolítico (Ypsilon®), pois a administração de medicações antifibrinolíticas durante a cirurgia cardíaca encontra-se na classe IA de recomendação¹⁰⁹ e faz parte da rotina de serviço. E apesar de os pacientes terem recebido doses adequadas de Ypsilon® (mediana de 20 g ou 280 mg/kg da dose total), como recomendado pela

literatura¹¹⁰⁻¹¹², cerca de 50% deles estavam em hiperfibrinólise, fato evidenciado pela alteração do *Clot SR*, tanto no início como no final da CEC (tabela 7), como também pelo aumento significativo do dímero-D no final da CEC.

Whitten *et al.* realizaram um estudo clínico envolvendo pacientes submetidos a cirurgia cardíaca e demonstraram associação do aumento do dímero-D com a ocorrência de hiperfibrinólise¹¹³. Além disso, Solbeck S *et al.*⁶⁷ realizaram um estudo prospectivo envolvendo 40 pacientes vítimas de trauma e utilizaram o *ROTEM*® (EXTEM e FIBTEM), o *ReoRox*® (Fibscreen1 e Fibscreen2) para avaliar a fibrinólise. Esse estudo encontrou correlação do índice de lise do coágulo em 60 min (LI60) medido pelo *ROTEM*® com o *ClotSR* medido pelo *ReoRox*®.

A presença de elementos do sangue aderidos ao filtro arterial pode ter sido um dos estímulos à hiperfibrinólise, uma vez que foi demonstrado pelo estudo que quanto maior a obstrução dos campos da membrana do filtro arterial maior era a dosagem dos dímeros-D no final da CEC ($rô = 0,828$; $p < 0,001$).

O estudo de Bennett-Guerrero *et al.*¹¹² demonstrou que o nível sérico de ácido epsilon-aminocapróico de 70 a 75 mcg/ml inibiu a fibrinólise em 50% e os níveis sanguíneos por volta de 130 mcg/ml apresentou efeito máximo. Apesar de, no presente estudo, não ter sido realizada a dosagem dos níveis séricos de ácido epsilon-aminocaproico, foram utilizadas doses similares ao efeito máximo da inibição da hiperfibrinólise. Foi utilizada, nesse estudo, uma dose total mediana de 20g (280mg/kg) e o estudo de Bennett-Guerrero *et al.* também utilizou, em média, 20g (270 mg/kg) de ácido epsilon-aminocaproico. Dessa forma, como a hiperfibrinólise ocorreu em cerca de 50% dos pacientes do estudo, pode-se inferir que, possivelmente, o estímulo à hiperfibrinólise esteve maior no presente estudo do que no estudo de Bennett-Guerrero *et al.*

O estudo demonstrou, ainda, que houve correlação entre a contagem de campos obstruídos do filtro e a dosagem da proteína C reativa ($r=0,570$; $p<0,05$), ou seja, quanto a maior resposta inflamatória maior a ativação da coagulação e maior, também, a obstrução do filtro arterial. O estudo evidenciou ativação da resposta inflamatória, demonstrado pelo aumento da proteína C reativa no final da CEC em relação ao início da CEC ($p<0,05$) e também pelo aumento estatisticamente significativo dos leucócitos no final da CEC ($p=0,003$). A coagulação e a resposta do sistema imune estão interligadas; uma lesão no endotélio vascular não somente deve ser reparada bem como qualquer invasor estranho à coagulação deve ser neutralizado¹. Leucócitos são ativados pelo contato com o circuito da CEC, causando aumento da expressão do fator tecidual, ativação do sistema pró-coagulante e geração de trombina¹¹⁴.

7 CONCLUSÃO

Houve adesão de células sanguíneas, especialmente de plaquetas nucleadas, em todos os filtros arteriais estudados. Embora o filtro arterial tenha funcionado como um dispositivo de segurança, que provavelmente evitou a embolização arterial, a obstrução parcial do filtro também pode ter causado maior hiperfibrinólise durante a circulação extracorpórea.

8 ANEXOS

Anexo A - Reometria de oscilação livre

Figura A

Figura B

Fonte: Winstedt et al. *Free oscillation rheometry monitoring of haemodilution and hypothermia and correction with fibrinogen and factor XIII concentrates. Scandinavian Journal of Trauma and Emergency Medicine.* 2013, 21:20(70).

Figura A: aparelho para realização do exame - *ReoRox G2 MEdirox AB*, Sverige.

Figura B: Imagem esquemática do copo onde é colocada a amostra do paciente, o ímã torce a amostra pelo guia de torção e os movimentos oscilatórios são registrados por um detector óptico que gera uma curva.

Anexo B - Traçado dos respectivos exames viscoelásticos: *ROTEM®* (A), *TEG®* (B) e *ReoRox®* (C e D)

Fonte: Tynngard et al. Assays of different aspects of haemostasis – what do they measure? *Thrombosis Journal*. 2015, 13⁸.

O tempo de coagulação é detectado no TEG® pela medida do R, no ROTEM® pela medida CT e pelo ReoRox® pela medida do COT1 e COT2. A elasticidade de propagação do coágulo é medida pelo ângulo α no ROTEM® (A), TEG® e pelo *Slope* no ReoRox®. A força máxima do coágulo é medida pela MA no TEG® pelo MCF no ROTEM® e pelo GMAX no ReoRox®. A fibrinólise em 30 minutos é medida pelo LY30 no TEG®, pelo LI30 no ROTEM® e pelo CLOT SR no ReoRox®⁷⁰.

Anexo C - Comparação dos testes equivalentes do ROTEM® e do ReoRox®⁷²

Teste <i>ROTEM</i>®	Teste <i>ReoRox</i>®
1. InTEM Ativação da via intrínica, sensível a heparina	1. HepScreen1 Tromboplastina (via extrínica, sensível a heparina)
2. Heptem Ativação da via intrínica e neutralização da heparina	2. HepScreen2 Tromboplastina (via extrínica e neutralização da heparina)
3. ExTEM Ativação do fator tecidual	3. FibScreen1 Tromboplastina (via extrínica)
4. FibTEM Ativador do fator tecidual e inibição de plaqueta com citocalasina D	4. FibScreen2 Ativador do fator tecidual e inibição de plaquetas com abciximab
5. ApTEM Ativador do fator tecidual e aprotinina (verificação fibrinólise)	5. ReoTrap Ativação do receptor de trombina PAR-1

Anexo D – Aprovação Comitê de Ética

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO DA COAGULAÇÃO NO FILTRO ARTERIAL DO CIRCUITO DA CIRCULAÇÃO EXTRACORPÓREA. IMPACTO NA HEMOSTASIA DO PÓS-OPERATÓRIO DE CIRURGIA CARDÍACA

Pesquisador: Filomena Regina Gomes Galas

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 50566315.5.0000.0068

Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.348.920

Apresentação do Projeto:

Estudo observacional para avaliar as alterações da coagulação sanguínea no filtro arterial do circuito da circulação extracorpórea e se existe relação com as alterações da hemostasia no pós-operatório imediato da cirurgia cardíaca. Serão incluídos para estudo 20 filtros arteriais do circuito da CEC (material descartado após a CEC) de pacientes submetidos à cirurgia cardíaca. Será colhido deste material descartado sangue antes e depois do filtro arterial para os seguintes testes de laboratório: fibrinogênio, dímero D, tromboelastograma, coagulograma, agregação plaquetária e contagem de plaqueta. A técnica anestésica e o uso de agentes antifibrinolíticos serão administrados de acordo com as normas padronizadas no serviço de Anestesia.

Objetivo da Pesquisa:

- Avaliar a formação de agregados de fibrina no filtro arterial do circuito da CEC através da microscopia eletrônica.
- Relação destes agregados com as alterações da coagulação sanguínea após a circulação extracorpórea.- Correlação destas alterações na coagulação e agregados no filtro arterial do circuito da CEC com as alterações da hemostasia no pós-operatório de cirurgia cardíaca.

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappelq.adm@hc.fm.usp.br

Continuação do Parecer: 1.348.920

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: estudo observacional não há risco envolvido. Benefícios: estudo observacional, não é esperado nenhum benefício.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudo bem desenhado, demonstra elementos necessários à sua execução.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatória estão claros e bem descritos.

Recomendações:

Recomendamos que seja revisto o cálculo do tamanho amostral, para garantir maior significância dos dados durante a análise dos mesmos.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Estudo deve ser aprovado observado a recomendação acima.

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_603467.pdf	28/10/2015 13:50:59		Aceito
Outros	ON_LINE_ASSINADO.pdf	28/10/2015 13:50:19	Fabiana Panham da Conceição	Aceito
Folha de Rosto	FR_ASSINADA.pdf	28/10/2015 13:47:52	Fabiana Panham da Conceição	Aceito
Outros	Parecer_I_FILTRO.pdf	08/10/2015 09:02:27	Filomena Regina Gomes Galas	Aceito
Outros	PARECER_SCOC_ANONIMIZADO.pdf	08/10/2015 09:01:11	Filomena Regina Gomes Galas	Aceito

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappelq.adm@hc.fm.usp.br

Continuação do Parecer: 1.348.920

Outros	Analise_Orcamentaria.pdf	08/10/2015 08:51:57	Filomena Regina Gomes Galas	Aceito
Outros	Anexo_A.pdf	08/10/2015 08:51:19	Filomena Regina Gomes Galas	Aceito
Outros	Declracao_LAC.pdf	08/10/2015 08:48:52	Filomena Regina Gomes Galas	Aceito
Outros	Declaracao_Bioengenharia.pdf	08/10/2015 08:48:11	Filomena Regina Gomes Galas	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	08/10/2015 08:47:22	Filomena Regina Gomes Galas	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto.pdf	07/10/2015 10:20:45	Filomena Regina Gomes Galas	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 03 de Dezembro de 2015

Assinado por:
ALFREDO JOSE MANSUR
 (Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappelq.adm@hc.fm.usp.br

Anexo E – Aprovação do Comitê de Ética: Adendo**a) aumento do tamanho amostral** **PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DA EMENDA**

Título da Pesquisa: ESTUDO DA COAGULAÇÃO NO FILTRO ARTERIAL DO CIRCUITO DA CIRCULAÇÃO EXTRACORPÓREA. IMPACTO NA HEMOSTASIA DO PÓS-OPERATÓRIO DE CIRURGIA CARDÍACA

Pesquisador: Filomena Regina Gomes Galas

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 50566315.5.0000.0068

Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.888.806

Apresentação do Projeto:

Estudo observacional para avaliar as alterações da coagulação sanguínea no filtro arterial do circuito da circulação extracorpórea e se existe relação com as alterações da hemostasia no pós-operatório imediato da cirurgia cardíaca. Serão incluídos para estudo 30 filtros arteriais do circuito da CEC (material descartado após a CEC) de pacientes submetidos à cirurgia cardíaca. Será colhido deste material descartado sangue antes e depois do filtro arterial para os seguintes testes de laboratório: fibrinogênio, dímero D, tromboelastograma, coagulograma, agregação plaquetária e contagem de plaqueta. A técnica anestésica e o uso de agentes antifibrinolíticos serão administrados de acordo com as normas padronizadas no serviço de Anestesia.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a formação de agregados de fibrina no filtro arterial do circuito da CEC através da microscopia eletrônica.- Relação destes agregados com as alterações da coagulação sanguínea após a circulação extracorpórea.- Correlação destas alterações na coagulação e agregados no filtro arterial do circuito da CEC com as alterações da hemostasia no pós-operatório de cirurgia cardíaca.

Endereço: Rua Ovidio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappelq.adm@hc.fm.usp.br

Continuação do Parecer: 1.888.806

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Estudo observacional não há risco envolvido. Benefícios: Estudo observacional, não é esperado nenhum benefício.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante no assunto a que se propõe e apresenta os elementos necessários ao seu desenvolvimento.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatória estão bem descritos.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Conforme solicitação do pesquisador, estamos de acordo com a solicitação do aumento do tamanho amostral de 20 para 30 casos (emenda datada de 28/11/16).

Ciente e de acordo com o relatório apresentado com data de 24/11/16.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_844561_E1.pdf	15/12/2016 15:03:54		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_2_0_de_pesquisa_fibrina_na_CEC.pdf	15/12/2016 15:02:58	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Outros	Emenda_SDC4279_15_106.pdf	15/12/2016 15:02:11	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Outros	Memo134_16_3.pdf	15/12/2016 14:59:37	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Outros	ON_LINE_ASSINADO.pdf	28/10/2015 13:50:19	Fabiana Panham da Conceição	Aceito
Folha de Rosto	FR_ASSINADA.pdf	28/10/2015 13:47:52	Fabiana Panham da Conceição	Aceito
Outros	Parecer_I_FILTRO.pdf	08/10/2015 09:02:27	Filomena Regina Gomes Galas	Aceito
Outros	PARECER_SCOC_ANONIMIZADO.pdf	08/10/2015 09:01:11	Filomena Regina Gomes Galas	Aceito
Outros	Análise_Orcamentaria.pdf	08/10/2015	Filomena Regina	Aceito

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappelq.adm@hc.fm.usp.br

Continuação do Parecer: 1.888.806

Outros	Analise_Orcamentaria.pdf	08:51:57	Gomes Galas	Aceito
Outros	Anexo_A.pdf	08/10/2015 08:51:19	Filomena Regina Gomes Galas	Aceito
Outros	Declracao_LAC.pdf	08/10/2015 08:48:52	Filomena Regina Gomes Galas	Aceito
Outros	Declaracao_Bioengenharia.pdf	08/10/2015 08:48:11	Filomena Regina Gomes Galas	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	08/10/2015 08:47:22	Filomena Regina Gomes Galas	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto.pdf	07/10/2015 10:20:45	Filomena Regina Gomes Galas	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 11 de Janeiro de 2017

Assinado por:
Joel Faintuch
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappeeq.adm@hc.fm.usp.br

b) aprovação mudança de título **PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DA EMENDA**

Título da Pesquisa: "Análise da adesão das células sanguíneas no filtro arterial através de microscopia eletrônica de varredura e de PCR em tempo real. Estudo clínico observacional em pacientes submetidos a cirurgia cardíaca."

Pesquisador: Filomena Regina Gomes Galas

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 50566315.5.0000.0068

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.848.609

Apresentação do Projeto:

Serão incluídos para estudo 20 filtros arteriais do circuito da CEC (material descartado após a CEC) de pacientes submetidos à cirurgia cardíaca. Será colhido deste material descartado sangue antes e depois do filtro arterial para os seguintes testes de laboratório: fibrinogênio, dímero D, tromboelastograma, coagulograma, agregação plaquetária e contagem de plaqueta. A técnica anestésica e o uso de agentes antifibrinolíticos serão administrados de acordo com as normas padronizadas no serviço de Anestesia.

Preparo do Filtro Arterial para Microscopia Eletrônica de

Varredura (MEV) Após a retirada do filtro de sangue da sala de cirurgia, serão feitas duas lavagens com 500 mL de soro fisiológico 0.9% a fim de se retirar o excesso de sangue presente. Em seguida, dentro de uma capela de exaustão e com auxílio de uma pinça forte, a mangueira de saída do filtro é bloqueada e são adicionados 150 mL de paraformaldeído 4% (PFA) a 25 °C, durante 15 minutos por meio da mangueira de entrada do filtro e um funil de vidro. Transcorrido o tempo de fixação, o PFA é retirado do filtro abrindo-se a pinça forte posicionada na mangueira de saída. A abertura do filtro arterial será realizada nas instalações do Departamento de Mecânica da Divisão de Bioengenharia com auxílio de um torno IMOR P-400 II. Resumidamente, o filtro será posicionado e preso na placa do torno pelo lado da entrada do filtro. A abertura se dará pelo lado oposto do filtro e é feita de forma manual com um bedame de aço rápido com espessura de 2,5 mm. O filtro é composto por uma tela que recobre uma membrana

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappelq.adm@hc.fm.usp.br

Continuação do Parecer: 3.848.609

filtrante (40 µm). Em seguida à abertura do filtro, este será levado para dentro da capela de exaustão novamente para que a tela e a membrana filtrante sejam retiradas e visualizadas no microscópio eletrônico de varredura. Com auxílio de bisturi, pinça e tesoura amostras da tela e da membrana são retiradas em três regiões pré-determinadas. As amostras obtidas serão colocadas dentro de uma câmara de fluxo laminar para evaporação do PFA residual e secagem. Com as amostras fixadas e secas, as imagens de MEV são obtidas com microscópio HITACHI TM 3000 com voltagem de aceleração 5000 volts e corrente de filamento 1750 mA, em diversas magnificações (Fig. 2). Na Fig.3 mostra a viabilização do filtro após a preparação do filtro utilizado na CEC.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:- Avaliar a formação de agregados de fibrina no filtro arterial do circuito da CEC através da microscopia eletrônica.- Relação destes agregados com as alterações da coagulação sanguínea após a circulação extracorpórea.- Correlação destas alterações na coagulação e agregados no filtro arterial do circuito da CEC com as alterações da hemostasia no pós-operatório de cirurgia cardíaca.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:Estudo observacional não há risco envolvido.Benefícios:Estudo observacional, não é esperado nenhum benefício.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma emenda solicitando a mudança no título do estudo e apresentação do relatório parcial do estudo.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatória estão claros e bem descritos.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Ofício datado de 31 de janeiro de 2020, solicitando mudança do título: DE "Estudo da Coagulação no Filtro Arterial do Circuito da Circulação Extracorpórea, Impacto Clínico na Hemostasia do Pós-Operatório de Cirurgia Cardíaca", PARA "Análise da adesão das células sanguíneas no filtro arterial através de microscopia eletrônica de varredura e de PCR em tempo real. Estudo clínico observacional em pacientes submetidos a cirurgia cardíaca." Estamos de acordo com a solicitação para mudança do título.Estamos de acordo também com o relatório parcial apresentado.

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Continuação do Parecer: 3.848.609

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_149770_6_E2.pdf	11/02/2020 10:39:32		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Protocolo_v3_03fev2020.pdf	11/02/2020 10:36:36	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Outros	Relatorio_parcial_Chicara_Gatto_fev2020.pdf	07/02/2020 12:26:46	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Outros	Form_avaliacao_antecipada_Chicara.pdf	07/02/2020 12:23:28	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Outros	FORM_SUBMISSAO_EMENDA_13996_Chicara.pdf	07/02/2020 12:23:04	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Outros	Oficio_mudanca_titulo_Chicara1.pdf	07/02/2020 12:22:20	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_2_0_de_pesquisa_fibrina_na_C EC.pdf	15/12/2016 15:02:58	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Outros	Emenda_SDC4279_15_106.pdf	15/12/2016 15:02:11	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Outros	Memo134_16_3.pdf	15/12/2016 14:59:37	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Outros	ON_LINE_ASSINADO.pdf	28/10/2015 13:50:19	Fabiana Panham da Conceição	Aceito
Folha de Rosto	FR_ASSINADA.pdf	28/10/2015 13:47:52	Fabiana Panham da Conceição	Aceito
Outros	Parecer_I_FILTRO.pdf	08/10/2015 09:02:27	Filomena Regina Gomes Galas	Aceito
Outros	PARECER_SCOC_ANONIMIZADO.pdf	08/10/2015 09:01:11	Filomena Regina Gomes Galas	Aceito
Outros	Analise_Orcamentaria.pdf	08/10/2015	Filomena Regina	Aceito

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Continuação do Parecer: 3.848.609

Outros	Analise_Orcamentaria.pdf	08:51:57	Gomes Galas	Aceito
Outros	Anexo_A.pdf	08/10/2015 08:51:19	Filomena Regina Gomes Galas	Aceito
Outros	Declacao_LAC.pdf	08/10/2015 08:48:52	Filomena Regina Gomes Galas	Aceito
Outros	Declaracao_Bioengenharia.pdf	08/10/2015 08:48:11	Filomena Regina Gomes Galas	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	08/10/2015 08:47:22	Filomena Regina Gomes Galas	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto.pdf	07/10/2015 10:20:45	Filomena Regina Gomes Galas	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 19 de Fevereiro de 2020

Assinado por:
Joel Faintuch
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Anexo F – Termo de consentimento livre e esclarecido**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

(versão 1.0 de 05/07/13)

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Estudo da coagulação no filtro arterial do circuito da circulação extracorporea. Impacto na hemostasia do pós-operatório de cirurgia cardíaca.

2. PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Profa. Dra. Filomena Regina Barbosa Gomes Galas
CARGO/FUNÇÃO: médica INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 61.249

UNIDADE DO HCFMUSP: Serviço de Anestesiologia - Instituto do Coração – InCor

PESQUISADOR EXECUTANTE: Dra. Chiara Scaglioni Tessemer Gatto

CARGO/FUNÇÃO: médica INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 126.140

UNIDADE DO HCFMUSP: Serviço de Anestesiologia - Instituto do Coração – InCor

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☐ RISCO MÉDIO ☐RISCO BAIXO X RISCO MAIOR ☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 24 meses

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que será realizada para analisar o filtro da máquina que ajuda na circulação do sangue durante a cirurgia do coração.

Durante a cirurgia do coração é necessário a utilização de um aparelho coração-pulmão (circulação extracorpórea) que ajuda na circulação do sangue enquanto o cirurgião mexe no coração. Como esse aparelho faz o desvio do sangue do coração ele contém um filtro para evitar que os componentes do sangue coagulados retornem para a circulação e possam provocar uma trombose.

O que pretendemos neste estudo é analisar com o microscópio esses componentes do sangue que ficam no filtro do aparelho e realizar teste para avaliar a coagulação do sangue.

Todos os exames e as análises realizadas são realizadas com material que é descartado após a cirurgia, ou seja, com o resto de sangue que fica no aparelho coração-pulmão. Os demais exames realizados são coletados na rotina das cirurgias do coração.

Não há riscos adicionais a cirurgia, a coleta do material e dos exames é realizada com o material que é descartado após a cirurgia.

Em qualquer etapa do estudo terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de dúvidas. Os principais investigadores são a Dra. Filomena Regina Barbosa Gomes Galas e a Dra. Chiara Scaglioni Tessemer Gatto que podem ser encontrados no endereço Avenida Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, nº 44, InCor_HC-FMUSP CEP: 05403-000, Telefone(s): 2661-5560 e 2661-5012.

Se houver alguma dúvida ainda sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar- Telefone: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 2661-6442, ramal 26 ou (11) 2661-7585 – E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade do seu tratamento na Instituição.

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente. Não há despesas pessoais

para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à participação.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Estudo do coagulação no filtro arterial do circuito da circulação extracorporea. Impacto na hemostasia do pós-operatório de cirurgia cardíaca”.

Eu discuti com a Dra. Filomena/Dra. Chiara sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confiabilidade e esclarecimento permanentes. Ficou claro também que a minha participação é isenta de despesas e que terei garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concorde voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que possa ter adquirido, ou no atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante
legal

Data / /

Assinatura da testemunha

Data / /

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data / /

Anexo G – Ficha de Coleta do Estudo

Estudo da coagulação no filtro arterial do circuito da circulação extracorpórea. Impacto na hemostasia do pós-operatório de cirurgia cardíaca **VERSÃO 1.0 13/06/2016**

DADOS DEMOGRÁFICOS

1. Número do caso: _____
2. Nome do paciente: _____
3. RGHC: _____
4. Telefone: _____ Contato: _____
() _____
() _____
5. Data de nascimento: ____/____/____
6. Data da internação: ____/____/____
7. Sexo: ☐ Masculino (0) ☐ Feminino (1)
8. Raça: ☐ Branco (0) ☐ Negro (1) ☐ Oriental (2)
9. Peso (kg): _____ IMC: _____
10. Altura (cm): _____
11. EuroSCORE: _____

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

1. FEVE: _____ %
2. IC: ☐ Sim (1) ☐ Não (0)
NYHA: ☐ I ☐ II ☐ III ☐ IV
3. IAM prévio: ☐ Sim (1) ☐ Não (0)
4. Cirurgia Cardíaca prévia: ☐ Sim (1) ☐ Não (0)
5. Hipertensão arterial: ☐ Sim (1) ☐ Não (0)
6. Doença valvar: ☐ Sim (1) ☐ Não (0)
7. Valvopatia reumática: ☐ Sim (1) ☐ Não (0)
8. Doença vascular periférica: ☐ Sim (1) ☐ Não (0)
9. DPOC: ☐ Sim (1) ☐ Não (0)
10. Dislipidemia: ☐ Sim (1) ☐ Não (0)
11. Tabagista atual: ☐ Sim (1) ☐ Não (0)
12. Tabagista prévio (> 6 meses): ☐ Sim (1) ☐ Não (0)
13. Obesidade (IMC >30): ☐ Sim (1) ☐ Não (0)
14. Creatinina > 1,5mg/dL: ☐ Sim (1) ☐ Não (0)
15. FA: ☐ Sim (1) ☐ Não (0)
16. Diabetes: ☐ Sim (1) ☐ Não (0)
17. Doença hepática: ☐ Sim (1) ☐ Não (0)
18. Hipotireoidismo: ☐ Sim (1) ☐ Não (0)
19. AVC prévio: ☐ Sim (1) ☐ Não (0)
20. IECA/BRA: (pril, sartan) ☐ Sim (1) ☐ Não (0)
21. BBloqueador: (nolol) ☐ Sim (1) ☐ Não (0)
22. Anticoagulante: ☐ Sim (1) ☐ Não (0) Se sim, qual: _____
23. Antiagregante plaquetário: ☐ Sim (1) ☐ Não (0) Se sim, qual: _____
24. Hipertensão Pulmonar: ☐ Sim (1) ☐ Não (0)

Exames laboratoriais (pré-operatório):

Hb	Ht	Plaquet as	TTPA	TP	INR	BT	BD	BI	Fibrinogê nio	Creatinin a	PCR	Leucogra ma

INTRA-OPERATÓRIO

25. Data da cirurgia: ____/____/____
26. Início da cirurgia: _____ Término da cirurgia: _____

Estudo da coagulação no filtro arterial do circuito da circulação extracorpórea. Impacto na hemostasia do pós-operatório de cirurgia cardíaca

VERSÃO 1.0 13/06/2016

27. Início da anestesia: _____ Termina da anestesia: _____

28. Tipo de cirurgia

☐ Valvar ☐ Mitral (1) ☐ Aortica (2) ☐ Tricuspíde (3)

☐ RM Número de enxertos: _____

Tipos: ☐ Mamária (1) ☐ Veia safena (2) ☐ Radial (3)

☐ Aorta

29. CEC: ☐ Sim (1) ☐ Não (0) Tempo de CEC (minutos): _____

30. Tempo de pinçamento: _____ (minutos)

31. Heparina dose total: _____

32. Protamina dose total: _____

33. TCA

Inicial	Pós Heparina	1º	2º	3º	4º	Final	Pós protamina

34. CEC

Cristaloide CEC (total em mL) _____

Manitol (mL) _____

Potássio (mL) _____

Bicarbonato (mL) _____

Magnésio (mL) _____

Heparina (mL) _____

34. Temperatura central (mais alta): _____ (mais baixa): _____

35. Cloreto de Cálcio ☐ Sim (1) ☐ Não (0) Dose total: _____

36. DDAVP ☐ Sim (1) ☐ Não (0) Dose total: _____

37. Balanço hídrico (ml): _____

38. Balanço sanguíneo (ml): _____

39. Diurese (ml): _____

40. Peso de compressa: _____

41. Transfusão: ☐ Sim (1) ☐ Não (0)

Concentrado de hemácias: _____ unidades

Plasma fresco congelado: _____ unidades

Concentrado de plaquetas: _____ unidades

Crioprecipitado: _____ unidades

42. Infusão de líquidos

Cristaloide: _____ mL

Albumina: _____ mL

43. Drogas vasoativas usadas no intra-operatório:

Estudo da coagulação no filtro arterial do circuito da circulação extracorpórea. Impacto na hemostasia do pós-operatório de cirurgia cardíaca

VERSÃO 1.0 13/06/2016

Dobutamina: ☐ Sim (1) ☐ Não (0)
 Dopamina: ☐ Sim (1) ☐ Não (0)
 Nitroglicerina: ☐ Sim (1) ☐ Não (0)
 Nitroprussiato: ☐ Sim (1) ☐ Não (0)
 Norepinefrina: ☐ Sim (1) ☐ Não (0)
 Epinefrina: ☐ Sim (1) ☐ Não (0)
 Óxido nítrico: ☐ Sim (1) ☐ Não (0)
 Levosimendan: ☐ Sim (1) ☐ Não (0)
 Milrinone: ☐ Sim (1) ☐ Não (0)

44. Antifibrinolíticos usados no intra-operatório:

Ypsilon: ☐ Sim (1) ☐ Não (0)

Dose Total: _____ Hora: _____

Ácido tranexâmico: ☐ Sim (1) ☐ Não (0)

Dose total: _____ Hora: _____

45. Terapias hemostáticas:

Complexo protrombínico: ☐ Sim (1) ☐ Não (0)

Dose total: _____ Hora: _____

Fibrinogênio: ☐ Sim (1) ☐ Não (0)

Dose total: _____ Hora: _____

Novoseven: ☐ Sim (1) ☐ Não (0)

Dose total: _____ Hora: _____

46. Exames laboratoriais:

	T0 - Indução	T1 - Final CEC	T2 - Admissão REC	T3 - 1º PO
Ph				
PaCO2				
PaO2				
SaO2				
BIC				
BE				
PvCO2				
PvO2				
SvO2				
Lactato				
Cai				
Hb				
Ht				
TTPA				
TP				
INR				
Dímero D				
Fibrinogênio				
Plaquetas				
PCR				

Estudo da coagulação no filtro arterial do circuito da circulação extracorpórea. Impacto na hemostasia do pós-operatório de cirurgia cardíaca **VERSÃO 1.0 13/06/2016**

Leucograma				
------------	--	--	--	--

47. Exames Filtro Arterial

	Pré Filtro	Pós Filtro
Fibrinogênio		
Dímero D		
INR		
TTPA		
TP		
Plaquetas		
Agregação Plaquetária ADP		
Agregação Plaquetária Adrenalina		
Tromboelastograma (ReoRox)		
Cot1 (s)		
COT2 (s)		
Slope (Pa/min)		
MCF(Pa)		
EAT (Pa)		

PÓS-OPERATÓRIO

43. Data admissão UTI: ____/____/____ hora: ____:____

44. Tórax aberto: ☐ Sim (1) ☐ Não (0)

45. Suporte à admissão:

Dobutamina: ☐ Sim (1) ☐ Não (0) _____ µg/Kg/min
 Dopamina: ☐ Sim (1) ☐ Não (0) _____ µg/Kg/min
 Nitroglicerina: ☐ Sim (1) ☐ Não (0) _____ µg/Kg/min
 Nitroprussiato: ☐ Sim (1) ☐ Não (0) _____ µg/Kg/min
 Norepinefrina: ☐ Sim (1) ☐ Não (0) _____ µg/Kg/min
 Epinefrina: ☐ Sim (1) ☐ Não (0) _____ µg/Kg/min
 Óxido nítrico: ☐ Sim (1) ☐ Não (0) _____ ppm
 Levosimendan: ☐ Sim (1) ☐ Não (0) _____ µg/Kg/min
 Milrinone: ☐ Sim (1) ☐ Não (0) _____ µg/Kg/min
 BIA: ☐ Sim (1) ☐ Não (0)

46. Balanço sanguíneo (ml): POI _____ 1º PO _____

47. Balanço hídrico (ml): POI _____ 1º PO _____

48. Débito dos drenos (ml): POI _____ 1º PO _____

Estudo da coagulação no filtro arterial do circuito da circulação extracorpórea. Impacto na hemostasia do pós-operatório de cirurgia cardíaca

VERSÃO 1.0 13/06/2016

49. Registrar os valores das 6 primeiras horas

	Temp.	Calcio (dose)	DDAV P (dose)	Protamina (dose)	Y (dose)	Ac.Tranexa mino (dose)	DM	DPE	DPD
1									
2									
3									
4									
5									
6									

50. Antifibrinolíticos:

	POI	Dose total	1ºPO	Dose total
Ypsilon	☐ Sim (1) ☐ Não (0)		☐ Sim (1) ☐ Não (0)	
Ácido tranexâmico	☐ Sim (1) ☐ Não (0)		☐ Sim (1) ☐ Não (0)	

48. Terapias hemostáticas:

	POI	Dose total	1ºPO	Dose total
Complexo protrombínico	☐ Sim (1) ☐ Não (0)		☐ Sim (1) ☐ Não (0)	
Fibrinogênio	☐ Sim (1) ☐ Não (0)		☐ Sim (1) ☐ Não (0)	
Novoseven	☐ Sim (1) ☐ Não (0)		☐ Sim (1) ☐ Não (0)	

49. Terapias hemostáticas adjuvantes:

	POI	Dose total	1ºPO	Dose total
DDAVP	☐ Sim (1) ☐ Não (0)		☐ Sim (1) ☐ Não (0)	
Protamina	☐ Sim (1) ☐ Não (0)		☐ Sim (1) ☐ Não (0)	
Cálcio	☐ Sim (1) ☐ Não (0)		☐ Sim (1) ☐ Não (0)	

Estudo da coagulação no filtro arterial do circuito da circulação extracorpórea. Impacto na hemostasia do pós-operatório de cirurgia cardíaca

VERSÃO 1.0 13/06/2016

	(0)		(0)	
--	-----	--	-----	--

50. Transusão:

	POI	Total de unidades	1ºPO	Total de unidades
Concentrado de hemácias	☐ Sim (1) ☐ Não (0)		☐ Sim (1) ☐ Não (0)	
Plasma fresco congelado	☐ Sim (1) ☐ Não (0)		☐ Sim (1) ☐ Não (0)	
Concentrado de plaquetas	☐ Sim (1) ☐ Não (0)		☐ Sim (1) ☐ Não (0)	
Crioprecipitado	☐ Sim (1) ☐ Não (0)		☐ Sim (1) ☐ Não (0)	

DESFECHOS PÓS-OPERATÓRIOS

1. Horário de admissão na UTI: _____:
2. Reoperação: ☐ Sim (1) ☐ Não (0)
3. Causa de reoperação:
 - ☐ Sangramento (1) ☐ Tamponamento (2) ☐ Isquemia (3)
 - ☐ Outros (4): _____
4. VM:
 - a. IOT data: _____ hora: _____ EXT data: _____ hora: _____
5. Uso de inotrópicos (dobutamina/epinefrina/milrinone):
 - a. Ligado data: _____ hora: _____
 - b. Desligado data: _____ hora: _____
6. Uso de vasopressor (noradrenalina/vasopressina):
 - a. Ligado data: _____ hora: _____
 - b. Desligado data: _____ hora: _____
7. Baixo Débito Cardíaco ☐ Sim (1) ☐ Não (0)
8. Choque cardiogênico: ☐ Sim (1) ☐ Não (0)
9. Necessidade de BIA no pós-operatório: ☐ Sim (1) ☐ Não (0)
10. Taquiarritmia: ☐ Sim (1) ☐ Não (0)
11. Bradiarritmia: ☐ Sim (1) ☐ Não (0)
12. Tempo de internação na UTI:
 - a. Data da alta da UTI: ____/____/____
 - b. Horário da alta da UTI: ____:____
13. Complicações pós operatórias:
 - a. AVC: ☐ Sim (1) ☐ Não (0)
 - b. IRA: ☐ Sim (1) ☐ Não (0)
 - 1. AKIN 1: ☐
 - 2. AKIN 2: ☐
 - 3. AKIN 3: ☐
 - c. Necessidade de Diálise: ☐ Sim (1) ☐ Não (0)
 - d. Complicação Infecçiosa: ☐ Sim (1) ☐ Não (0)
 - 1. Infecção ☐
 - 2. Sepses ☐
 - 3. Sepses Grave ☐
 - 4. Choque séptico ☐
 - e. Foco infeccioso:
 - 1. ITU: ☐
 - 2. BCP: ☐

Estudo da coagulação no filtro arterial do circuito da circulação extracorpórea. Impacto na hemostasia do pós-operatório de cirurgia cardíaca

VERSÃO 1.0 13/06/2016

3. Infecção de corrente sanguínea: ☐

4. Ferida Operatória: ☐

14. Data da alta hospitalar: ____/____/____

15. Óbito: ☐ Sim (1) ☐ Não (0)

a. Data: ____/____/____

Anexo H - Bomba centrífuga, modelo adulto Bio-Console 560 *Speed Controller System*, da marca Medtronic Biomedicus®, Minneapolis, MN

Fonte: <http://www.medtronic.com/usen/healthcareprofessionals/products/cardiovascular/cardiopulmonary/bioconsole-560-system.html>

Anexo I - Oxigenador de membrana acoplado ao reservatório de sangue venoso (cardiotomia) modelo adulto da marca Braile®, São José do Rio Preto, SP, Brasil

Fonte : <http://www.braile.com.br/produto-detahes.asp?id=256>

Anexo J - Especificações técnicas Oxigenador de Membrana Braile®

Características do Componente	Especificações Modelo Adulto
Oxigenador de Membrana	
Material	Policarbonato
Fluxo sanguíneo máximo	7,0 l/min
Volume de <i>priming</i> total	390ml
Trocador de Gás	
Material da fibra	Polipropileno
Área efetiva da membrana	2,2m ²
Sensor de temperatura	YSI
Conector de saída de sangue	3/8"
Conector de entrada de gás	1/4"
Conector de recirculação	1/4"
Conector de amostra arterial	<i>Luer lock</i>
Conector de retirada de ar	<i>Luer lock</i>
Trocador de calor	
Material da fibra	Poliéster
Área efetiva da membrana	0,68m ²
Temperatura máxima da água	42°
Pressão máxima da água	40 PSI (<i>pound force per square inch</i>)
Conector de entrada de sangue	3/8"
Conector de entrada /saída de água	Hansen (1/2")

Fonte: <http://www.braile.com.br/produto>

Anexo K - Reservatório de sangue venoso (cardiotomia) modelo adulto 4000 da marca Braile®, São José do Rio Preto, SP, Brasil

Especificações técnicas reservatório de sangue venoso - cardiotomia Braile®

Características do componente	Especificações Modelo Adulto 4000
Material	Polycarbonato
Fluxo sanguíneo máximo	7l/min
Volume máximo	3700ml
Volume mínimo	400ml
Material antiespuma	Poliuretano
Material filtrante	Poliéster
Filtragem de cardiotomia	150±5µm
Válvula de segurança	One way
Conector de entrada para aspiradores	1/4"
Conector de saída de sangue	3/8"
Conector de <i>Priming</i> Rápido	Luer lock
Conector de <i>Venti/Vácuo</i>	1/4"
Conector de injeção de drogas/amostra	Luer lock
Conector de entrada para recirculação	1/4"

Fonte: <http://www.braile.com.br/produto-detahes.asp?id=289>

Anexo L - Filtro arterial modelo adulto da marca Braile®, São José do Rio Preto, SP, Brasil

Fonte: <http://www.braile.com.br/produto-detahes.asp?id=155>

Especificações técnicas Filtro Arterial Adulto Braile®

Características do componente	Especificações Modelo Adulto
Material Estrutural	Policarbonato
Material Filtrante	Poliéster
Fluxo sanguíneo máximo	6l/min
Volume de <i>Priming</i>	210ml
Área de Filtragem	660cm ²
Retenção de partículas	40µm
Conector de entrada/saída de sangue	3/8"
Conector de torneira de três vias	<i>Luer lock</i>

Fonte: <http://www.braile.com.br/produto>

Anexo M - Algoritmo institucional de transfusão sanguínea**Centro Cirúrgico - InCor**

1. Protamina - 1:1 dose total heparina; 1000UI de protamina reverte 1000 UI de heparina - (até normalizar TCA)
2. INR > 2.0 – plasma fresco congelado: 10 ml/Kg
3. TTPa > 1.5 depois de protamina – crioprecipitado: 1U para cada 10 Kg
4. Plaquetas < 100.000 : 1U para cada 10 Kg
5. Fibrinogênio < 200 mg/dL: – crioprecipitado: 1U para cada 10 Kg
6. Concentrado de hemácias: Se HB ≤ 7.0 g/dL

Unidade de Terapia Intensiva – InCor

1. Protamina - 1000 UI/Kg – para reverter heparina residual (até normalizar TCA)
2. INR > 2.0 – plasma fresco congelado: 10 ml/Kg
3. TTPa > 1.5 depois de protamina – crioprecipitado: 1U para cada 10 kg
4. Plaquetas < 100.000 : 1U para cada 10 kg
5. Fibrinogênio < 200 mg/dL: – crioprecipitado: 1U para cada 10 kg
6. Concentrado de hemácias: Se HB ≤ 7.0 g/dL
Depois da primeira parte do tratamento, se o sangramento persistir:
1. Coletar novas amostras sanguíneas;
2. Se coagulação alterada: Considerar possibilidade de reoperação;
3. Se coagulação alterada: Novoseven®.

9 REFERÊNCIAS

1. Sniecinski RM, Chandler WL. Activation of the hemostatic system during cardiopulmonary bypass. *Anesth Analg*. 2011;113(6):1319-33.
2. Colman RW, Scott CF, Schmaier AH, Wachtfogel YT, Pixley RA, Edmunds LH, Jr. Initiation of blood coagulation at artificial surfaces. *Ann N Y Acad Sci*. 1987;516:253-67.
3. Baier RE, Dutton RC. Initial events in interactions of blood with a foreign surface. *J Biomed Mater Res*. 1969;3(1):191-206.
4. Gravlee GP, Haddon WS, Rothberger HK, Mills SA, Rogers AT, Bean VE, et al. Heparin dosing and monitoring for cardiopulmonary bypass. A comparison of techniques with measurement of subclinical plasma coagulation. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1990;99(3):518-27.
5. Boisclair MD, Lane DA, Philippou H, Sheikh S, Hunt B. Thrombin production, inactivation and expression during open heart surgery measured by assays for activation fragments including a new ELISA for prothrombin fragment F1 + 2. *Thromb Haemost*. 1993;70(2):253-8.
6. Shuman MA. Thrombin-cellular interactions. *Ann N Y Acad Sci*. 1986;485:228-39.
7. Coughlin SR, Vu TK, Hung DT, Wheaton VI. Characterization of a functional thrombin receptor. Issues and opportunities. *J Clin Invest*. 1992;89(2):351-5.
8. Levin EG, Marzec U, Anderson J, Harker LA. Thrombin stimulates tissue plasminogen activator release from cultured human endothelial cells. *J Clin Invest*. 1984;74(6):1988-95.
9. Brister SJ, Ofosu FA, Buchanan MR. Thrombin generation during cardiac surgery: is heparin the ideal anticoagulant? *Thromb Haemost*. 1993;70(2):259-62.
10. Gorman RC, Ziats NP, Rao AK, Gikakis N, Sun L, Khan MMH, et al. Surface-bound heparin fails to reduce thrombin formation during clinical

- cardiopulmonary bypass. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 1996;111(1):1-11.
11. ANSI/AAMI/ISO 15675: Cardiovascular implants and artificial organs – Cardiopulmonary bypass systems – arterial line blood filters, (2001).
 12. Borowiec JW, Bylock A, van der Linden J, Thelin S. Heparin coating reduces blood cell adhesion to arterial filters during coronary bypass: a clinical study. *Ann Thorac Surg*. 1993;55(6):1540-5.
 13. Kundu SK, Klein MD, Whittlesey GC, Barmatoski SP, Salley SO. Quantitative scanning electron microscopy for the evaluation of thrombosis in extracorporeal circuits. *ASAIO Trans*. 1988;34(3):568-72.
 14. Riddel JP, Jr., Aouizerat BE, Miaskowski C, Lillicrap DP. Theories of blood coagulation. *J Pediatr Oncol Nurs*. 2007;24(3):123-31.
 15. van Geffen M, van Heerde WL. Global haemostasis assays, from bench to bedside. *Thromb Res*. 2012;129(6):681-7.
 16. Brummel-Ziedins KE, Wolberg AS. Global assays of hemostasis. *Curr Opin Hematol*. 2014;21(5):395-403.
 17. Al Dieri R, de Laat B, Hemker HC. Thrombin generation: what have we learned? *Blood Rev*. 2012;26(5):197-203.
 18. Mackie IJ, Pittilo RM. Vascular integrity and platelet function. *Int Anesthesiol Clin*. 1985;23(2):3-21.
 19. Bolliger D, Seeberger MD, Tanaka KA. Principles and practice of thromboelastography in clinical coagulation management and transfusion practice. *Transfus Med Rev*. 2012;26(1):1-13.
 20. Favaloro EJ, Lippi G. Coagulation update: what's new in hemostasis testing? *Thromb Res*. 2011;127 Suppl 2:S13-6.
 21. Ganter MT, Hofer CK. Coagulation monitoring: current techniques and clinical use of viscoelastic point-of-care coagulation devices. *Anesth Analg*. 2008;106(5):1366-75.

22. Bauer KA. Activation markers of coagulation. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol.* 1999;12(3):387-406.
23. Levy JH, Dutton RP, Hemphill JC, 3rd, Shander A, Cooper D, Paidas MJ, et al. Multidisciplinary approach to the challenge of hemostasis. *Anesth Analg.* 2010;110(2):354-64.
24. Perry DJ, Fitzmaurice DA, Kitchen S, Mackie IJ, Mallett S. Point-of-care testing in haemostasis. *Br J Haematol.* 2010;150(5):501-14.
25. Ortmann E, Klein AA, Sharples LD, Walsh R, Jenkins DP, Luddington RJ, et al. Point-of-Care Assessment of Hypothermia and Protamine-Induced Platelet Dysfunction with Multiple Electrode Aggregometry (Multiplate (R)) in Patients Undergoing Cardiopulmonary Bypass. *Anesthesia and Analgesia.* 2013;116(3):533-40.
26. Karthik S, Grayson AD, McCarron EE, Pullan DM, Desmond MJ. Reexploration for bleeding after coronary artery bypass surgery: Risk factors, outcomes, and the effect of time delay. *Annals of Thoracic Surgery.* 2004;78(2):527-34.
27. Greinacher A. The use of direct thrombin inhibitors in cardiovascular surgery in patients with heparin-induced thrombocytopenia. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis.* 2004;30(3):315-27.
28. Bull BS, Hay KL, Herrmann PC. Postoperative bypass bleeding: A bypass-associated dilutional (BAD) coagulopathy? *Blood Cells Molecules and Diseases.* 2009;43(3):256-9.
29. Ternstrom L, Radulovic V, Karlsson M, Baghaei F, Hyllner M, Bylock A, et al. Plasma activity of individual coagulation factors, hemodilution and blood loss after cardiac surgery: A prospective observational study. *Thrombosis Research.* 2010;126(2):E128-E33.
30. Straub A, PeterWendel H, Dietz K, Schiebold D, Peter K, Schoenwaelder SM, et al. Selective inhibition of the platelet phosphoinositide 3-kinase p110

beta as promising new strategy for platelet protection during extracorporeal circulation. *Thrombosis and Haemostasis*. 2008;99(3):609-15.

31. Jongman RM, Zijlstra JG, Kok WF, van Harten AE, Mariani MA, Moser J, et al. Off-pump CABG surgery reduces systemic inflammation compared with on-pump surgery but does not change systemic endothelial responses: a prospective randomized study. *Shock*. 2014;42(2):121-8.

32. Bennett MJ, Weatherall M, Webb G, Dudnikov SF, Lloyd CT. The impact of haemodilution and bypass pump flow on cerebral oxygen desaturation during cardiopulmonary bypass - A comparison of two systems of cardiopulmonary bypass. *Perfusion-Uk*. 2015;30(5):389-94.

33. Souza MHD. Fisiologia do Sangue. Fundamentos da Circulação Extracorpórea. Segunda Edição ed. Rio de Janeiro: Centro Editorial Alfa Rio; 2006. p. 120.

34. Paparella D, Yau TM, Young E. Cardiopulmonary bypass induced inflammation: pathophysiology and treatment. An update. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*. 2002;21(2):232-44.

35. Sims PJ, Faioni EM, Wiedmer T, Shattil SJ. Complement proteins C5B-9 cause release of membrane-vesicles from the platelet surface that are enriched in the membrane receptor for coagulation factor-VA and express prothrombinase activity. *Journal of Biological Chemistry*. 1988;263(34):18205-12.

36. Larsen E, Celi A, Gilbert GE, Furie BC, Erban JK, Bonfanti R, et al. Padgem protein – a receptor that mediates the interaction of activated platelets with neutrophils and monocytes. *Cell*. 1989;59(2):305-12.

37. Celi A, Pellegrini G, Lorenzet R, Deblasi A, Ready N, Furie BC, et al. P-Selectin induces the expression of tissue factor on monocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994;91(19):8767-71.

38. Edmunds LH, Jr., Colman RW. Thrombin during cardiopulmonary bypass. *Annals of Thoracic Surgery*. 2006;82(6):2315-22.
39. JR D, KM T. The systemic inflammatory response syndrome and cardiopulmonary bypas. *Int J Surg*. 2005;2(3):129-40.
40. Ellison N, Behar M, Macvaugh H, Marshall BE. Bradykinin, plasma-protein fraction, and hypotension. *Annals of Thoracic Surgery*. 1980;29(1):15-9.
41. Pang LM, Stalcup SA, Lipset JS, Hayes CJ, Bowman FO, Mellins RB. Increased circulating bradykinin during hypothermia and cardiopulmonary bypass in children. *Circulation*. 1979;60(7):1503-7.
42. Burman JF, Chung HI, Lane DA, Philippou H, Adami A, Lincoln JCR. Role of factor XII in thrombin generation and fibrinolysis during cardiopulmonary bypass. *Lancet*. 1994;344(8931):1192-3.
43. Arnoletti JP, Whitman GJR. Heparin-induced thrombocytopenia in coronary bypass surgery. *Annals of Thoracic Surgery*. 1999;68(2):576-8.
44. Yavari M, Becker RC. Coagulation and fibrinolytic protein kinetics in cardiopulmonary bypass. *J Thromb Thrombolysis*. 2009;27(1):95-104.
45. Garvin S, Fitzgerald D, Muehlschlegel JD, Perry TE, Fox AA, Shernan SK, et al. Heparin dose response is independent of preoperative antithrombin activity in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery using low heparin concentrations. *Anesth Analg*. 2010;111(4):856-61.
46. Hirsh J. Current anticoagulant therapy--unmet clinical needs. *Thromb Res*. 2003;109 Suppl 1:S1-8.
47. Lobato RL, Despotis GJ, Levy JH, Shore-Lesserson LJ, Carlson MO, Bennett-Guerrero E. Anticoagulation management during cardiopulmonary bypass: a survey of 54 North American institutions. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2010;139(6):1665-6.

48. Fitzgerald DJ, Patel A, Body SC, Garvin S. The relationship between heparin level and activated clotting time in the adult cardiac surgery population. *Perfusion*. 2009;24(2):93-6.
49. Slaughter TF, LeBleu TH, Douglas JM, Jr., Leslie JB, Parker JK, Greenberg CS. Characterization of prothrombin activation during cardiac surgery by hemostatic molecular markers. *Anesthesiology*. 1994;80(3):520-6.
50. Koster A, Fischer T, Praus M, Haberkretzl H, Kuebler WM, Hetzer R, et al. Hemostatic activation and inflammatory response during cardiopulmonary bypass: impact of heparin management. *Anesthesiology*. 2002;97(4):837-41.
51. Despotis GJ, Joist JH, Hogue CW, Jr., Alsoufiev A, Kater K, Goodnough LT, et al. The impact of heparin concentration and activated clotting time monitoring on blood conservation. A prospective, randomized evaluation in patients undergoing cardiac operation. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1995;110(1):46-54.
52. Slight RD, Buell R, Nzewi OC, McClelland DB, Mankad PS. A comparison of activated coagulation time-based techniques for anticoagulation during cardiac surgery with cardiopulmonary bypass. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2008;22(1):47-52.
53. Khuri SF, Valeri CR, Loscalzo J, Weinstein MJ, Birjiniuk V, Healey NA, et al. Heparin causes platelet dysfunction and induces fibrinolysis before cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg*. 1995;60(4):1008-14.
54. Kemme MJ, Burggraaf J, Schoemaker RC, Kluft C, Cohen AF. Quantification of heparin-induced TFPI release: a maximum release at low heparin dose. *Br J Clin Pharmacol*. 2002;54(6):627-34.
55. Levy JH, Tanaka KA, Hursting MJ. Reducing thrombotic complications in the perioperative setting: an update on heparin-induced thrombocytopenia. *Anesth Analg*. 2007;105(3):570-82.

56. Gluckman TJ, Segal JB, Schulman SP, Shapiro EP, Kickler TS, Prechel MM, et al. Effect of anti-platelet factor-4/heparin antibody induction on early saphenous vein graft occlusion after coronary artery bypass surgery. *J Thromb Haemost.* 2009;7(9):1457-64.
57. Whitlock R, Crowther MA, Ng HJ. Bleeding in cardiac surgery: Its prevention and treatment - an evidence-based review. *Critical Care Clinics.* 2005;21(3):589-+.
58. de Vroege R, Meerman FT, Eijssman L, Wildevuur WR, Wildevuur CRH, van Oeveren W. Induction and detection of disturbed homeostasis in cardiopulmonary bypass. *Perfusion-Uk.* 2004;19(5):267-76.
59. Chitlur M. Challenges in the laboratory analyses of bleeding disorders. *Thromb Res.* 2012;130(1):1-6.
60. Karon BS. Why is everyone so excited about thromboelastography (TEG)? *Clin Chim Acta.* 2014;436:143-8.
61. McMichael MA, Smith SA. Viscoelastic coagulation testing: technology, applications, and limitations. *Vet Clin Pathol.* 2011;40(2):140-53.
62. Mallett SV, Armstrong M. Point-of-care monitoring of haemostasis. *Anaesthesia.* 2015;70 Suppl 1:73-7, e25-6.
63. Reikvam H, Steien E, Hauge B, Liseth K, Hagen KG, Storkson R, et al. Thrombelastography. *Transfus Apher Sci.* 2009;40(2):119-23.
64. Whiting D, DiNardo JA. TEG and ROTEM: technology and clinical applications. *Am J Hematol.* 2014;89(2):228-32.
65. Gronchi F, Perret A, Ferrari E, Marcucci CM, Fleche J, Crosset M, et al. Validation of rotational thromboelastometry during cardiopulmonary bypass: A prospective, observational in-vivo study. *Eur J Anaesthesiol.* 2014;31(2):68-75.
66. Solomon C, Schochl H, Ranucci M, Schott U, Schlimp CJ. Comparison of fibrin-based clot elasticity parameters measured by free oscillation rheometry

- (ReoRox (R)) versus thromboelastometry (ROTEM (R)). Scand J Clin Lab Invest. 2015;75(3):239-46.
67. Solbeck S, Windelov NA, Baek NH, Nielsen JD, Ostrowski SR, Johansson PI. In-vitro comparison of free oscillation rheometry (ReoRox) and rotational thromboelastometry (ROTEM) in trauma patients upon hospital admission. Blood Coagul Fibrinolysis. 2012;23(8):688-92.
 68. Tynngard N, Lindahl TL, Ramstrom S, Raf T, Rugarn O, Berlin G. Free oscillation rheometry detects changes in clot properties in pregnancy and thrombocytopenia. Platelets. 2008;19(5):373-8.
 69. Ramstrom S, Ranby M, Lindahl TL. The role of platelets in blood coagulation--effects of platelet agonists and GPIIb/IIIa inhibitors studied by free oscillation rheometry. Thromb Res. 2002;105(2):165-72.
 70. Winstedt D, Tynngard N, Olanders K, Schott U. Free oscillation rheometry monitoring of haemodilution and hypothermia and correction with fibrinogen and factor XIII concentrates. Scand J Trauma Resusc Emerg Med. 2013;21:20.
 71. Tynngard N, Berlin G, Samuelsson A, Berg S. Low dose of hydroxyethyl starch impairs clot formation as assessed by viscoelastic devices. Scand J Clin Lab Invest. 2014;74(4):344-50.
 72. Tynngard N, Lindahl TL, Ramstrom S. Assays of different aspects of haemostasis - what do they measure? Thromb J. 2015;13:8.
 73. Maliska AN. Microscopia eletrônica de varredura e microanálise. http://www.usp.br/nanobiodev/wp-content/uploads/MEV_Apostilapdf. 2003.
 74. Kim WG, Kim KB, Yoon CJ. Scanning electron microscopic analysis of arterial line filters used in cardiopulmonary bypass. Artif Organs. 2000;24(11):874-8.

75. Nakajima T, Kawazoe K, Ishibashi K, Kubota Y, Sasaki T, Izumoto H, et al. Reduction of heparin dose is not beneficial to platelet function. *Ann Thorac Surg.* 2000;70(1):186-90.
76. Cane PA, Cook P, Ratcliffe D, Mutimer D, Pillay D. Use of real-time PCR and fluorimetry to detect lamivudine resistance-associated mutations in hepatitis B virus. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43(7):1600-8.
77. Lewin SR, Vesanen M, Kostrikis L, Hurley A, Duran M, Zhang L, et al. Use of real-time PCR and molecular beacons to detect virus replication in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals on prolonged effective antiretroviral therapy. *J Virol.* 1999;73(7):6099-103.
78. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.* 2009;55(4):611-22.
79. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc.* 2008;3(6):1101-8.
80. Ficko T, Cernelc P. Real-time quantitative PCR assay for analysis of platelet glycoprotein IIIa gene expression. *J Biochem Biophys Methods.* 2005;62(3):241-50.
81. Sugden D, Winter P. *Molecular Biomethods Handbook*: Springer; 2008.
82. Bode AP, Read MS, Reddick RL. Activation and adherence of lyophilized human platelets on canine vessel strips in the Baumgartner perfusion chamber. *J Lab Clin Med.* 1999;133(2):200-11.
83. Nakano A, Harada T, Morikawa S, Kato Y. Expression of leukocyte common antigen (CD45) on various human leukemia/lymphoma cell lines. *Acta Pathol Jpn.* 1990;40(2):107-15.
84. von Elm E, Altman DG, Egger M, Pocock SJ, Gøtzsche PC, Vandenbroucke JP, et al. The Strengthening the Reporting of Observational

Studies in Epidemiology (STROBE) statement: guidelines for reporting observational studies. *Lancet*. 2007;370(9596):1453-7.

85. Vandenbroucke JP, von Elm E, Altman DG, Gotzsche PC, Mulrow CD, Pocock SJ, et al. Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE): explanation and elaboration. *PLoS Med*. 2007;4(10):e297.

86. Vandenbroucke JP, von Elm E, Altman DG, Gotzsche PC, Mulrow CD, Pocock SJ, et al. Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE): explanation and elaboration. *Epidemiology*. 2007;18(6):805-35.

87. Piccioni MA, Leirner AA, Auler JO, Jr. Comparison of pH-stat versus Alpha-stat during hypothermic cardiopulmonary bypass in the prevention and control of acidosis in cardiac surgery. *Artif Organs*. 2004;28(4):347-52.

88. Despotis GJ, Skubas NJ, Goodnough LT. Optimal management of bleeding and transfusion in patients undergoing cardiac surgery. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*. 1999;11(2):84-104.

89. Miana LA, Atik FA, Moreira LF, Hueb AC, Jatene FB, Auler Junior JO, et al. Fatores de risco de sangramento no pós-operatório de cirurgia cardíaca em pacientes adultos. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2004;19(3):280-6.

90. Haase M, Bellomo R, Matalanis G, Calzavacca P, Dragun D, Haase-Fielitz A. A comparison of the RIFLE and Acute Kidney Injury Network classifications for cardiac surgery-associated acute kidney injury: a prospective cohort study. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2009;138(6):1370-6.

91. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Simoons ML, Chaitman BR, White HD, et al. Third universal definition of myocardial infarction. *Circulation*. 2012;126(16):2020-35.

92. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med.* 2003;31(4):1250-6.
93. Calandra T, Cohen J, International Sepsis Forum Definition of Infection in the ICUCC. The international sepsis forum consensus conference on definitions of infection in the intensive care unit. *Crit Care Med.* 2005;33(7):1538-48.
94. Dawson B, Trapp R. *Bioestatística básica e clínica.* 3.ed. ed. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill Interamericana; 2003.
95. Fletcher RH, Fletcher SW, Wagner EH. *Epidemiologia clínica: elementos essenciais.* 3.ed. ed. Porto Alegre: Artes Médicas; 1996.
96. Vieira S. *Bioestatística - tópicos avançados.* Rio de Janeiro: Campus; 2003.
97. Hulley SB. *Delineando a pesquisa clínica: uma abordagem epidemiológica.* 2.ed. ed. Porto Alegre: Artmed; 2003.
98. Basu J, Kundu M, Rakshit MM, Chakrabarti P. Abnormal erythrocyte membrane cytoskeleton structure in chronic myelogenous leukaemia. *Biochim Biophys Acta.* 1988;945(2):121-6.
99. Pugsley W, Klinger L, Paschalis C, Treasure T, Harrison M, Newman S. The impact of microemboli during cardiopulmonary bypass on neuropsychological functioning. *Stroke.* 1994;25(7):1393-9.
100. Taggart DP, Bhattacharya K, Meston N, Standing SJ, Kay JD, Pillai R, et al. Serum S-100 protein concentration after cardiac surgery: a randomized trial of arterial line filtration. *Eur J Cardiothorac Surg.* 1997;11(4):645-9.
101. Whitaker DC, Stygall JA, Newman SP, Harrison MJ. The use of leucocyte-depleting and conventional arterial line filters in cardiac surgery: a systematic review of clinical studies. *Perfusion.* 2001;16(6):433-46.

102. Affeld K, Goubergrits L, Kertzscher U, Gadischke J, Reininger A. Mathematical model of platelet deposition under flow conditions. *Int J Artif Organs*. 2004;27(8):699-708.
103. David T, Thomas S, Walker PG. Platelet deposition in stagnation point flow: an analytical and computational simulation. *Med Eng Phys*. 2001;23(5):299-312.
104. Lee D, Chiu YL, Jen CJ. Platelet adhesion onto the wall of a flow chamber with an obstacle. *Biorheology*. 1997;34(2):111-26.
105. Li S, Price R, Phiroz D, Swan K, Crane TA. Systemic inflammatory response during cardiopulmonary bypass and strategies. *J Extra Corpor Technol*. 2005;37(2):180-8.
106. Gorbet MB, Sefton MV. Biomaterial-associated thrombosis: roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes. *Biomaterials*. 2004;25(26):5681-703.
107. Chamberlain KG, Tong M, Penington DG. Properties of the exchangeable splenic platelets released into the circulation during exercise-induced thrombocytosis. *Am J Hematol*. 1990;34(3):161-8.
108. Kondo C, Tanaka K, Takagi K, Shimono T, Shinpo H, Yada I, et al. Platelet dysfunction during cardiopulmonary bypass surgery. With special reference to platelet membrane glycoproteins. *ASAIO J*. 1993;39(3):M550-3.
109. Society of Thoracic Surgeons Blood Conservation Guideline Task F, Ferraris VA, Brown JR, Despotis GJ, Hammon JW, Reece TB, et al. 2011 update to the Society of Thoracic Surgeons and the Society of Cardiovascular Anesthesiologists blood conservation clinical practice guidelines. *Ann Thorac Surg*. 2011;91(3):944-82.
110. Benfatti RA, Carli AF, Silva GV, Dias AE, Goldiano JA, Pontes JC. Epsilon-aminocaproic acid influence in postoperative [corrected] bleeding and

hemotransfusion [corrected] in mitral valve surgery. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2010;25(4):510-5.

111. Fergusson DA, Hebert PC, Mazer CD, Fremes S, MacAdams C, Murkin JM, et al. A comparison of aprotinin and lysine analogues in high-risk cardiac surgery. *N Engl J Med.* 2008;358(22):2319-31.

112. Bennett-Guerrero E, Sorohan JG, Canada AT, Ayuso L, Newman MF, Reves JG, et al. epsilon-Aminocaproic acid plasma levels during cardiopulmonary bypass. *Anesth Analg.* 1997;85(2):248-51.

113. Whitten CW, Greilich PE, Ivy R, Burkhardt D, Allison PM. D-Dimer formation during cardiac and noncardiac thoracic surgery. *Anesth Analg.* 1999;88(6):1226-31.

114. Shibamiya A, Tabuchi N, Chung J, Sunamori M, Koyama T. Formation of tissue factor-bearing leukocytes during and after cardiopulmonary bypass. *Thromb Haemost.* 2004;92(1):124-31.