UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA

THIAGO AUGUSTO AZEVEDO MARANHÃO CARDOSO

Avaliação da resposta inflamatória sistêmica com o uso do sevoflurano durante a circulação extracorpórea na cirurgia de revascularização do miocárdio

São Paulo
2020

THIAGO AUGUSTO AZEVEDO MARANHÃO CARDOSO

Avaliação da resposta inflamatória sistêmica com o uso do sevoflurano durante a circulação extracorpórea na cirurgia de revascularização do miocárdio

VERSÃO CORRIGIDA

(Versão original encontra-se na unidade que aloja o programa de pós-graduação)

Tese apresentada ao Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia – Entidade Associada da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em ciências.

Área de concentração: Medicina, Tecnologia e Intervenção em Cardiologia.

Orientador: Prof. Dr. Mário Hiroyuki Hirata

Coorientador: Prof. Dr. Caetano Nigro Neto

São Paulo
2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Preparada pela Biblioteca do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia

©reprodução autorizada pelo autor

Cardoso, Thiago Augusto Azevedo Maranhão

Avaliação da resposta inflamatória sistêmica com o uso do sevoflurano durante a circulação extracorpórea na cirurgia de revascularização do miocárdio / Thiago Augusto Azevedo Maranhão Cardoso. – São Paulo, 2020.

Tese (doutorado)-Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia Universidade de São Paulo
Área de Concentração: Medicina, Tecnologia e Intervenção em Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. Mário Hiroyuki Hirata
Coorientador: Prof. Dr. Caetano Nigro Neto

Descritores: 1. Sevoflurano. 2. Revascularização Miocárdica 3. Circulação Extracorpórea. 4. Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica.

Nome: CARDOSO, Thiago Augusto Azevedo Maranhão

Título: Avaliação da resposta inflamatória sistêmica com o uso do sevoflurano durante a circulação extracorpórea na cirurgia de revascularização do miocárdio

Tese apresentada ao Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia – Entidade Associada da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em ciências.

Aprovado em:

Comissão julgadora da tese de doutorado

Prof. Dr. Mário Hiroyuki Hirata - Presidente
Instituição: Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo

Prof. Dr. _____
Instituição _____
Julgamento _____

Prof. Dr. _____
Instituição _____
Julgamento _____

Prof. Dr. _____
Instituição _____
Julgamento _____

DEDICATÓRIA

A Deus, em primeiro lugar, que sempre me protegeu e me abençoou para chegar onde cheguei.

Aos meus pais, Waldir e Elizeth, que me incentivaram todos os dias e que nunca me deixaram desistir dos meus sonhos me dando todas as oportunidades na vida.

Aos meus avós, que sempre oraram para o meu sucesso pessoal e profissional.

À minha querida irmã Camila, um anjo na minha vida.

À minha esposa, Mayanne, uma mulher guerreira, dedicada, amorosa, fiel e fonte de inspiração para minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Mário Hiroyuki Hirata, pelas ideias, pelo comprometimento, pela disponibilidade e pelos valiosos ensinamentos que permitiram a realização dessa tese.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Caetano Nigro Neto, pela dedicação incondicional à minha tese de doutorado, pelos ensinamentos na minha formação em anestesia cardiovascular e por ter me acolhido como um filho.

À Prof. Dra. Amanda Guerra de Moraes Rego, pela sua dedicação ao desenvolvimento do programa de doutorado.

Aos membros da banca de qualificação, Prof. Dra. Maria José Carvalho Carmona, Prof. Dr. Pedro Silvio Farsky, Profa. Dra. Hui-Tzu Lin Wang pelas correções e valiosas sugestões que contribuíram para o aprimoramento desta tese.

Aos meus amigos Carlos Gustavo dos Santos Silva, Pedro Lobo, José Leonardo Saurith, Gretel Nicolau e Martha Helena, por me ajudarem e contribuírem para o aperfeiçoamento desta tese.

Aos órgãos que fomentaram essa tese FAPESP e PROAB com recursos essenciais.

Ao Laboratório de Investigação Molecular em Cardiologia, pela dedicação e pelo comprometimento em todas as etapas desta tese em especial a Dra. Gisele Medeiros Bastos e a Dra. Jéssica Bassani Borges.

Ao estatístico, João Ítalo, pela ajuda nas análises e pelos cálculos estatísticos.

Às secretárias da pós-graduação do IDPC-USP, Janeide Alves e Janete Vieira, pelas orientações e pela paciência.

Aos colegas de pós-graduação pela parceria em vários momentos na elaboração desta tese.

Aos pacientes que aceitaram fazer parte desse estudo e que acreditaram no aperfeiçoamento da medicina.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

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

Universidade de São Paulo. Sistema Integrado de Bibliotecas. Diretrizes para apresentação de Dissertações e Teses da USP - Parte IV (Vancouver); 3ª edição - São Paulo: 2016. Elaborado por Vânia Martins Bueno de Oliveira Funaro, Maria Cláudia Pestana, Maria Cristina Cavarette Dziabas, Eliana Maria Garcia, Maria Fátima dos Santos, Maria Marta Nascimento, Suely Campos Cardoso.

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

RESUMO

CARDOSO TAAM. Avaliação da resposta inflamatória sistêmica com o uso do sevoflurano durante a circulação extracorpórea na cirurgia de revascularização do miocárdio. São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia; 2020

Introdução: Atualmente, a anestesia para cirurgia de revascularização do miocárdio segue uma abordagem que visa combater os processos de lesões causados pela isquemia e reperfusão, por meio do pré-condicionamento cardíaco isquêmico remoto e farmacológico, como o proporcionado pelos anestésicos inalatórios, o que pode gerar uma redução nos processos inflamatórios associados à circulação extracorpóra, conforme modelo experimental. **Objetivo:** Avaliar o efeito anti-inflamatório do Sevoflurano nos pacientes submetidos a revascularização do miocárdio com CEC. **Métodos:** Foram incluídos total de 100 pacientes, submetidos a revascularização do miocárdio eletiva com CEC, e foram alocados aleatoriamente em 2 grupos: Grupo SEVO (n=50) e Grupo CONTROLE (n=50), com e sem uso de Sevoflurano durante a CEC, respectivamente. Foram anotadas informações biodemográficas e clínicas do pré e pós-operatório e coletadas também as amostras de sangue periférico para dosagens bioquímicas e análise da biologia molecular. Foram avaliados; PMN-elastase IL-1b, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNFa e TGFb, além da expressão gênica e dos microRNAs envolvidos no processo inflamatório. A análise estatística foi feita comparando os dois grupos. **Resultados:** Os parâmetros biodemográficos e clínicos pré-operatórios foram homogêneos entre os grupos. As medicações em uso pré-operatório mostraram uma diferença significativa para o uso do inibidor da enzima conversora de angiotensina no grupo SEVO (p=0,046). Os dados pós-operatórios mostraram um tempo de intubação maior no grupo SEVO (p=0,049), no entanto, sem diferença nas complicações e na mortalidade. A maioria das expressões gênicas nos leucócitos não mostraram diferença. As citocinas pró-inflamatórias circulantes IL-1B (p=0,004) e IL-8 (p=0,029) a IL-6 (p=0,009) estavam diminuídas no grupo SEVO. As citocinas anti-inflamatórias IL-4 (p=0,021) estava diminuída no grupo SEVO e IL10 (p=0,004) aumentada no grupo CONTROLE. Os microRNAs que atuam na regulação destas citocinas

foram menos expressos no grupo SEVO. **Conclusão:** No contexto da cirurgia de revascularização do miocárdio com CEC, o sevoflurano pode diminuir o processo inflamatório, regulando os mecanismos pós-transcricionais mediados pelos microRNAs na síntese de citocinas pró e anti-inflamatórias.

Palavras-chave: Sevoflurano. Revascularização do miocárdio. Circulação extracorpórea. Resposta inflamatória.

Descritores: Sevoflurano. Revascularização Miocárdica. Circulação Extracorpórea. Anestesia por Inalação. Síndrome de Resposta Inflamatória Sistêmica.

ABSTRACT

CARDOSO TAAM. Evaluation of the systemic inflammatory response with the use of sevoflurane during cardiopulmonary bypass in myocardial revascularization surgery. São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia; 2020.

Introduction: Currently, anesthesia for myocardial revascularization surgery follows an approach that aims to combat the processes of injuries caused by ischemia and reperfusion, through remote ischemic and pharmacological cardiac preconditioning, such as that provided by inhaled anesthetics, which can generate a reduction in the inflammatory processes associated with extracorporeal circulation, according to the experimental model. **Objective:** To evaluate the anti-inflammatory effect of Sevoflurane in patients undergoing coronary artery bypass graft with CPB. **Methods:** A total of 100 patients who underwent elective myocardial revascularization with CPB were included, and were randomly allocated to 2 groups: SEVO Group (n = 50) and CONTROL Group (n = 50), with and without the use of Sevoflurane during CEC, respectively. Pre-and post-operative bio-demographic and clinical information were recorded and peripheral blood samples were also collected for biochemical measurements and analysis of molecular biology. Were evaluated; PMN-elastase IL-1b, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNFa and TGFb, in addition to gene expression and microRNAs involved in the inflammatory process. Statistical analysis was performed comparing the two groups. **Results:** The preoperative bioemographic and clinical parameters were homogeneous between the groups. Preoperative medications showed a significant difference for the use of the angiotensin-converting enzyme inhibitor in the SEVO group ($p = 0.046$). Postoperative data showed a longer intubation time in the SEVO group ($p = 0.049$), however, with no difference in complications and mortality. Most leukocyte gene expressions showed no difference. Circulating pro-inflammatory cytokines IL-1B ($p = 0.004$) and IL-8 ($p = 0.029$) to IL-6 ($p = 0.009$) were decreased in the SEVO group. The anti-inflammatory cytokines IL-4 ($p = 0.021$) was decreased in the SEVO group and IL10 ($p = 0.004$) increased in the CONTROL group. The microRNAs that act in the regulation of these cytokines were less expressed in the SEVO group. **Conclusion:** In the context of myocardial revascularization surgery with CPB, sevoflurane can decrease the

inflammatory process, regulating microRNA-mediated post-transcriptional mechanisms in the synthesis of pro and anti-inflammatory cytokines.

Keywords: Sevoflurane. Revascularization of the myocardium. Extracorporeal circulation. Inflammatory response.
Descriptors: Sevoflurane. Myocardial revascularization. Extracorporeal circulation. Inhalation anesthesia. Systemic Inflammatory Response Syndrome.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS
LISTA DE SÍMBOLOS
LISTA DE FIGURAS
LISTA DE TABELAS

1 INTRODUÇÃO.....20
1.1 Cirurgia de Revascularização do Miocárdio com Circulação Extracorpórea.....21
1.2 A resposta inflamatória durante a CEC e suas consequências.....22
1.3 Anestésicos Inalatórios na CEC e sua influência na resposta inflamatória....23
1.4 Origem e papel dos miRNAs no processo epigenético.....25
1.5 Papel dos miRNAs nas doenças e no uso de anestésicos inalatórios.....27
1.6 Papel dos miRNAs na resposta inflamatória.....28
1.7 Como o sevoflurano pode atuar no processo epigenético.....29
2 OBJETIVO.....32
3 MÉTODOS.....34
3.1 Aspecto ético.....35
3.2 Período do estudo.....35
3.3 Casuística.....35
3.4 Critérios de Inclusão.....36
3.5 Critérios de Não-inclusão.....36
3.6 Técnica Anestésica e CEC.....37
3.6.1 Anestesia.....37
3.6.2 A CEC.....37
3.7 Protocolos de resgate.....38
3.8 Coleta de dados.....39
3.9 Determinação da concentração plasmática dos marcadores inflamatórios....41
3.10 Análise de expressão gênica de citocinas e de miRNA leucocitários.....41
3.10.1 Extração do RNA de leucócitos circulantes.....41
3.10.2 Análise de expressão gênica das citocinas.....42

3.10.3 Análise da expressão de miRNA leucocitários.....43
3.11 Análise estatística.....43
4 RESULTADOS.....44
4.1 Dados biodemográficos, clínicos pré e pós-operatórios e medicações pré-operatórias.....45
4.2 Avaliação da expressão gênica de citocinas e de miRNA leucocitários.....47
4.2.1 Análise da expressão gênica de citocinas.....47
4.2.2 Análise da expressão de miRNA leucocitários.....50
4.3 Determinação da concentração plasmática dos marcadores inflamatórios....58
5 DISCUSSÃO.....62
6 LIMITAÇÕES DO ESTUDO.....68
7 CONCLUSÃO.....70
8 ANEXOS.....72
8.1 ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....73
8.2 ANEXO B – Registro do clinicaltrials.gov.....76
9 APÊNDICES.....77
9.1 APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....78
9.2 APÊNDICE B – Ficha de Dados demográficos e clínicos pré e pós-operatórios 82
REFERÊNCIAS.....85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC/AHA	***American College of Cardiology/American Heart Association***
AI	**Anestésicos Inalatórios**
ASA	***American Society of Anesthesiologists***
AVE	**Acidente Vascular Encefálico**
Bcl-2	***B-cell lymphoma protein* 2**
B_2M	**beta 2-microglobulina**
CAM	**Concentração Alveolar Mínima**
CEC	**Circulação Extracorpórea**
CEP	**Comitê de Ética e Pesquisa em Humanos**
DAC	**Doença Arterial Coronariana**
DNA	**Ácido Desoxirribonucleico**
DP	**Desvio Padrão**
DPOC	**Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica**
ERO	**Espécie Reativa de Oxigênio**
FAPO	**Fibrilação atrial pós-operatória**
GAPDH	**gliceraldeido 3-fosfato desidrogenase**
HCYTOMAG-60	**Citocina Humana/Painel de esfera magnética de quimiocina**
HMBS	**hidroximetilbilano sintase**
HPRT1	**hipoxantina fosforobosiltransferase 1**
HSP3MAG-63K	**Painel 3 de esfera magnética de sepsis Humana**
IAM	**Infarto Agudo do Miocárdio**
ICC	**Insuficiência Cardíaca Congestiva**
IDPC/SP	**Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia de São Paulo**
IL-1B	**Interleucina 1 beta**
IL-4	**Interleucina 4**
IL-6	**Interleucina 6**
IL-8	**Interleucina 8**
IL-10	**Interleucina 10**
IMC	**Índice de Massa Corpórea**
IPA®	***Ingenuity*® Análise de Rota**
IR	**Isquemia-Reperfusão**
K^+_{ATP}	**Canais de potássio dependentes de ATP**

lnc-RNA	**RNA Longo não codificante**
mRNA	**RNA mensageiro**
miRNA	**Micro RNA**
miRNoma	**Perfil de expressão global de micro RNAs**
miR-466l	**Micro RNA-466l**
PIRM	**Pré-condicionamento Isquêmico Remoto do Miocárdio**
PKC	**Proteína cinase C**
PMN-elastase	**Elastase de Polimorfonuclear**
pré-mRNA	**pré-RNA mensageiro**
RBP	**Proteína Ligante de Ácido Ribonucleico**
RNA	**Ácido Ribonucleico**
ROS	**Reactive Oxygen Species**
SDHA	**succinato desidrogenase subunidade A flavoproteína**
TCA	**Tempo de Coagulação Ativado**
TCLE	**Termo de Livre Consentimento e Esclarecido**
TGF-B	**Fator de crescimento transformador beta**
TGFBMAG-64K-01	**Kit de TGF-β1 de ensaio único por esfera magnética**
TNF-A	**Fator de Necrose Tumoral alfa**
UBC	**ubiquitina C**
UTI	**Unidade de Terapia Intensiva**
3'-UTR	**Região 3' não traduzida**

LISTA DE SÍMBOLOS

Ca^{++}	**Íon cálcio**
cmH_2O	**Centímetros de água**
CO_2	**Dióxido de Carbono**
K^+	**Íon potássio**
kg	**Quilograma**
kg/m^2	**Quilograma por metro quadrado**
$L.min^{-1}.m^{-2}$	**Litros por minuto por metro quadrado**
log	**Logarítmo**
m	**Metro**
mg	**Miligrama**
mg/dL	**Miligrama por decilitro**
mg/kg	**Miligrama por quilograma**
mg/kg/h	**Miligrama por quilograma por hora**
mL	**Mililitro**
mL/kg	**Mililitro por quilograma**
mmHg	**Milímetro de mercúrio**
mmol/L	**Milimol por litro**
Na^+	**Íon sódio**
ng/mL	**Nanograma por mililitro**
pg/mL	**Picograma por mililitro**
O_2	**Oxigênio**
p	**Probabilidade de significância**
U	**Unidade**
U/kg	**Unidade por quilograma**
µ	**Micro**
µg/kg	**Micrograma por quilograma**
%	**Porcentagem**
º C	**Graus Celsius**

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Modelo esquemático do circuito de circulação extracorpórea e seus principais componentes.....22
Figura 2 – Esquema da adaptação do vaporizador calibrado ao circuita da CEC..24
Figura 3 – Mecanismos epigenéticos de regulação gênica.....26
Figura 4 – Biogênese do miRNAs.....27
Figura 5 – Vias de ação do Sevoflurano no nível intracelular.....30
Figura 6 – Etapas de coleta das amostras de sangue nos dois grupos do estudo (SEVO e CONTROLE) que passaram por análise molecular.....45
Figura 7 – Efeito do anestésico sevoflurano sobre a expressão dos genes *TGFB1, ELANE, IL1B, CXCL8* e *TNFA* durante a CEC.....49
Figura 8 – Análise de expressão diferencial de 84 miRNAs no grupo CONTROLE, no tempo pré-CEC comparado com pós-CEC.....50
Figura 9 – Análise de expressão diferencial de 84 miRNAs no grupo SEVO, no tempo pré-CEC comparado com pós CEC.....52
Figura 10 – Análise de expressão de 84 miRNAs no tempo pré-CEC.....53
Figura 11 – Análise de expressão de 84 miRNAs no tempo pós-CEC.....55
Figura 12 – Interação entre os miRNAs diferentemente expressos, os genes e as proteínas analisados.....57
Figura 13 – Efeito do anestésico sevoflurano na concentração de TGFβ1, PMN-elastase, IL-1β, IL-8, TNFα, IL-10, IL-4 e IL-6 após a CEC.....59

LISTA DE TABELA

Tabela 1 – Principais fases e datas do estudo.....35
Tabela 2 – Dados biodemográficos e clínicos pré-operatórios.....45
Tabela 3 – Uso de medicamentos entre os pacientes incluídos no estudo.....46
Tabela 4 – Dados clínicos pós-operatórios.....47
Tabela 5 – miRNAs do grupo CONTROLE com expressão diferenciada no tempo pré-CEC em relação ao pós-CEC.....51
Tabela 6 – miRNAs do grupo SEVO com expressão diferenciada no tempo pré-CEC em relação ao pós-CEC.....52
Tabela 7 – Cinco miRNAs com expressão diminuída no grupo que usou sevoflurano no tempo pré-CEC.....53
Tabela 8 – miRNAs com expressão reduzida no grupo SEVO em relação ao CONTROLE.....55
Tabela 9 – Predição de interação entre os miRNA cuja expressão foi reduzida no grupo SEVO e os genes analisados.....57
Tabela 10 – Efeito do anestésico sevoflurano sobre a concentração de TGFβ1, PMN-elastase, IL-1β, IL-8, TNFα, IL-10, IL-4 e IL-6 após CEC.....61

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Cirurgia de Revascularização do Miocárdio com Circulação Extracorpórea

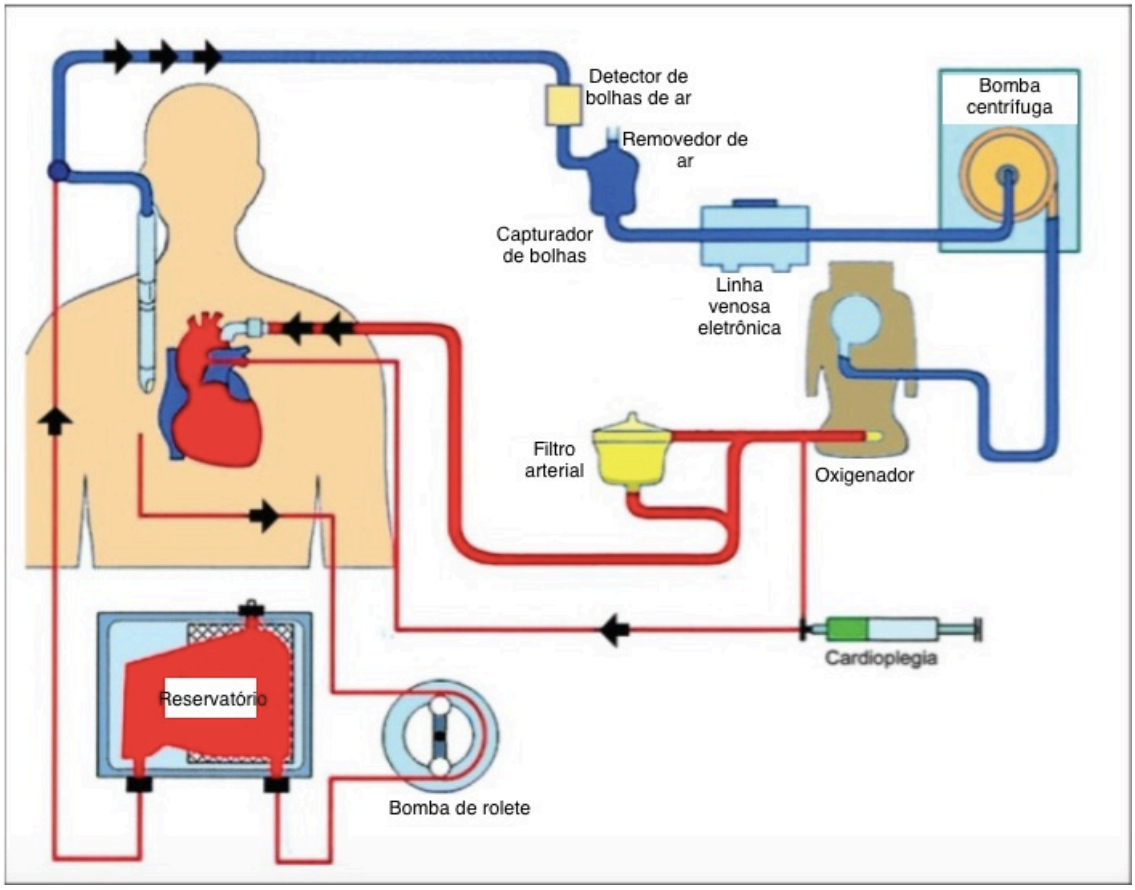
As doenças cardiovasculares representam as principais causas de óbitos no Brasil e no mundo, sendo a doença arterial coronariana (DAC) a base para o infarto agudo do miocárdio (IAM)[1]. Dentro deste contexto, a revascularização cirúrgica do miocárdio prevalece como uma das principais formas de tratamento para a DAC. Segundo o projeto BYPASS reunindo dados de 17 centros em todo o Brasil no ano de 2018, a taxa de mortalidade pós-operatória intra-hospitalar é de 2,8%[2].

O desenvolvimento da cirurgia cardiovascular ao longo do século 20 evoluiu junto com a máquina de circulação extracorpórea (CEC), conhecida também como máquina coração-pulmão. Desde que John Gibbon, em maio de 1953, realizou o primeiro procedimento com CEC para corrigir um defeito do septo atrial, diversos outros problemas cardiovasculares puderam ser abordados através da cirurgia cardíaca, aumentando a perspectiva de tratamento para muitas pessoas[3].

A CEC oferece condições favoráveis ao cirurgião cardíaco na medida em que paralisa o coração e os pulmões e mantém uma adequada oferta de oxigênio aos demais órgãos do corpo, conforme ilustra a Figura 1[4]. Porém, ela também pode estar associada com prejuízos ao paciente, como por exemplo, o trauma causado devido ao contato do sangue com o material não biocompatível da CEC e pelo tipo de fluxo de perfusão tecidual, os quais provocam um aumento da resposta inflamatória, podendo levar a consequentes danos clínicos ao paciente, como disfunção cognitiva e lesão renal aguda[5].

Atualmente, a anestesia para cirurgia de revascularização do miocárdio segue uma abordagem que visa combater as lesões de isquemia e reperfusão (IR) através do pré-condicionamento cardíaco isquêmico remoto e farmacológico, como o proporcionado pelos anestésicos inalatórios, o que pode gerar uma redução nos processos inflamatórios associados à CEC[6,7].

Figura 1 – Modelo esquemático do circuito de circulação extracorpórea e seus principais componentes



O sangue do indivíduo é drenado pela via venosa (azul), passando pelo chamado oxigenador, onde ocorrem as trocas gasosas (retirada do CO2 e entrada de O2) e depois devolvido ao corpo do paciente oxigenado pela via arterial (vermelho). **Fonte:** Adaptada de Alsatli (2012).

1.2 A resposta inflamatória durante a CEC e suas consequências

Durante o período da CEC ocorre uma superexposição de elementos sanguíneos ao revestimento não endotelial do circuito, essa exposição ativa o sistema complemento através da via alternativa e o sistema de coagulação pela via do fator XIIa com produção de bradicininas e consequente ativação da via intrínseca. Concomitantemente, ocorre a lesão endotelial propriamente dita que expõe o fator tecidual e ativa a via extrínseca, porém a resposta inflamatória estará completa quando a injúria das lesões de IR acontece no cenário da cirurgia cardiovascular com CEC[8].

Em função desse processo existem inúmeras alterações fisiológicas associadas que podem afetar o sistema nervoso central, os rins, o fígado, os pulmões e o coração. Essas alterações são decorrentes dessa injúria que tem início durante a CEC, e que

produzem repercussões sistêmicas capazes de desregular toda homeostase do organismo. Em relação aos problemas inerentes à cirurgia cardíaca com CEC destacam-se aquelas relacionados ao sistema nervoso central. Atualmente, 25% a 80% dos pacientes evoluem com algum déficit cognitivo e 1% a 5% podem sofrer um acidente vascular encefálico (AVE)[4].

O sistema de defesa que é ativado ao entrar em contato com o circuito não biocompatível da CEC produz resposta inflamatória pela ativação de leucócitos e consequente liberação de marcadores, como a elastase Polimorfonuclear (PMN-elastase), as interleucinas 1 beta, 6 e 8 (IL-1b, IL-6 e IL-8) e fator de necrose tumoral alfa (TNFa)[9] que juntos podem provocar as alterações orgânicas.

O processo inflamatório, que é inerente ao procedimento, poderá ser mais ou menos intenso dependendo de alguns fatores como: a idade dos pacientes, cirurgias combinadas, arteriopatias extracardíacas e níveis sanguíneos de leucócitos pré e pós-operatórios (especialmente nas primeiras 24 horas pós cirurgia cardíaca), como observou uma coorte retrospectiva que analisou dados de 502 pacientes submetidos a cirurgias cardíacas com CEC[10].

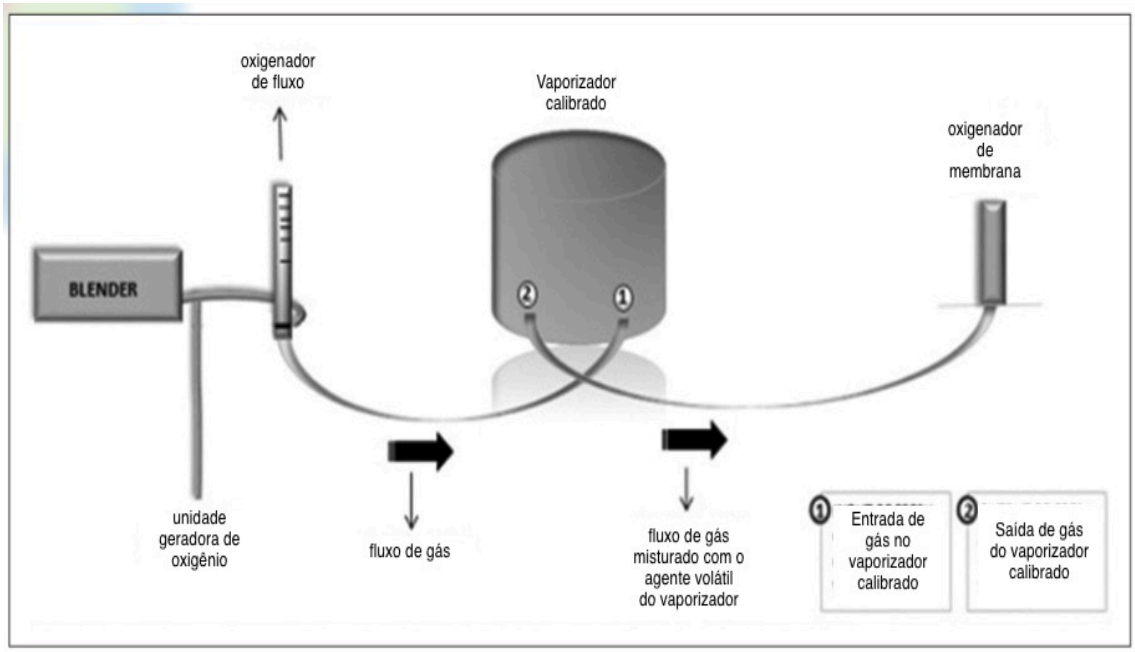
1.3 Anestésicos Inalatórios na CEC e sua influência na resposta inflamatória

Atualmente, alguns estudos vêm tentando demonstrar que a resposta inflamatória durante a CEC pode ser atenuada quando há o uso de agentes anestésicos inalatórios (AI), em particular, o sevoflurano[9]. Agentes inalatórios como sevoflurano são capazes de reduzir os efeitos do processo de IR, conhecido como pré-condicionamento tecidual. Acredita-se que essa resposta seja devido à atenuação na liberação de marcadores inflamatórios[11] e/ou à preservação do glicocálix vascular que é um componente importante na estabilidade do endotélio[12,13]. No entanto, até o momento existem poucos trabalhos que confirmam esse benefício na cirurgia cardíaca com CEC.

Segundo dois grandes estudos, os AI são capazes de reduzir o risco de infarto pós-operatório e algumas outras vantagens como redução no tempo de intubação e do tempo de internação na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) e hospitalar. Esses estudos demonstraram inclusive impacto na mortalidade pós-operatória[14,15]. Tendo sido analisados aproximadamente 40 mil intervenções cirúrgicas somando os dois estudos citados, temos um grande indício da importância dos AIs nos desfechos cardíacos e não cardíacos no pós-operatório.

O uso de AI durante a CEC foi descrito pela primeira vez em 1974[16]. Sua utilização em cirurgia cardíaca vem sendo justificada por promoverem um maior efeito cardioprotetor e por evidências de redução da mortalidade[17,18,19]. Apesar da técnica para a sua utilização durante a CEC seguir um método adaptado, esta pode ser feita de forma segura desde que alguns aspectos técnicos de instalação sejam seguidos[20] (Figura 2).

Figura 2 – Esquema da adaptação do vaporizador calibrado ao circuita da CEC



Note que o fluxo de gás que sai do Blender deve passar por dentro do vaporizador antes de chegar misturado ao agente (anestésico inalatório) no oxigenador de membrana. **Fonte:** Adaptado de Nigro Neto e colaboradores (2016).

Quando comparado a outros agentes anestésicos, o uso do AI durante toda a cirurgia, inclusive durante a CEC, apresenta uma menor elevação dos valores de troponina I, o que pode significar um impacto importante nos desfechos pós-operatórios[21].

Em 2007, o *American College of Cardiology/American Heart Association* (ACC/AHA) recomendou o uso dos AIs em cirurgias não cardíacas, e a manutenção da anestesia geral em pacientes de risco para evento coronariano agudo. E em 2011, foi publicado o primeiro consenso mundial de condutas que reduzem a mortalidade dos pacientes submetidos à cirurgia cardíaca. Dentre essas condutas, destaca-se a administração de AI halogenado durante a cirurgia[22]. Baseado nesses conceitos, o uso de

AI halogenado passou a se relacionar não apenas com a manutenção da anestesia geral, como também numa possível terapêutica para o paciente cardiopata.

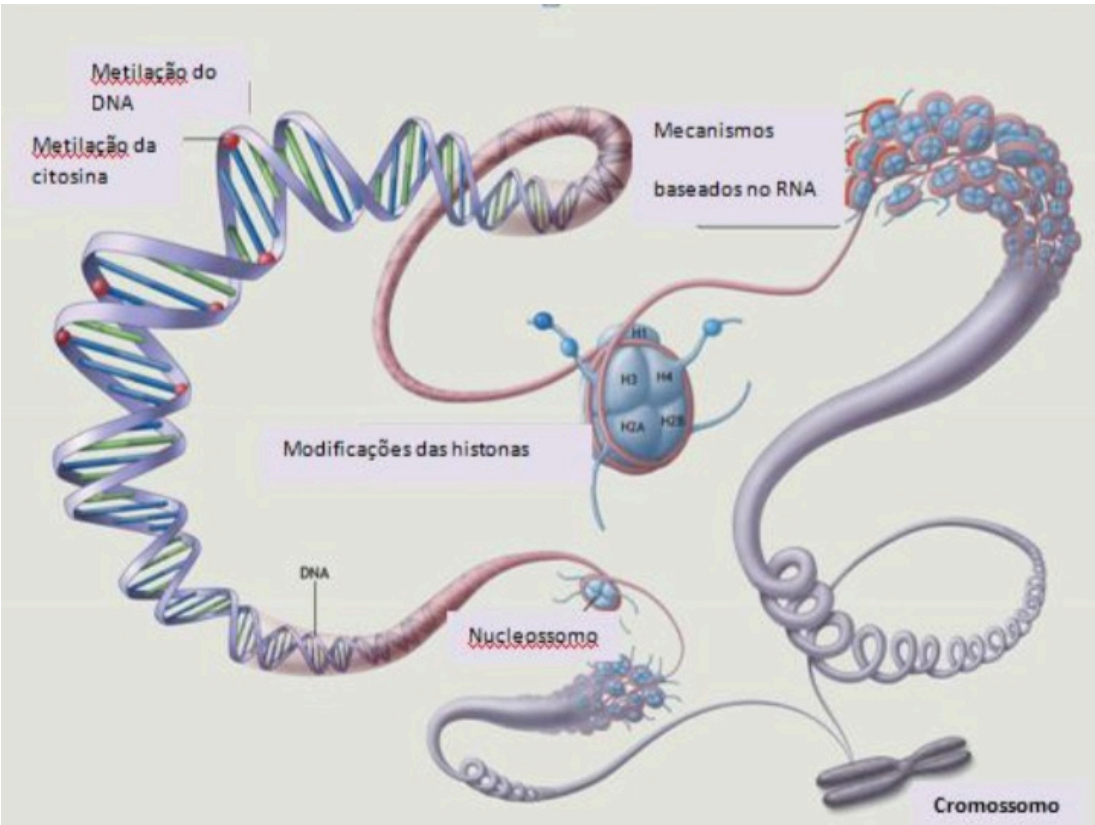
Nos trabalhos que avaliam o efeito dos anestésicos inalatórios na redução da resposta inflamatória durante a CEC, o sevoflurano tem sido o mais utilizado[23,24,25]. Acredita-se que o sevoflurano contribua para a proteção de órgãos-alvo no processo de IR que ocorre durante a CEC[26]. No entanto, o mecanismo pelo qual essa proteção acontece pressupõe seu papel na redução da resposta inflamatória, porém essa hipótese ainda não está completamente elucidada.

Uma das hipóteses seria que o sevoflurano poderia agir na via dos canais de cálcio (Ca^{2++}) do tipo L, semelhante ao que ocorre com o pré-condicionamento isquêmico em que a entrada de cálcio na célula evitaria apoptose do musculo cardíaco[27]. A IR parece fazer com que os radicais livres de oxigênio ativem uma via de sinalização associada ao gene anti-oxidante Bcl-2 (*B-cell lyphoma protein* 2) que diminuiria o processo apoptótico dos músculos cardíacos de ratos[28]. Assim também teríamos uma ação do sevoflurano nos órgãos que também passam pelo processo de IR durante a CEC.

1.4 Origem e papel dos miRNAs no processo epigenético

O termo epigenética se refere a mudanças fenotípicas que não envolvem qualquer alteração na sequência do ácido desoxirribonucleico (DNA), ou seja, fatores moleculares e processos em torno do DNA que são estáveis na mitose e regulam a atividade do genoma independentemente da sequencia de DNA[29]. Os processos epigenéticos incluem, entre outros fatores, a metilação e acetilação do DNA e/ou histonas, e a regulação pós transcricional através da ação dos microRNAs (miRNAs) (Figura 3)[30].

Figura 3 – Mecanismos epigenéticos de regulação gênica



Metilação do DNA, marcada pelos pontos de cor vermelha; modificações das histonas, marcadas pelas circunferências azuis; mecanismos baseados no RNA (Ácido ribonucleico), marcados por cobertura vermelha sobre a cromatina. **Fonte:** Adaptada de Matouk *et al*. (2008).

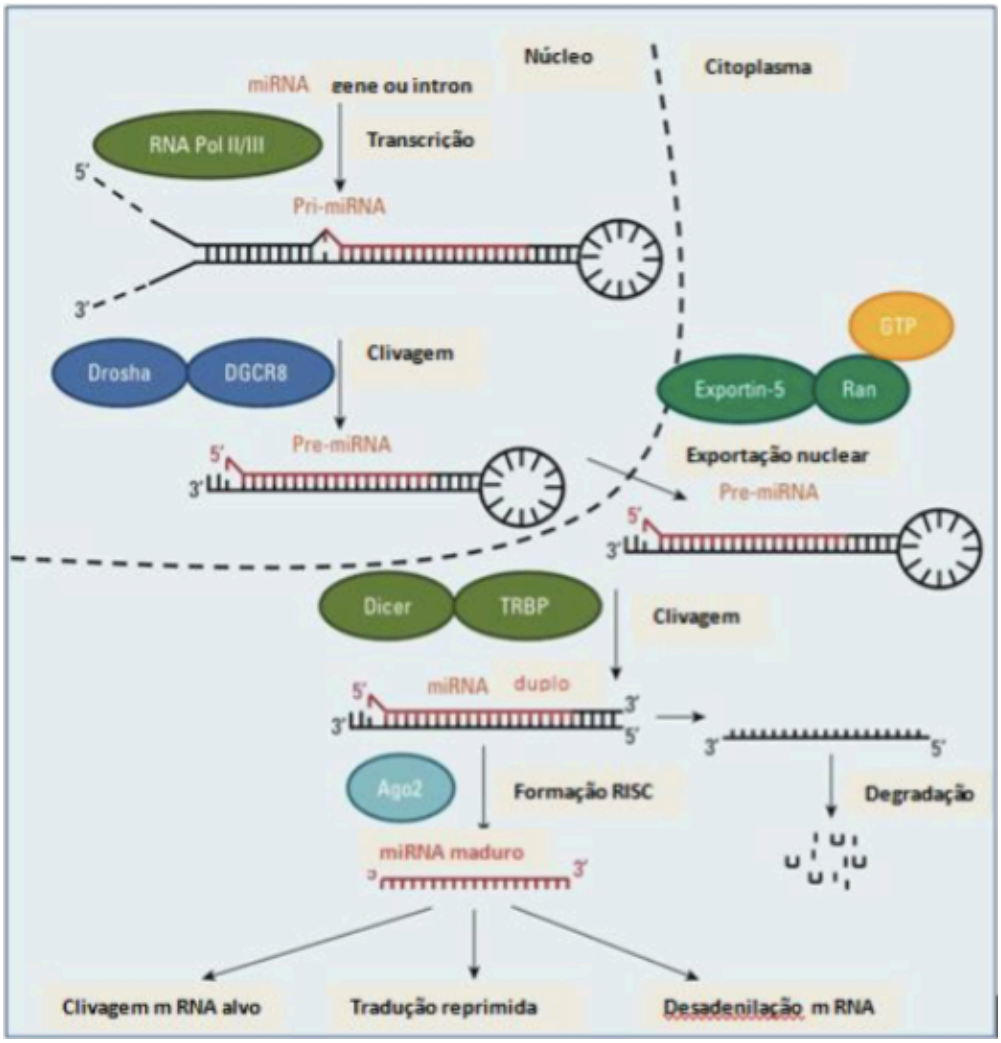
Em células de mamíferos, o processo pós-transcricional é regulado por dois sistemas principais: as proteínas ligantes de ácidos ribonucleicos (RNA) - (RBPs) e os RNAs não codificadores, como miRNA e longosRNAs (lncRNA). As RBPs atuam no processamento do pré-RNA mensageiro (pré-mRNA) e do RNA mensageiro (mRNA), incluindo as etapas de transporte, armazenamento, estabilidade e o processo de tradução[31,32,33].

Os miRNAs são moléculas pequenas de RNA não codificadoras com ampla atividade regulatória nos processos pós-transcricionais de genes envolvidos na fisiopatologia de várias doenças. Eles atuam ligando-se na região 3' não-traduzida (3'-UTR) do transcrito alvo para reprimir a tradução do mRNA ou degradando-o diretamente. Foi sugerido que os mRNAs com padrão de expressão similar sejam regulados por fatores de transcrição e miRNAs que estejam na mesma via metabólica ou de sinalização[34].

Os miRNAs estão presentes no núcleo celular, citoplasma e mitocôndrias, mas também podem ser encontrados no ambiente extracelular. Porém, tudo começa na parte

nuclear da célula onde se dá a transcrição do miRNA como uma dupla fita que será clivada em uma fita simples, depois de transferida para o citoplasma, onde vai exercer sua função de regular a tradução dos mRNA e finalmente inibindo a síntese proteica significando que alguma reação inerente a uma determinada proteína deixará de acontecer (Figura 4)[34].

Figura 4 – Biogênese do miRNAs



Deve-se observar como os miRNA inibem o processo de tradução do RNA mensageiro em uma nova proteína. **Fonte:** Adaptado de Vrijens *et al*. (2015).

1.5 Papel dos miRNAs nas doenças e no uso de anestésicos inalatórios

Os miRNAs regulam vários mecanismos biológicos, como diferenciação, proliferação e morte celular, desenvolvimento embriônico, metabolismo e regulação dos processos bioquímicos[35]. Alguns estudos tentam demonstrar que a desregulação de

miRNAs contribuem significativamente na patogênese de diversas doenças, incluindo o câncer colo retal e a leucemia linfocítica[36,37].

Um recente estudo avaliou o mecanismo de ação do sevoflurano na cirurgia de câncer de tireoide por tumor papilífero e observou que o mesmo foi capaz de diminuir a expressão do miR-155, um miRNA com participação na proliferação de células tumorais de diversos tipos de canceres[38].

1.6 Papel dos miRNAs na resposta inflamatória

A expressão de miRNAs circulantes tem sido estudada em algumas doenças cardiovasculares, como fibrilação atrial pós-operatória (FAPO). Nesse estudo, os autores mostraram que os miR-23 e miR-26a estão significantemente menos expressos no grupo que desenvolveu FA no período pós-cirurgia de revascularização do miocárdio com CEC[39]. Os miRNAs também modulam a resposta imune inata e adaptativa contra diversos patógenos, portanto podem influenciar na resposta inflamatória e na progressão das infecções[40,41]. Um estudo detectou em macrófagos um aumento da expressão da interleucina 10 (IL-10) em resposta à ligação competitiva do miR-466l com o sítio de ligação da tristetraprolina, proteína envolvida na degradação do mRNA[42]. Enquanto os miRNAs miR-10a, miR-126, miR-31 e miR-17-3p estão intimamente associados com a modulação da resposta inflamatória associada a formação de placas ateroscleróticas, principal mecanismo responsável pelo evento isquêmico agudo[43].

Os miRNAs estão envolvidos ainda em doenças complexas, como a obesidade e resistência à insulina, por terem como alvo múltiplos mRNAs, os quais podem ser desestabilizados por um único miRNA. Embora seja pouco conhecido o envolvimento deles no tecido adiposo, sabe-se que são reguladores no desenvolvimento dos adipócitos que em indivíduos obesos são relatados como responsáveis por um perfil de secreção e função endócrina alteradas, resultando no aumento da liberação de adipocinas e moléculas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral alfa (TNFa) e interleucina 6 (IL-6). Esses por sua vez são responsáveis na indução de resistência à insulina no músculo esquelético[44] e estão diferentemente expressos em pacientes sadios e obesos[45].

1.7 Como o sevoflurano pode atuar no processo epigenético

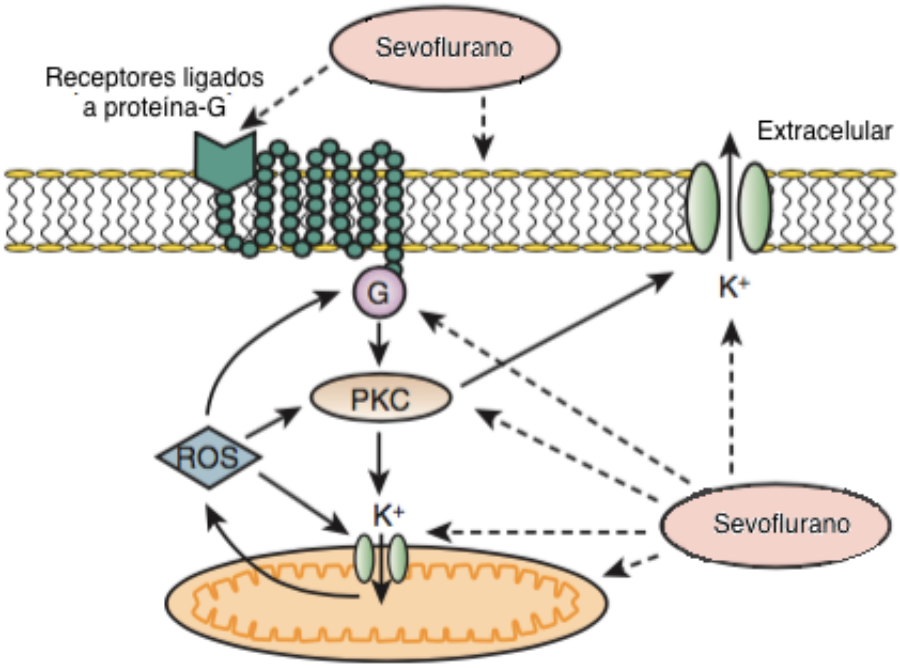
A epigenética oferece uma ponte que conecta o ambiente e o genoma. Assim, alguns fatores ambientais, incluindo o uso de alguns medicamentos, podem causar mudanças epigenéticas[30]. Essas mudanças permitem que as células se adaptem e respondam a mudanças do ambiente e tem um papel importante na reprogramação genética da célula levando-a para um fenótipo de tolerância ou sobrevivência[46].

Alguns estudos sugerem uma possível contribuição do sevoflurano na expressão de miRNA responsáveis pelo controle da síntese e liberação de citocinas, entre as quais estão as moléculas envolvidas na resposta inflamatória que ocorre no processo de IR com o uso da CEC[41].

A partir das observações de alguns grupos de pesquisa levantou-se a hipótese de que a cardioproteção em resposta ao pré-condicionamento tecidual pode ser induzida por isquemia em órgãos à distância, levando à descrição do pré-condicionamento isquêmico remoto do miocárdio (PIRM). O PIRM gera duas fases de proteção: a fase precoce (ou imediata) e a fase tardia (24 horas após a indução da isquemia e que se prolonga por pelo menos 48 horas)[47].

Nesse sentido, tem-se atribuído uma atuação do sevoflurano sobre várias vias endógenas que produzem um efetor final capaz de promover a proteção miocárdica. Essas vias podem incluir canais de potássio mitocondriais dependentes de adenosina trifosfato (K^+_{ATP}), os receptores ligados a proteína-G, proteína cinase C (PKC) e as espécies reativas de oxigênio (ERO)[48](Figura 4).

Figura 5 – Vias de ação do Sevoflurano no nível intracelular



As linhas tracejadas representam os locais de ação do anestésico e as linhas cheias são as cascatas de sinais potenciais. ROS = *Reactive Oxygen Species* (Espécies Reativas de Oxigênio); PKC = *Protein Kinase-C* (Proteína Cinase-C); G = *Protein-G*; K^+ = Potássio. **Fonte:** Adaptado de Tanaka *et al*. (2004).

O PIRM provoca a produção e/ou liberação de várias substâncias pelo tecido isquêmico, as quais vão induzir cardioproteção por mecanismos neuronais e/ou humorais. A hipótese humoral defende que o estímulo isquêmico leva à produção de várias substâncias que, entrando em circulação, atingem o miocárdio e exercem aí o seu efeito protetor. Tanto na fase precoce quanto na fase tardia de proteção, são desencadeadas modificações da expressão de genes nos cardiomiócitos e leucócitos no período que se segue à isquemia miocárdica, envolvidos na resposta do miocárdio às lesões oxidativas e inflamatórias[47].

Além disso, o mecanismo de PIRM parece levar a alterações epigenéticas anti-inflamatórias nos leucócitos circulantes (supressão de proteínas envolvidas na quimiotaxia, adesão, migração, exocitose, apoptose e imunidade inata) nos primeiros 15 minutos após o estímulo e, principalmente, depois de 24 horas, quando da janela tardia de proteção. Como diversas pesquisas têm mostrado, o pré-condicionamento isquêmico pode levar a mudanças epigenéticas, que participam da proteção tecidual[46].

Conforme visto anteriormente, alguns benefícios têm sido atribuídos ao sevoflurano em diferentes tecidos e com diferentes consequências[31]. Embora não se saiba

ao certo qual mecanismo está por trás dessas diferentes atuações do anestésico acredita-se que em todos os casos o pré-condicionamento tecidual pode ser o ponto chave[26,49,50].

Alguns estudos sugerem uma contribuição do sevoflurano tanto na metilação de regiões promotoras de genes quanto na expressão de miRNA. Essa contribuição resultaria em cardioproteção e na redução da resposta inflamatória que ocorre no processo de IR com o uso da CEC[51,52]. Entretanto, esses resultados são decorrentes de estudos realizados em animais ou linhagens celulares. Estudos realizados em humanos ajudariam a responder melhor essa questão.

Portanto, baseado na hipótese humoral da PIRM, a hipótese testada no presente estudo foi que a exposição ao sevoflurano durante a CEC ativa a regulação epigenética, na síntese/expressão de moléculas de miRNA que consequentemente regulam a expressão dos genes inflamatórios e controlando a inflamação.

Investigações sobre esse tema são de suma importância, uma vez que, nossa compreensão sobre os mecanismos epigenéticos regulados pelo sevofluorano e que podem resultar no pré-condicionamento farmacológico, ainda é muito vaga.

2 OBJETIVO

2 OBJETIVO

Avaliar o efeito anti-inflamatório do Sevoflurano através da medida da PMN-elastase e de miRNAs associados à resposta inflamatória nos pacientes submetidos a revascularização do miocárdio com CEC.

3 MÉTODOS

3 MÉTODOS

3.1 Aspecto ético

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana (CEP) do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia de São Paulo (IDPC/SP) (ANEXO A) e está registrado em clinicaltrials.gov como NCT02672345 (ANEXO B).

Constando do Termo Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), requerido pelas resoluções CNS 196/96, 251/97 e 292/99, sobre diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos, do Conselho Nacional de Ética em Pesquisa/Agência de Vigilância Sanitária, e as Boas Práticas de Pesquisa Clínica do ICH-GCP, o qual foi protocolado em 15 de novembro de 2015, cujo número é 4617 (APÊNDICE A).

3.2 Período do estudo

Este estudo foi realizado entre agosto de 2016 e dezembro de 2020, no Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, entidade associada da Universidade de São Paulo. As principais fases e datas deste estudo estão na tabela 1.

Tabela 1 – Principais fases e datas do estudo

Fases do estudo	Datas
Recrutamento de pacientes	Agosto/2016 – Junho/2020
Coleta de dados	Agosto/2016 – Setembro/2020
Digitalização e armazenamento de dados	Março/2019 – Outubro/2020
Análise estatística	Agosto/2020 – Outubro/2020
Dissertação do estudo	Novembro/2020 – Dezembro/2020

Fonte: Autor (2020).

3.3 Casuística

Esse estudo é um ensaio clínico randomizado e prospectivo. O tamanho da amostra foi baseado nos cálculos realizados a partir dos dados fornecidos pelos autores de um artigo experimental[9] que avaliaram a resposta inflamatória pela medida da PMN-elastase cuja diferença em ng/ml maior que 50% entre as médias dos grupos que

utilizaram ou não o anestésico volátil sevoflurano durante o maior período de CEC aplicada por aqueles autores (90 minutos), cujo desvio padrão (DP) de 30,71, um nível de significância de 5% e uma potência da amostra de 80% gerou o número de 100 pacientes como tamanho amostral necessário para obter uma resposta confiável para o objetivo principal.

Todos os pacientes do estudo foram submetidos à cirurgia de revascularização do miocárdio com CEC de forma eletiva, sendo os pacientes randomizados em 2 grupos:

Grupo SEVO: uso do Sevoflurano durante a CEC

Grupo CONTROLE: sem uso de Sevoflurano durante a CEC

Todos os procedimentos relativos à CEC foram uniformizados, incluindo os oxigenadores de membrana utilizados (*Nipro* modelo Brizio).

O processo de randomização foi feito usando o programa de computador Microsoft® Excel® cuja ordem dos pacientes foi escondida em envelopes foscos lacrados contendo os números "1" para o Grupo SEVO e "2" para o Grupo CONTROLE os quais foram abertos pelo autor do estudo, somente quando o paciente chegava à sala cirúrgica.

3.4 Critérios de Inclusão

- Idade igual ou superior a 18 anos
- Cirurgia de revascularização do miocárdio eletiva com CEC
- Assinatura do termo de consentimento livre esclarecido

3.5 Critérios de Não-inclusão

- Uso de corticoides ou medicamentos anti-inflamatórias de rotina, utilizados em menos de 24 horas antes do procedimento
- Presença de asma, Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC), doenças autoimunes
- Participação em outros estudos clínicos
- Presença de insuficiências cardíaca (classe funcional IV), hepática ou renal
- Cirurgia combinada eletiva (ex.: correção de aneurisma da aorta + revascularização do miocárdio)
- Infarto agudo do miocárdio nos últimos 30 dias
- Angina instável

- Obesidade grau III (IMC>40kg/m^2)

3.6 Técnica Anestésica e CEC

3.6.1 Anestesia

Todos os pacientes foram avaliados previamente, no entanto não foi prescrito medicação pré-anestésica para nenhum deles.

Após entrada na sala operatória, todos os pacientes foram monitorizados com cardioscopia, oximetria de pulso, pressão não invasiva e índice bispectral (BIS – *BIS Vista™; Covidien*) presentes no monitor multiparamétrico (*Drager* modelo Infinity® Delta). A seguir, venóclise em membro superior direito com Jelco 16 *Gauge* sendo que todos os pacientes receberam midazolam (*Cristália*®) 1mg endovenoso (EV) (10 a 15 minutos pré-indução). Realizada punção da artéria radial esquerda para monitorização contínua da pressão arterial invasiva.

A indução da anestesia foi feita em todos os pacientes com sufentanil (*Cristália*®) 0,3µg.kg^{-1} EV, etomidato (*Cristália*®) 0,2-0,3mg.kg^{-1} e pancurônio (*Cristália*®) 0,08-0,1mg.kg^{-1}. Após a indução e intubação com laringoscopia direta foi iniciada ventilação mecânica controlada à volume do paciente [volume corrente de 6 mL.kg^{-1}, pressão positiva expiratória final (PEEP) de 5 cmH_2O, e frequência respiratória para manter a tensão expirada final de CO_2 entre 35-40 mmHg]. A manutenção pré-CEC da hipnose foi feita através de midazolam (*Cristália*®) em bomba de infusão contínua (BIC) (LIFE MED modelo LF 2001) numa dose que variou de 0,03-0,2 mg.kg^{-1}.h^{-1} EV no intuito de manter o valor do BIS entre 40 e 60 até inicio da CEC para todos os pacientes selecionados no estudo, independente do grupo para o qual foram randomizados. O sistema anestésico para ventilação mecânica usado foi o aparelho da *Drager* (modelo *Primus*), um sistema semifechado.

3.6.2 A CEC

Todos os pacientes foram anticoagulados com heparina (*Cristália*®) (400 U/kg). Após tempo de coagulação ativado (TCA) > 480 segundos, realizado canulação da aorta e das veias cavas superior e inferior pelo cirurgião. Iniciada, portanto, a CEC e em seguida resfriado o paciente a uma temperatura entre 30-32º C (CEC hipotérmica).

O circuito da CEC foi preparado usando 1.400 mL de solução fisiológica à 0,9% (SF 0,9%) (*Cristália*®), 100 mL de albumina 20% (*Cristália*®) e 5000 U de heparina (*Cristália*®). O sistema *pH-Stat* para análise dos gases de sangue foi utilizado para controlar o equilíbrio ácido-base em todos os pacientes. O fluxo sanguíneo alvo durante a CEC foi de 2,4 $L.min^{-1}.m^{-2}$ e aumentado para 3,2 $L.min^{-1}.m^{-2}$, para manter a saturação venosa central de oxigênio acima de 75%. O TCA foi de pelo menos 480 segundos durante a perfusão. A taxa de fluxo de gases frescos fornecido ao oxigenador de membrana foi adaptada pelo perfusionista para manter a pressão parcial arterial de dióxido de carbono entre 35 a 45 mmHg. A concentração de oxigênio (O_2) na mistura de gases entregue ao oxigenador variou de 30-80%, dependendo da pressão parcial de oxigênio arterial, com uma pressão parcial de O_2 alvo acima de 80 mmHg medida no fluxo arterial oxigenado.

Após o início da CEC todos os pacientes selecionados para o grupo SEVO receberam o anestésico inalatório sevoflurano (*Cristália*®) através de um vaporizador calibrado (*Drager* modelo Vapor 3000) instalado na CEC e ligado ao circuito pelo fluxo de gases frescos. A manutenção da hipnose nesse grupo foi feita através da dose que variou de 0,7 a 1,5 vezes a Concentração Alveolar Mínima (CAM) do sevoflurano (*Cristália*®), ou seja, entre 1,5 e 3,0% no *dial* do vaporizador, desde o inicio da CEC, de acordo com os valores de BIS (mantidos entre 40 e 60). No grupo CONTROLE a hipnose foi mantida através da permanência da infusão contínua de midazolam (*Cristália*®) em BIC, mantendo o valor do BIS entre 40 e 60 durante todo o período da CEC.

A partir do final da perfusão (término da CEC), os pacientes do grupo SEVO voltaram a receber a dose de manutenção do midazolam (*Cristália*®) em BIC e os pacientes do grupo CONTROLE permaneceram com a dose do midazolam (*Cristália*®) em BIC que receberam desde o início da anestesia, mantendo o valor do BIS entre 40 e 60.

3.7 Protocolos de resgate

Em relação à monitorização para o controle da hipnose dos pacientes durante toda a cirurgia, foram utilizados os valores do BIS. Caso os valores permanecessem ≥ 60 por um período ≥ 30 segundos, o *dial* do vaporizador de sevoflurano (*Cristália*®) era aumentado até 1,5 CAM (3%) para manter os valores de BIS entre 40-60 nos pacientes do grupo SEVO. Em caso de insucesso nesta etapa, era administrado midazolam

(*Cristália*®) 3 mg intravenoso em *bolus* até alcançar um valor de BIS < 60. No grupo CONTROLE caso o BIS permanecesse ≥ 60 por um período ≥ 30 segundos era administrado midazolam (*Cristália*®) 3 mg intravenoso em *bolus* até alcançar um valor de BIS < 60.

Em relação à PAM, se valores de PAM ≥ 80 mmHg, o *dial* do vaporizador era aumentado até o máximo de 1,5 CAM (3%) para manter uma PAM < 80 mmHg e valores de BIS não ≤ 40 por um período ≥ 30 segundos nos pacientes do grupo SEVO. Em caso de insucesso nesta etapa, era administrado sufentanil (*Cristália*®) 50 µg intravenoso e na sequência iniciada infusão contínua em BIC de nitroprussiato de sódio na dose de 0,3-2,5 $\mu g.kg^{-1}.min^{-1}$ até alcance da 60 mmHg ≤ PAM < 80 mmHg. Nos pacientes do grupo CONTROLE era administrado sufentanil (*Cristália*®) 50 µg intravenoso caso PAM ≥ 80 mmHg para manter uma 60mmHg ≤ PAM < 80 mmHg e valores de BIS não ≤ 40 por um período ≥ 30 segundos. Em caso de insucesso era iniciada infusão contínua em BIC de nitroprussiato de sódio (*Cristália*®) na dose de 0,3-2,5 $\mu g.kg^{-1}.min^{-1}$. Caso os valores da PAM < 60 mmHg, era administrado inicialmente fenilefrina (*Cristália*®) 50 µg intravenoso em *bolus*. Em caso de insucesso era iniciada dose de noradrenalina (*Cristália*®) em infusão contínua em BIC na dose de 0,01-1$\mu g.kg^{-1}.min^{-1}$.

3.8 Coleta de dados

Foi utilizada uma ficha para coleta de dados de pré e pós-operatórios inerentes a cada paciente participante do estudo (APÊNDICE B).

Nessa ficha foram anotadas informações biodemográficas como: peso, altura, idade, índice de massa corporal (IMC), comorbidades (diabetes, hipertensão arterial sistêmica, dislipidemia e tabagismo), classificação do estado físico da *American Society of Anesthesiologists* (ASA), classe funcional da New York Heart Association (NYHA), número de leucócitos pré-operatório e medicações de uso regular como beta-bloqueadores, inibidores da enzima de conversão da angiotensina (IECA), bloqueadores do receptor de angiotensina (BRA), diuréticos, bloqueadores dos canais de cálcio, estatinas, digitálicos, nitratos e outras medicações.

Além disso, foram anotados dados clínicos pós-operatórios sobre tempos cirúrgico e anestésico, tempo de perfusão e anóxia. Anotadas também as complicações pós-operatórias na UTI como arritmias, reintubações, sangramento > 3ml/kg/h,

vasoplegia, transfusão maciça, parada cardiocirculatória (PCR) e óbito, tempos de ventilação mecânica, permanência na UTI e mortalidade em 30 dias.

Para a determinação da concentração plasmática dos marcadores inflamatórios PMN-elastase, IL-1b, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNFa, TGFb, análise de expressão gênica e de miRNA, foram coletadas amostras de sangue dos pacientes dos grupos SEVO e do grupo CONTROLE em dois momentos distintos:

- T0: Pré-CEC (minutos antes do início da CEC) – Tempo Pré-CEC
- T1: 90 minutos pós-início da CEC – Tempo pós-CEC

Os dados foram armazenados em um banco de dados computadorizado, sendo as identidades dos pacientes preservadas, e enviados aos Laboratórios de Biologia Molecular e de Estatística do IDPC. Todo o material biológico coletado (sangue) foi armazenado e será mantido por cinco anos e, depois desse prazo, será descartado, segundo as normas da Agência de Vigilância Sanitária.

3.9 Determinação da concentração plasmática dos marcadores inflamatórios

Para a determinação da concentração plasmática de IL-1b, IL-6, IL-8, IL-10, IL-4, TNFa, TGFb1 e PMN-elastase foram utilizadas amostras de plasma obtidas a partir do sangue total periférico colhido em tubo contendo anticoagulante EDTA. Os tubos foram centrifugados, sob refrigeração a 4º C, no máximo 30 minutos após da coleta para a separação do plasma que foi armazenado imediatamente a -80ºC até o momento do uso.

As concentrações foram determinadas através da tecnologia multiplex, utilizando o sistema de detecção Luminex® 100™ (Luminex Corporation), disponível no Laboratório de Biologia Molecular Aplicado ao Diagnóstico na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, coordenado pelo Prof. Dr. Mario Hiroyuki Hirata. Os ensaios foram analisados no programa xPONENT 3.1.

As proteínas foram dosadas com os seguintes kits customizados *Milliplex Map Kits* (EMD Millipore Corporation):

1. *Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel* (HCYTOMAG-60K) para determinação da concentração plasmática das IL-1β, IL- 6, IL-8, IL-10, IL-4 e TNFα;

2. *Human Sepsis Magnetic Bead Panel 3* (HSP3MAG-63K) para determinação da concentração plasmática da PMN-elastase.
3. *TGF-β1 Magnetic Bead Single Plex Kit* (TGFBMAG-64K-01) para determinação da concentração plasmática daTGF-β1.

3.10 Análise de expressão gênica de citocinas e de miRNA leucocitários

3.10.1 Extração do RNA de leucócitos circulantes

O RNA total (incluindo os miRNA) dos pacientes foi extraído de leucócitos a partir de amostras de sangue total coletado em tubo contendo anticoagulante EDTA. Os tubos foram centrifugados, no máximo 30 minutos após a coleta, para a separação do *Buffy coat*. A extração foi realizada utilizando o reagente *TRIzol*™ (Invitrogen) e clorofórmio, e em seguida purificado com álcool isopropílico 100% e lavado com etanol 75% por 3 vezes para eliminação de contaminantes com potencial de inibição da qPCR. A quantificação do RNA obtido foi realizada utilizando o equipamento *Qubit® 2.0 Fluorometer* (Invitrogen). Para a quantificação foi utilizado o kit *QUBIT®RNA HS Assay* (Invitrogen). O RNA extraído foi mantido em freezer -80ºC até o momento do uso.

3.10.2 Análise de expressão gênica das citocinas

A síntese do cDNA foi realizada utilizando 600ng de RNA total e os reagentes do kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems™), seguindo as instruções do fabricante. A RT-PCR foi realizada em termociclador (Mastercycler Personal), nas seguintes condições: 25°C por 10 minutos; 37°C por 120 minutos e 85°C por 5 minutos. O cDNA obtido foi armazenado a -20°C até o momento do uso. A escolha do gene de referência foi realizada com o auxílio do programa *geNorm* (Primer Design Ltd.). Para isso foram avaliados os seguintes genes endógenos: gliceraldeido 3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*), beta 2-microglobulina (*B2M*), hipoxantina fosforobosiltransferase 1 (*HPRT1*), complexo da succinato desidrogenase subunidade A flavoproteína (*SDHA*), ubiquitina C (*UBC*) e hidroximetilbilano sintase (*HMBS*). Desses, o que apresentou menor variação de expressão entre as amostras nas diferentes condições do estudo foi utilizado como normalizador na etapa da PCR quantitativa.

A quantificação relativa da expressão do mRNA dos genes *IL1B, IL6, CXCL8, IL10, IL4, TNFA, TGFB1* e *ELANE* foi realizada pela PCR em tempo real utilizando o sistema de detecção *TaqMan® Gene Expression Assay* (Applied Biosystems™), os reagentes fornecidos no Kit *Quantifast® Multiplex PCR* (Qiagen), e o sistema automatizado *RotorGene®* (Qiagen). A reação da PCR ocorreu no formato multiplex, por essa razão as sondas MGB dos genes alvos foram marcadas com o fluoróforo FAM, enquanto a sonda para o gene normalizador foi marcada com o fluoróforo VIC.

Todas as reações foram realizadas em duplicata e controles negativos (sem adição de cDNA) foram utilizados afim de verificar possíveis contaminações dos reagentes. A PCR ocorreu nas seguintes condições: um ciclo de 10 min a 95ºC (ativação da enzima Hot Star Taq); 40 ciclos de 15 segundos a 95ºC (desnaturação) e 15 segundos a 60ºC (hibridização e extensão). Os dados foram analisados utilizando o programa *Rotor-Gene Q – Pure detection* (Qiagen). Para a quantificação relativa da expressão gênica foi utilizado o método comparativo de Ct, com base na fórmula: $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [53].

3.10.3 Análise da expressão de miRNA leucocitários

Para a análise de perfil de expressão de miRNA selecionou-se aleatoriamente 10 pacientes do grupo SEVO e 10 pacientes do grupo CONTROLE para a identificar os miRNA diferentemente expressos através do sistema miScript™ miRNA PCR *Array Human Inflammatory Response & Autoimmunity* (Qiagen). Para a síntese de cDNA foi utilizado o kit miScript II RT Kit (Qiagen). A expressão de miRNA foi analisada pela PCR em tempo real utilizando o sistema de detecção SYBR® Green. Os resultados da PCR foram analisados utilizando o software miScript miRNA PCR Arrays & Assay Data Analysis Software (Qiagen) disponível no QIAGEN GeneGlobe Data Analysis Center. O programa é constantemente atualizado, por isso, não possui número de versão, mas as análises foram realizadas no período de agosto a setembro de 2020.

3.11 **Análise estatística**

Os resultados foram analisados usando o software SPSS 20 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA) e o nível de significância adotado foi $p < 0,05$. Antes de realizar testes

comparativos de variáveis quantitativas, foi avaliado se os parâmetros seguem uma distribuição normal pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Para dados paramétricos, o teste t de Student foi usado. Para dados não paramétricos, o Mann-Whitney. Para comparação ao longo do tempo o teste ANOVA para medidas repetidas. Para comparar as frequências das variáveis qualitativas, foi realizado o teste Qui-quadrado (χ^2) ou o teste exato de Fisher.

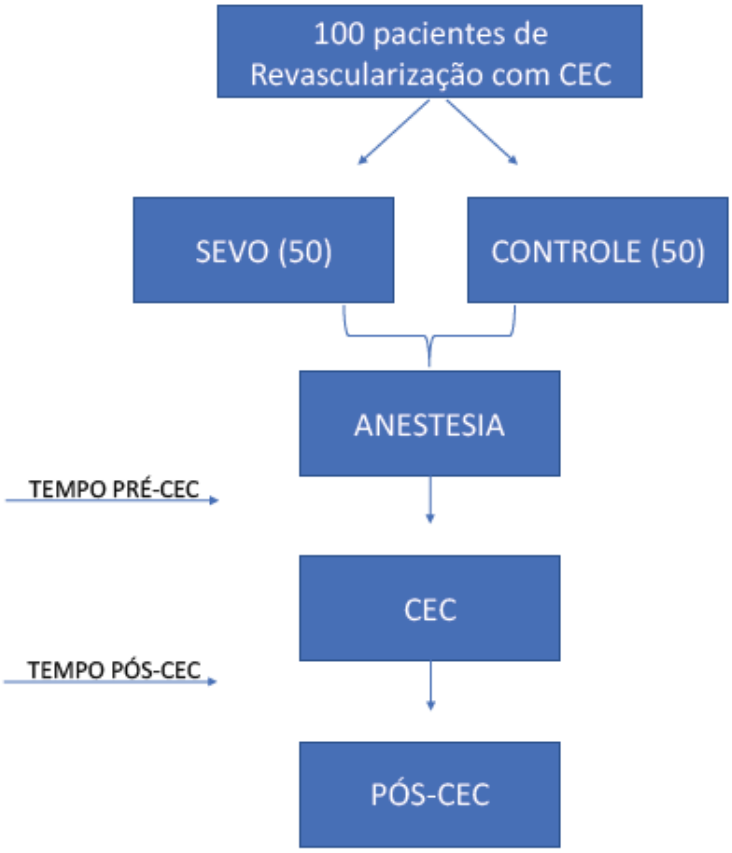
4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Dados biodemográficos, clínicos pré e pós-operatórios e medicações pré-operatórias

O estudo incluiu 100 pacientes submetidos à cirurgia de revascularização do miocárdio com CEC (Figura 6). A tabela 2 apresenta os dados biodemográficos e clínicos pré-operatórios dos pacientes, onde observa-se homogeneidade dos dados entre os grupos SEVO e CONTROLE.

Figura 6 – Etapas de coleta das amostras de sangue nos dois grupos do estudo (SEVO e CONTROLE) que passaram por análise molecular



CEC, Circulação Extracorpórea; SEVO, Grupo do Sevoflurano. **Fonte:** Autor (2020).

A média de idade dos participantes para ambos os grupos foi de 62 anos, com a prevalência do sexo masculino (76%). Com relação às comorbidades pré-existentes houve um predomínio de pacientes com hipertensão arterial sistêmica e diabetes

melito. Índice de massa corpórea com sobrepeso, dislipidemias e hábitos de fumar, entretanto tiveram uma distribuição equitativa entre os grupos.

O tempo de anestesia, de cirurgia, assim como tempo de perfusão e anóxia não mostraram diferenças significativas entre os dois grupos avaliados. O estado físico segundo critério da *American Society of Anesthesiologists* (ASA) mostrou uma prevalência dos participantes do tipo III (pacientes com doença sistêmica grave, que envolve limitações, porém não incapacita). De igual modo, segundo a classificação da limitação da atividade física da *New York Heart Association* (NYHA) a classe funcional mais prevalente foi do tipo II (sintomas leves durante as atividades cotidianas).

A classificação do risco de mortalidade cirúrgica medida pelo EuroSCORE mostrou que 100% dos pacientes do estudo são do grupo de baixo risco, o que significa que o valor médio do escore dos dois grupos ficou entre 0 e 2 (Risco baixo: 0 a 2; moderado: 3 a 5; alto: ≥ 6). Sobre o número de leucócitos nos dois grupos não houve diferença estatisticamente significativa (p=0,243).

Tabela 2 – Dados biodemográficos e clínicos pré-operatórios.

Variável	Grupo Controle (50)	Grupo Sevo (50)	Valor de p
Idade (anos)	62,70±7,5 (50)	62.96±8,4 (50)	0,878[a]
Sexo	F – 32,0% (16)	F –16,0% (8)	0,061[b]
Peso (Kg)	76.28±12,9 (50)	79,22±14,9 (50)	0,410[a]
Altura (m)	1,65±0,1 (50)	1,67±0,1 (50)	0,223[a]
IMC (Kg/m^2)	27,99±4,1 (50)	28.30±4,4(50)	0,767[a]
Estado Físico	ASA II – 2,0% (1) ASA III – 98,0% (49)	ASA II – 0% (0) ASA III – 100% (50)	0,237[c]
NYHA	NYHA II – 94,0% (47) NYHA III – 6,0% (3)	NYHA II – 96,0% (48) NYHA III – 4,0% (2)	0,258[c]
EuroSCORE	1,26±1,0 (50)	1,33±1,0 (50)	0,243[c]
Diabetes	50,0% (25)	56,0% (28)	0,548[b]
Hipertensão arterial	88,0% (44)	94,0% (47)	0,290[c]
Dislipidemia	78,0% (39)	64,0% (32)	0,123[b]
Tabagismo	30,0% (15)	32,0% (16)	0,829[b]

Número de leucócitos	7982,40 ± 1951,32	8055,1 ± 1808,93	0,654[a]

Legenda: IMC= Índice de Massa Corpórea; **ASA**= *American Society of Anestesiology* - Sociedade Americana de Anestesiologistas; **NYHA**=*New York Heart Association* – Associação do Coração de Nova Iorque; **Sevo**= Sevoflurano; **EuroSCORE**=*European System for Cardiac Operative Risk Evaluation* - Sistema Europeu para Avaliação de Risco em Cirurgia Cardíaca; [a]= Teste Mann-Whitney; [b]= Teste qui-quadrado; [c]= Teste likelihood ratio. **Nota**: As variáveis contínuas são apresentadas como média e desvio padrão, e as variáveis categóricas são apresentadas por porcentagem. O número de casos está entre parênteses. **Fonte:** Autor (2020).

A tabela 3 mostra os medicamentos utilizados pelos pacientes em cada grupo do estudo. Observa-se que o uso de inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA) ou bloqueadores dos receptores de angiotensina (BRA), no pré-operatório foi mais frequente no grupo SEVO (p=0,046). Salienta-se que o grupo SEVO apresentou uma discreta diminuição do número de usuários de estatinas comparada com controle, apesar de estatisticamente não significante (p=0,134). Os demais medicamentos não apresentaram diferenças entre os grupos avaliados.

Tabela 3 – Uso de medicamentos entre os pacientes incluídos no estudo.

Grupos de medicamentos	Grupo Controle (50)	Grupo Sevo (50)	Valor de p*
Beta-bloqueador	70,0% (35)	78,0% (39)	0,362
IECA ou BRA	72,0% (36)	88,0% (44)	**0,046**
Diurético	50,0% (25)	38,0% (19)	0,227
Bloqueador de Canal de Ca+	24,0% (12)	22,0% (11)	0,812
Estatinas	86,0% (43)	74,0% (37)	0,134
Digitálicos	4,0% (2)	0% (0)	0,096
Nitrato	36,0% (18)	32,0% (16)	0,673
Outros	94,0% (47)	92,0% (46)	0,695

Legenda: IECA= Inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina; **BRA**= Bloqueadores do Receptor de Angiotensina; **Sevo**= Sevoflurano; **p***= Teste Exato de Fisher. **Nota**: Os dados são apresentados por porcentagem e o número de casos entre parênteses. **Fonte:** Autor, 2020.

Dentre os dados clínicos pós-operatórios avaliados, houve diferença estatística significativa no tempo de Intubação Orotraqueal (IOT) em minutos, onde os pacientes do grupo SEVO apresentaram um tempo maior (**p=0,049**) (Tabela 4).

Tabela 4 – Dados clínicos pós-operatórios

Variável	Grupo Controle (50)	Grupo Sevo (50)	Valor de p
Tempo anestesia (min.)	350,31 ± 72,0(50)	360.50 ± 56,36(50)	0,293[a]
Tempo cirurgia (min.)	271,94 ± 69,4(50)	282,40 ± 57,2(50)	0,264[a]
Tempo perfusão (min.)	82,96 ± 30,9(50)	86,42 ± 25,3(50)	0,240[a]
Tempo anóxia (min.)	53,02 ± 14,2(50)	57,10 ± 16,1(50)	0,239[a]

Tempo de ventilação mecânica (min.)	1300,50 ± 1236,07	1303,60 ± 464,65	**0,049**[a]
Tempo de UTI (dias)	3,58 ± 2,425	3,0 ± 1,796	0,11[a]
Complicações pós-op.	53,4% (31)	46,6% (27)	0,658[c]
Mortalidade em 30 dias	4% (2)	6% (3)	0,212[c]

Legenda: min.=minutos; **IOT**=Intubação Orotraqueal; **UTI**=Unidade de Terapia Intensiva; [a]= Teste Mann-Whitney; [b]= Teste qui-quadrado; [c]= Teste likelihood ratio. **Nota**: As variáveis contínuas são apresentadas como média e desvio padrão, e as variáveis categóricas são apresentadas por porcentagem. O número de casos está entre parênteses. **Fonte:** Autor (2020).

4.2 Avaliação da expressão gênica de citocinas e de miRNA leucocitários

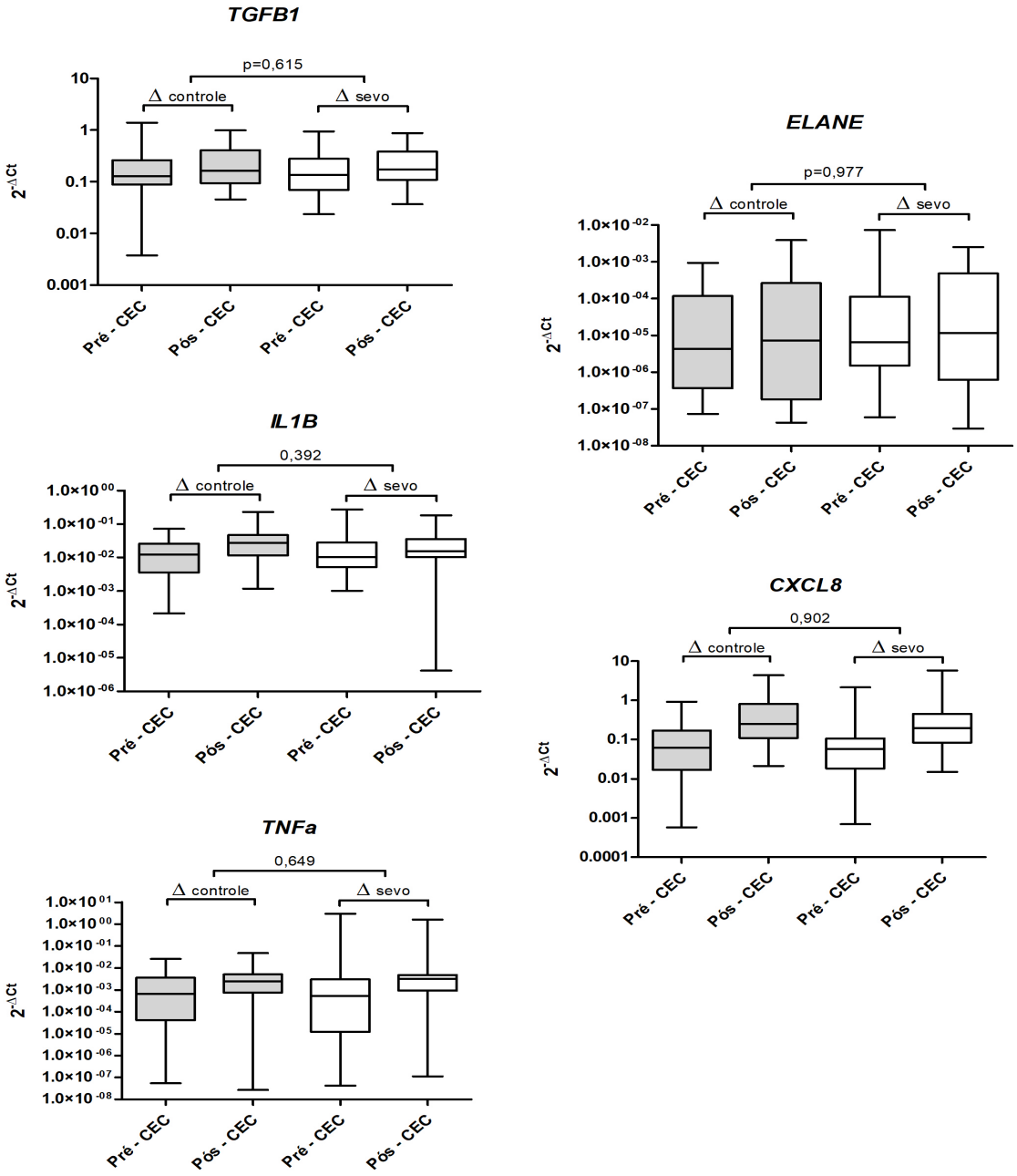
4.2.1 Análise da expressão gênica de citocinas

Na avaliação da expressão dos principais genes das citocinas inflamatórias utilizou-se como gene de referência ou normalizador a beta 2-microglobulina (*B2M*), obtido após uma avaliação de vários genes selecionados para referência, considerado o mais estável nas condições do estudo.

A figura 7 apresenta o efeito do anestésico Sevoflurano sobre a expressão dos mRNAs dos genes *TGFB1, TNFA, ELANE, IL1B, CXCL8*, obtidas de leucócitos circulantes antes e após CEC. Os resultados mostraram que não houve diferença estatisticamente significante nas expressões de mRNA desses genes entre o grupo SEVO e o grupo CONTROLE.

Os demais genes avaliados *IL6, IL10, IL4* não mostraram expressão nos leucócitos em um piloto realizado neste estudo (resultados não mostrados), que também foram observados por outros estudos (https://www.ebi.ac.uk/gxa/home) e não foram mais analisados.

Figura 7 – Efeito do anestésico sevoflurano sobre a expressão dos genes *TGFB1, ELANE, IL1B, CXCL8* e *TNFA* durante a CEC



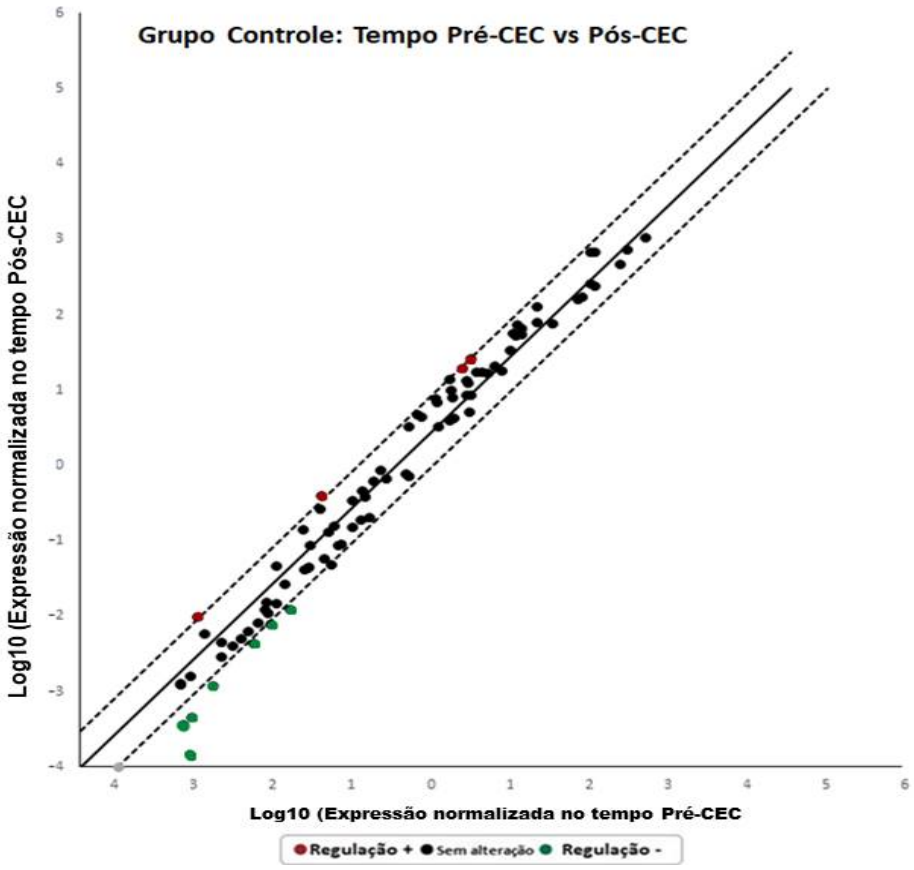
Dados apresentados como gráficos de *boxplot*, indicando mediana e intervalo interquatil dos valores de $2^{-\Delta Ct}$. Sevo= Grupo que recebeu o Sevoflurano durante a CEC. CEC= Circulação Extracorpórea. *TGFB1*= Fator de crescimento transformador beta 1; *ELANE*= Elastase expressa em neutrófilos; *IL1B*= Interleucina 1 beta; *IL8*= Interleucina 8 e *TNFA*= Fator de Necrose Tumoral Alfa. Para comparação entre os grupos foi utilizado o Teste de Mann Whitney. **Fonte:** Autor (2020).

4.2.2 Análise da expressão de miRNA leucocitários

A expressão de miRNAs foi avaliada em 10 pacientes do grupo SEVO para análise comparativa com 10 pacientes do grupo CONTROLE nos tempos pré-CEC e pós-CEC, utilizando a *Human Inflammatory Response & Autoimmunity* de 84 miRNAs.

O resultado da análise do perfil dos miRNA relacionados com os genes de resposta inflamatória no grupo CONTROLE comparando o tempo pré-CEC e pós-CEC resultou em onze miRNAs que foram identificados como diferentemente expressos, embora sem significância estatística (Figura 8, Tabela 5).

Figura 8 – Análise de expressão diferencial de 84 miRNAs no grupo CONTROLE, no tempo pré-CEC comparado com pós-CEC



Nove miRNs (em verde) tiveram expressão regulada negativamente no grupo SEVO (n=10) em relação ao grupo CONTROLE (n=10), porém, não apresentaram significância estatística (p>0,05). Três miRNAs foram expressos positivamente (em vermelho) no grupo SEVO, mas sem significado estatístico. **Fonte:** Autor (2020).

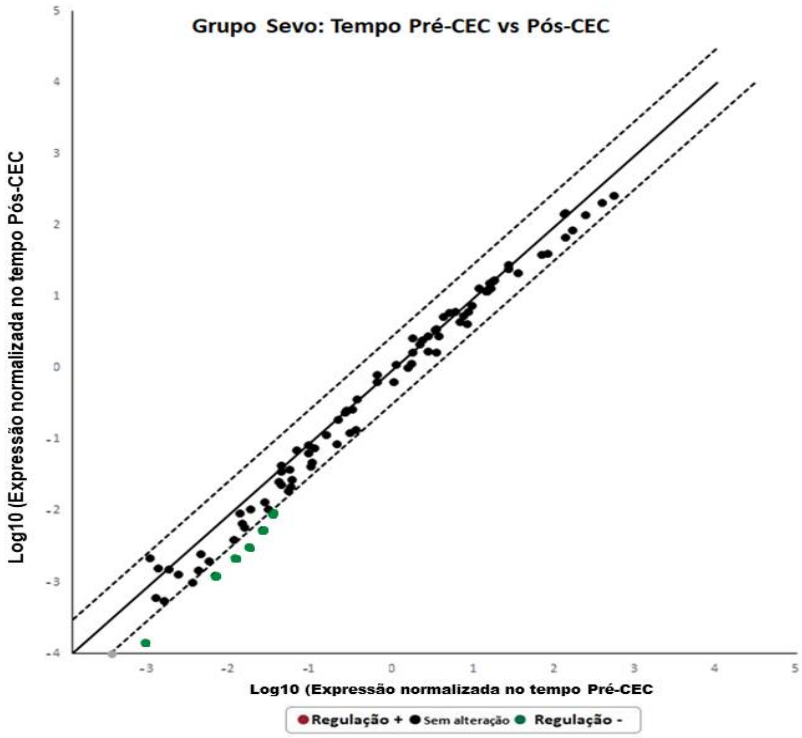
Tabela 5 – miRNAs do grupo CONTROLE com expressão diferenciada no tempo pré-CEC em relação ao pós-CEC.

Identificação do miRNA	Regulação (vezes)	Valor de p
hsa-miR-96-5p	3,01	0,1648
hsa-miR-378a-3p	-5,38	0,1597
hsa-miR-148a-3p	3,02	0,1717
hsa-miR-21-5p	3,51	0,1555
hsa-miR-100-5p	-3,94	0,2271
hsa-miR-29a-3p	-3,53	0,1268
hsa-miR-191-5p	-3,61	0,1521
hsa-miR-143-3p	-5,72	0,2040
hsa-miR-19a-3p	3,27	0,2956
hsa-miR-149-5p	-3,12	0,2009

Fonte: Autor (2020).

Quando analisado o perfil de miRNA no grupo SEVO comparando o tempo pré-CEC e pós-CEC resultou em seis miRNAs que foram identificados como diferentemente expressos (em verde), no entanto também sem significância estatística (Figura 9, Tabela 6).

Figura 9 – Análise de expressão diferencial de 84 miRNAs no grupo SEVO, no tempo pré-CEC comparado com pós CEC



Seis miRNAs (em verde) tiveram expressão regulada negativamente no grupo SEVO (n=10) em relação ao grupo controle (n=10), porém, não apresentaram significância estatística (p>0,05). **Fonte:** Autor (2020).

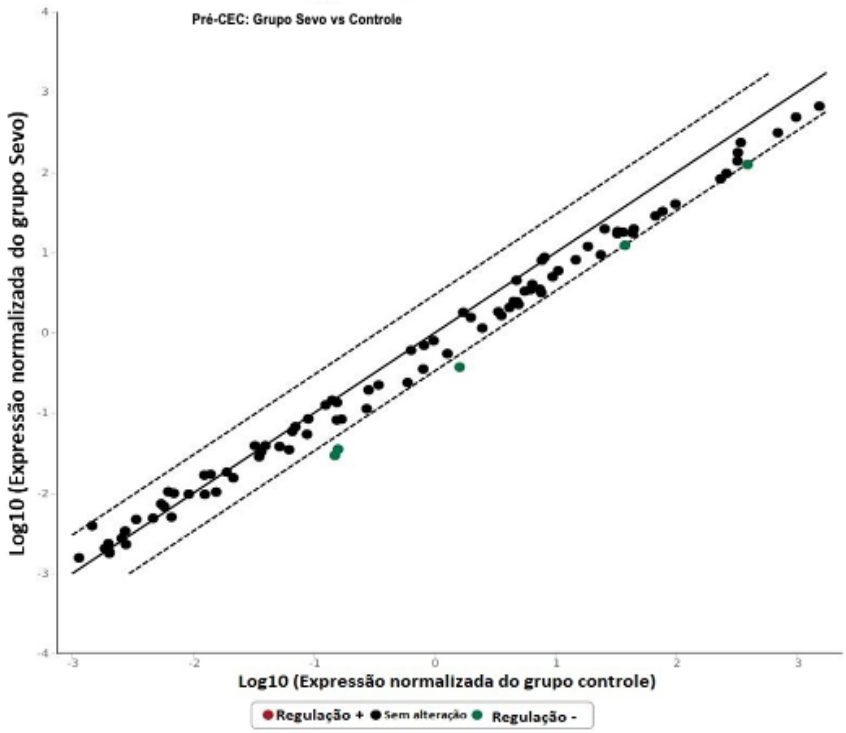
Tabela 6 – miRNAs do grupo SEVO com expressão diferenciada no tempo pré-CEC em relação ao pós-CEC.

Identificação do miRNA	Regulação (vezes)	Valor de p
hsa-miR-301a-3p	-4,27	0,9817
hsa-miR-127-5p	-3,29	0,5018
hsa-miR-29a-3p	-4,79	0,5430
hsa-miR-98-5p	-4,86	0,3835
hsa-miR-34a-5p	-5,67	0,3175
hsa-miR-144-3p	-5,13	0,4723

Fonte: Autor (2020).

Foi então comparado o resultado do perfil de miRNA entre os grupos (CONTROLE X SEVO) no tempo pré-CEC, o que resultou em cinco miRNAs diferentemente expressos, embora também sem significância estatística (Figura 10 e Tabela7).

Figura 10 – Análise de expressão de 84 miRNAs no tempo pré-CEC



Cinco miRNAs (em verde) tiveram expressão regulada negativamente no grupo SEVO (n=10) em relação ao grupo controle (n=10), porém, não apresentaram significância estatística (p>0,05). **Fonte:** Autor (2020).

Tabela 7 – Cinco miRNAs com expressão diminuída no grupo que usou sevoflurano no tempo pré-CEC.

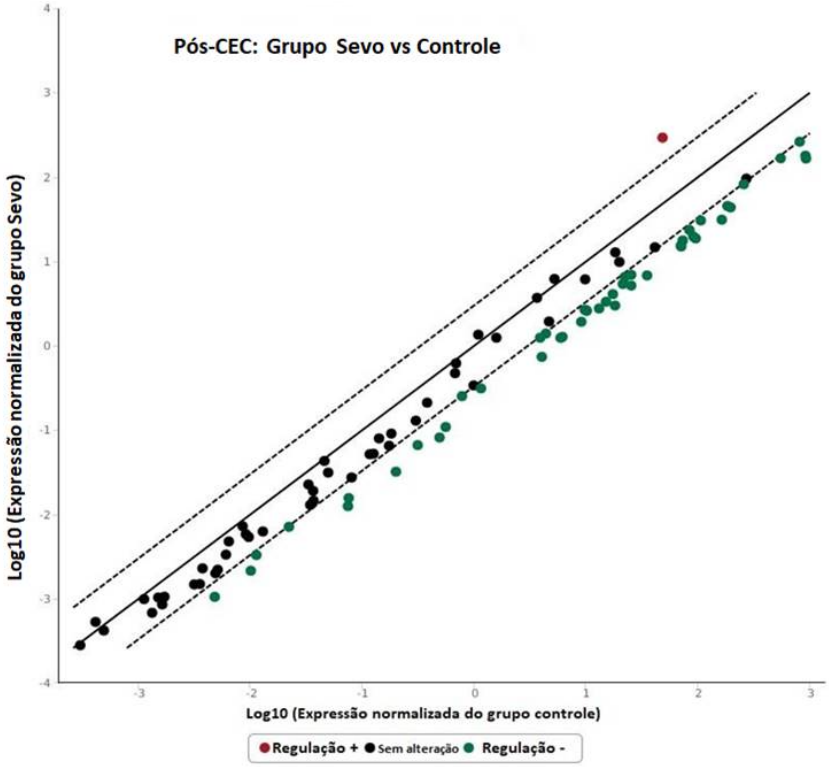
Identificação do miRNA	Regulação (vezes)	Valor de p
hsa-miR-16-5p	-3,09	0,1810
hsa-miR-181a-5p	-4,31	0,3018
hsa-miR-93-5p	-3,05	0,1419
cel-miR-39-3p	-5,03	0,1200
cel-miR-39-3p	-4,49	0,1078

Fonte: Autor (2020).

A mesma comparação foi feita no tempo pós-CEC. Somente o miRNA let-7a-5p teve a expressão aumentada em 6 vezes no grupo que usou Sevoflurano, porém sem significância estatística (p=0,0938). Outros 24 miRNAs apresentaram a expressão significantemente reduzida no grupo SEVO quando comparado ao grupo CONTROLE (Figura 11 e Tabela 8).

Observou-se dessa forma para cada proteína dosada as seguintes reduções na regulação dos miRNA entre os grupos SEVO e CONTROLE: o *TNFA* teve uma redução no hsa-let-7b-5p de -4,48 vezes, no hsa-miR-93-5p de -4,57, no hsa-let-7c-5p de -3,57 vezes, no hsa-let-7d-5p de -4,04, no hsa-let-7i-5p de -4,59 vezes, no hsa-miR-17-5p de -4,72, no hsa-miR-186-5p de -5,45 vezes, no hsa-miR-20a-5p de -5,21, no hsa-let-7g-5p de -3,46 vezes e no hsa-miR-16-5p foi de -5,56 vezes. A A *IL-1B* teve o miRs hsa-let-7b-5p reduzido em -4,48 vezes, o hsa-miR-93-5p reduziu em -4,57, o hsa-let-7c-5p reduziu em -3,57 vezes, o hsa-miR-17-5p em -4,72 vezes, o hsa-miR-181b-5p em -3,14 vezes, o hsa-miR-128-3p em -3,67 vezes e o hsa-miR-30c-5p em -3,39 vezes. A *IL-4* teve o miRs hsa-let-7b-5p reduzido em -4,48 vezes, o hsa-miR-93-5p em -4,57 vezes, o hsa-let-7c-5p em -3,57 vezes, o hsa-let-7d-5p em -4,04 vezes, o hsa-let-7i-5p em -4,59 vezes, o hsa-let-7f-5p em -3,09 vezes, o hsa-let-7g-5p em -3,46 vezes, o hsa-miR-130b-3p em -3,66 e o hsa-miR-98-5p em -3,13. A *IL-6* pode ser regulada negativamente pelos miRs hsa-let-7b-5p em -4,48 vezes, hsa-miR-93-5p em -4,57 vezes, hsa-let-7c-5p em -3,57 vezes, hsa-let-7d-5p -4,04 vezes, hsa-miR-181b-5p em -3,14 vezes, hsa-miR-186-5p em -5,45 vezes, hsa-let-7f-5p em -3,09 vezes, hsa-miR-128-3p em -3,67 vezes e hsa-miR-30c-5p em -3,39 vezes. A *IL-10* com uma redução do miRs hsa-let-7b-5p em -4,48 vezes, o hsa-miR-93-5p em -4,57 vezes, o hsa-let-7c-5p em -3,57 vezes, o hsa-let-7i-5p em -4,59, o hsa-miR-17-5p em -4,72 vezes, o hsa-let-7f-5p em -3,09 vezes, o hsa-miR-128-3p em -3,67 vezes e o hsa-miR-20a-5p em -5,21 vezes. *A TGFB1* teve a expressão do miRs hsa-let-7b-5p reduzida em -4,48 vezes, do hsa-miR-93-5p reduzida em -4,57 vezes, do hsa-let-7c-5p reduzida em -3,57 vezes, do hsa-let-7d-5p reduzida em -4,04, do hsa-let-7i-5p reduzida em -4,59, do hsa-miR-17-5p reduzida em -4,72 vezes, do hsa-miR-181b-5p reduzida em -3,14 vezes, do hsa-miR-20a-5p em -5,21 vezes, do hsa-miR-130b-3p em -3,66 e do hsa-miR-30d-5p em -3,84. A *IL-8* teve a expressão do miRs hsa-let-7b-5p reduzida em -4,48, do hsa-let-7d-5p em -4,04 vezes, do hsa-miR-17-5p em -4,72 vezes, do hsa-miR-181b-5p em -3,14 vzes, do hsa-miR-186-5p em -5,45 vezes e do hsa-miR-30d-5p em -3,84 vezes. E finalmente a *ELANE* teve redução da expressão dos seu dois miRNAs miRs hsa-let-7i-5p em -4,59 vezes e hsa-miR-186-5p em -5,45 (Tabela 8).

Figura 11 – Análise de expressão de 84 miRNAs no tempo pós-CEC



Vinte e quatro miRNAs (em verde) tiveram expressão regulada negativamente no grupo SEVO (n=10) em relação ao grupo CONTROLE (n=10), todos com significância estatística ($p<0,05$). **Fonte:** Autor (2020).

Tabela 8 – miRNAs com expressão reduzida no grupo SEVO em relação ao CONTROLE

Identificação do miRNA	Regulação (vezes)	Valor de p
hsa-let-7b-5p	-4,48	0,0336
hsa-let-7c-5p	-3,57	0,0367
hsa-let-7d-5p	-4,04	0,0434
hsa-let-7f-5p	-3,09	0,0014
hsa-let-7g-5p	-3,46	0,0028
hsa-let-7i-5p	-4,59	0,0050
hsa-miR-128-3p	-3,67	0,0080
hsa-miR-130a-3p	-4,53	0,0052
hsa-miR-130b-3p	-3,66	0,0004
hsa-miR-16-5p	-5,56	0,0480
hsa-miR-17-5p	-4,72	0,0465
hsa-miR-181b-5p	-3,14	0,0026
hsa-miR-181c-5p	-3,08	0,0096
hsa-miR-186-5p	-5,45	0,0436
hsa-miR-195-5p	-5,1	0,0439

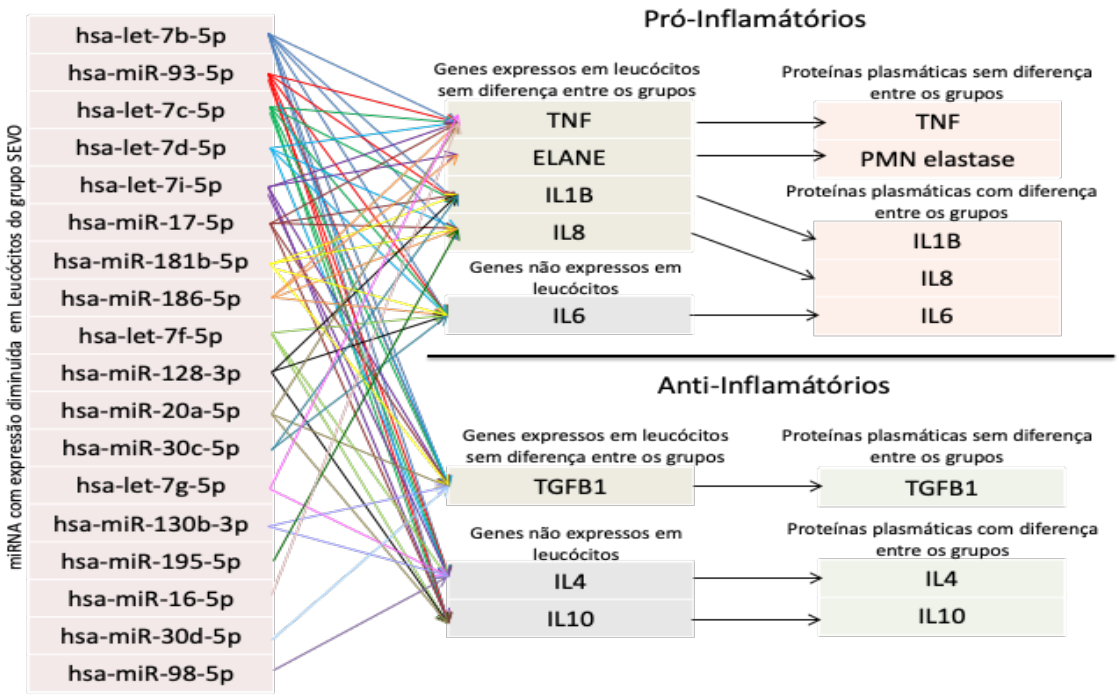
hsa-miR-20a-5p	-5,21	0,0403
hsa-miR-29b-3p	-3,95	0,0058
hsa-miR-30c-5p	-3,39	0,0277
hsa-miR-30d-5p	-3,84	0,0262
hsa-miR-424-5p	-4,78	0,0084
hsa-miR-454-3p	-3,64	0,0011
hsa-miR-607	-4,55	0,0045
hsa-miR-93-5p	-4,57	0,0087
hsa-miR-98-5p	-3,13	0,0009

Fonte: Autor (2020).

Ao analisar os alvos moleculares dos miRNAs cuja expressão foi significativamente menor no grupo SEVO, observou-se a predição de interação de 18 dos 24 miRNAs, com os genes *TNF, IL1B, IL4, IL6,CXCL8, IL10, TGFB1 e ELANE* (Figura 12 e Tabela 9). A maioria dos miRNAs, cuja expressão diferencial foi identificada entre os grupos experimentais, são preditos como reguladores da expressão dos genes de interesse desse estudo, sendo que todos os genes buscados são regulados por pelo menos 2 miRNAs (no caso de ELANE) e por até 10 miRNAs (no caso de TNF e TGFB1).

A *TNFA* pode ser regulado pelos miRs hsa-let-7b-5p, hsa-miR-93-5p, hsa-let-7c-5p, hsa-let-7d-5p, hsa-let-7i-5p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-186-5p, hsa-miR-20a-5p, hsa-let-7g-5p e hsa-miR-16-5p. A *IL-1B* pode ser regulada pelos miRs hsa-let-7b-5p, hsa-miR-93-5p, hsa-let-7c-5p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-181b-5p, hsa-miR-128-3p e hsa-miR-30c-5p. A *IL-4* pode ser regulada pelos miRs hsa-let-7b-5p, hsa-miR-93-5p, hsa-let-7c-5p, hsa-let-7d-5p, hsa-let-7i-5p, hsa-let-7f-5p, hsa-let-7g-5p, hsa-miR-130b-3p e hsa-miR-98-5p. A *IL-6* pode ser regulada pelos miRs hsa-let-7b-5p, hsa-miR-93-5p, hsa-let-7c-5p, hsa-let-7d-5p, hsa-miR-181b-5p, hsa-miR-186-5p, hsa-let-7f-5p, hsa-miR-128-3p e hsa-miR-30c-5p. A *IL-10* pode ser regulada pelos miRs hsa-let-7b-5p, hsa-miR-93-5p, hsa-let-7c-5p, hsa-let-7i-5p, hsa-miR-17-5p, hsa-let-7f-5p, hsa-miR-128-3p e hsa-miR-20a-5p. *A TGFB1* pode ser regulada pelos miRs hsa-let-7b-5p, hsa-miR-93-5p, hsa-let-7c-5p, hsa-let-7d-5p, hsa-let-7i-5p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-181b-5p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-130b-3p e hsa-miR-30d-5p. A *IL-8* pode ser regulada pelos miRs hsa-let-7b-5p, hsa-let-7d-5p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-181b-5p, hsa-miR-186-5p e hsa-miR-30d-5p. A *ELANE* pode ser regulados pelos miRs hsa-let-7i-5p e hsa-miR-186-5p. (Figura 12).

Figura 12 – Interação entre os miRNAs diferentemente expressos, os genes e as proteínas analisados



Legenda: ELANE= Elastase expressa em neutrófilos (gene); IL1B= Interleucina 1 beta; IL4= Interleucina 4; IL6= Interleucina 6; PMN elastase: Elastase expressa em neutrófilos (proteína); miRNA= micro RNA; RNAm = RNA mensageiro. **Fonte:** Autor (2020).

Tabela 9 – Predição de interação entre os miRNA cuja expressão foi reduzida no grupo SEVO e os genes analisados

	Gene							
miRNA	**TNF**	**IL1B**	**IL4**	**IL6**	**IL10**	**TGFB1**	**IL8**	**ELANE**
hsa-let-7b-5p	1	1	1	1	1	1	1	0
hsa-miR-93-5p	1	1	1	1	1	1	0	0
hsa-let-7c-5p	1	1	1	1	1	1	0	0
hsa-let-7d-5p	1	0	1	1	0	1	1	0
hsa-let-7i-5p	1	0	1	0	1	1	0	1
hsa-miR-17-5p	1	1	0	0	1	1	1	0
hsa-miR-181b-5p	0	1	0	1	0	1	1	0
hsa-miR-186-5p	1	0	0	1	0	0	1	1
hsa-let-7f-5p	0	0	1	1	1	0	0	0
hsa-miR-128-3p	0	1	0	1	1	0	0	0
hsa-miR-20a-5p	1	0	0	0	1	1	0	0
hsa-miR-30c-5p	0	1	0	1	0	0	0	0
hsa-let-7g-5p	1	0	1	0	0	0	0	0
hsa-miR-130b-3p	0	0	1	0	0	1	0	0
hsa-miR-195-5p	0	0	0	0	0	0	1	0
hsa-miR-16-5p	1	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-30d-5p	0	0	0	0	0	1	0	0
hsa-miR-98-5p	0	0	1	0	0	0	0	0

Legenda: TGFB1= Fator de crescimento transformador beta 1; ELANE= Elastase expressa em neutrófilos; IL1B= Interleucina 1 beta; IL8= Interleucina 8; TNFA= Fator de Necrose Tumoral Alfa;

IL10= Interleucina 10; IL4= Interleucina 4; IL6= Interleucina 6; 1 = O gene é predito como alvo do miRNA; 0= O gene não é predito como alvo do miRNA. Interações miRNA-alvo comprovadas experimentalmente segundo a base de dados miRTarBase (REF: 10.1093/nar/gkx1067) aparecem em destaque. **Fonte:** Autor (2020).

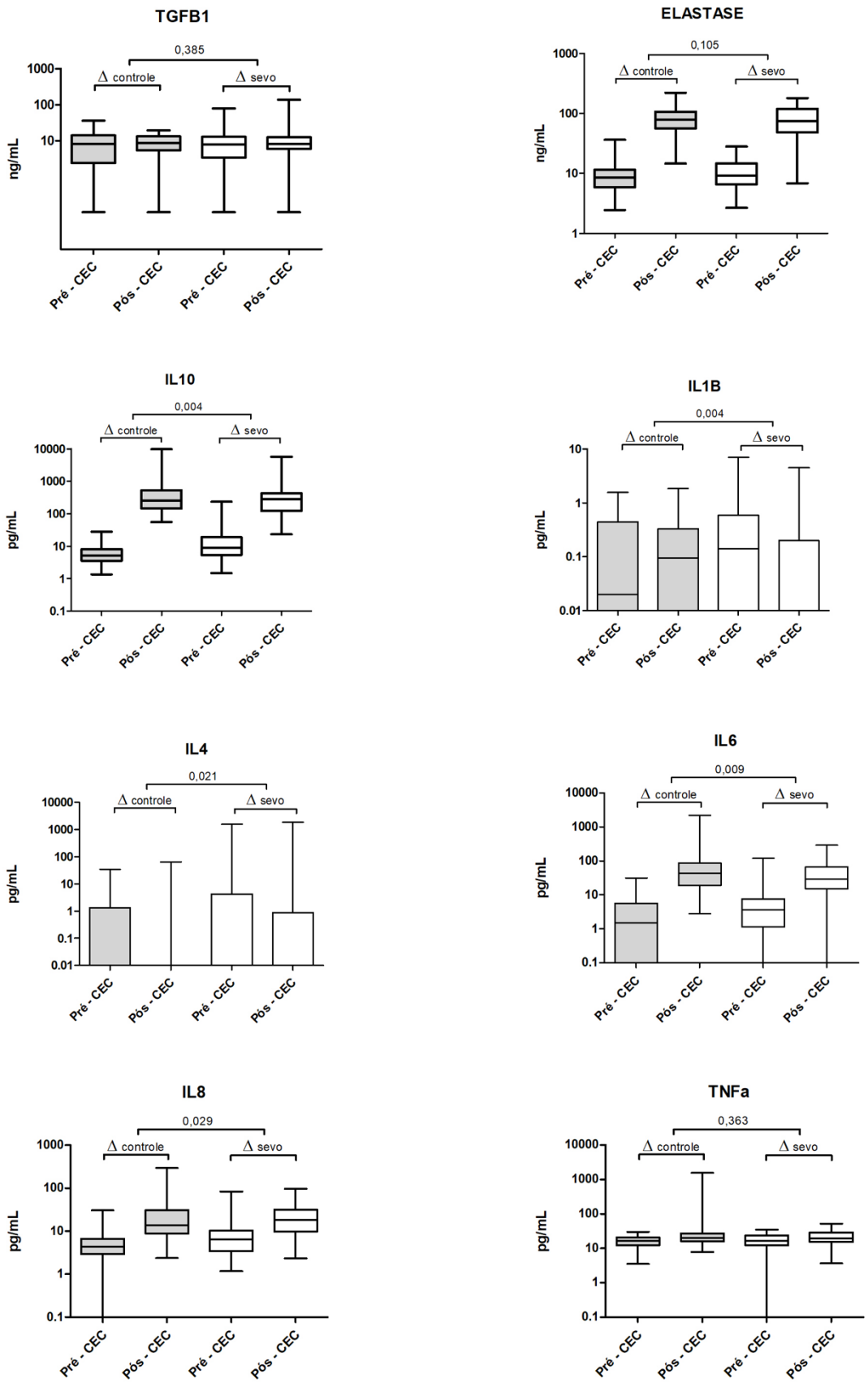
4.3 Determinação da concentração plasmática dos marcadores inflamatórios

Quanto a análise da ELASTASE (PMN-elastase) que representou o objetivo primário, não houve diferença significativa na diferença entre as médias das dosagens dos tempos pré e pós-CEC na comparação entre os grupos (p=0,107).

Quanto aos valores das concentrações das outras proteínas inflamatórias no plasma, os resultados observados entre as diferenças dos tempos pré e pós CEC no grupo SEVO em comparação ao grupo CONTROLE demonstraram uma diminuição significantemente maior na produção da IL-1b (p=0,004), um aumento menor da IL-8 (p=0,029) e IL-6 (p=0,009) todas pró-inflamatórias. Uma menor diminuição da IL-4 (p=0,021) no grupo SEVO e um aumento maior da IL-10 no grupo CONTROLE, ambas anti-inflamatórias (Figura 11 e Tabela 10). Ao analisar os valores dentro do próprio grupo seja CONTROLE ou SEVO, observou-se que ambos tiveram o mesmo perfil de aumento das proteínas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias entre os tempos pré e pós CEC, exceção feita às proteínas IL-1b e IL-4 que diminuíram entre os dois tempos em cada grupo (Figura 13 e Tabela 10).

As demais proteínas pesquisadas (TGFb e TNFa) não mostraram diferença nos tempos pré e pós CEC na comparação entre as médias das diferenças absoluta ou relativa entre os dois grupos. Estes dados confirmam os dados da expressão de mRNA de *TGFB1* e *TNFA*.

Figura 13 – Efeito do anestésico sevoflurano na concentração de TGFβ1, PMN-elastase, IL-1β, IL-8, TNFα, IL-10, IL-4 e IL-6 após a CEC



Legenda: Dados apresentados como gráficos de *boxplot*, indicando mediana e intervalo interquartil. *boxplots* brancos à direita dos gráficos = Grupo SEVO que recebeu o Sevoflurano durante a CEC; *boxplots* cinzas à esquerda dos gráficos = Grupo CONTROLE; CEC=Circulação Extracorpórea. TGBB1= Fator de crescimento transformador beta 1; PMN-elastase= Elastase expressa em neutrófilos; IL1B= Interleucina 1 beta; IL8= Interleucina 8; TNFA= Fator de Necrose Tumoral Alfa; IL10= Interleucina 10; IL4= Interleucina 4; IL6= Interleucina 6. Para comparação entre os grupos foi utilizado o Teste de Mann Whitney. **Fonte:** Autor (2020).

Tabela 10 – Efeito do anestésico sevoflurano sobre a concentração de TGFβ1, PMN-elastase, IL-1β, IL-8, TNFα, IL-10, IL-4 e IL-6 após CEC.

Analito	Controle (50)		Sevo (50)		Média da Dif. Absoluta		Média da Dif. Relativa		Valor de p*
	Pré-CEC	Pós-CEC	Pré-CEC	Pós-CEC	Controle	Sevo	Controle	Sevo	
TGFb1 (pg/mL)	9299,48 (±7706,48)	8745,46 (±5386,64)	10964,25 (±13167,29)	13960,33 (±23437,68)	-554,02 (±7002,49)	2996,08 (±18275,19)	412,72 (±2379,73)	655,47 (±2390,01)	0,385
PMN elastase (pg/mL)	10597,15 (±7434,02)	88055,61 (±45047,44)	11260,21 (±6521,83)	84727,84 (±46797,30)	77458,46 (±45284,32)	73467,63 (±44155,92)	925,82 (±804,56)	673,54 (±521,75)	0,105
IL-1b (pg/mL)	0,27 (±0,42)	0,23 (±0,35)	0,59 (±1,37)	0,33 (±0,91)	-0,04 (±0,28)	-0,25 (±0,69)	-69,31 (±161,95)	-157,09 (±59,35)	**0,004**
IL-8 (pg/mL)	5,27 (±4,53)	34,72 (±60,46)	11,24 (±16,52)	23,73 (±20,26)	29,45 (±59,61)	12,50 (±18,63)	446,90 (±858,82)	155,60 (±331,96)	**0,029**
TNFa (pg/mL)	16,21 (±5,99)	73,25 (±238,57)	17,23 (±8,84)	21,93 (±11,71)	57,04 (±238,25)	4,70 (±10,06)	249,13 (±1424,76)	-65,1 (±66,68)	0,363
IL-10 (pg/mL)	6,89 (±5,23)	538,78 (±1355,03)	21,97 (±41,29)	481,31 (±881,70)	531,89 (±1354,52)	459,35 (±878,13)	8716,21 (±17994,61)	4836,30 (±8907,49)	**0,004**
IL-4 (pg/mL)	1,92 (±5,49)	1,69 (±9,38)	83,66 (±314,26)	69,60 (±301,12)	-0,22 (±5,20)	-14,05 (±138,06)	-167,75 (±66,56)	-133,16 (±59,43)	**0,021**
IL-6 (pg/mL)	4,64 (±7,30)	95,92 (±309,19)	12,83 (±25,85)	49,16 (±57,65)	91,28 (±308,26)	36,32 (±54,70)	4849,41 (±9361,32)	1449,47 (±3161,11)	**0,009**

Legenda: CEC = Circulação Extracorpórea; TGFB1= Fator de crescimento transformador beta 1; PMN-elastase= Elastase expressa em neutrófilos; IL1B= Interleucina 1 beta; IL8= Interleucina 8; TNFA= Fator de Necrose Tumoral Alfa; IL10= Interleucina 10; IL4= Interleucina 4; IL6= Interleucina 6; Pré-CEC= Imediatamente antes do início da CEC (T0) e pós-CEC=90 minutos após o início da CEC (T1). *Comparação das médias da diferença relativa entre os valores do Pré-CEC e pós-CEC (delta) entre os dois grupos de estudo utilizando o teste Mann Whitney. **Fonte:** Autor (2020).

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Nesse estudo é possível notar que o gênero masculino, prevalente nos dois grupos, o estado físico tipo 2 da ASA, a classe funcional tipo 2 da NYHA e o EuroSCORE no grupo de baixo risco, são semelhantes ao perfil de pacientes de um estudo multicêntrico recente que também comparou as técnicas anestésicas inalatórias com Xenônio e Sevoflurano (grupos distintos) e a anestesia intravenosa total, cujo objetivo primário foi a medida da troponina I como marcador de lesão cardíaca devido a IR da CEC na cirurgia de revascularização do miocárdio e concluiu haver um papel dos anestésicos inalatórios na resposta inflamatória[54].

Os dois grupos também foram homogêneos em relação aos tempos de anestesia, de cirurgia, de anóxia e de perfusão, tal qual o estudo de Lemoine *et al*.[55] que afastou a interferência desses fatores intra-operatórios na resposta ao processo de IR pelo uso do sevoflurano. De igual modo também tivemos a hipertensão arterial sistêmica como fator pré-operatório dominante em ambos os estudos.

Observou-se que o uso do medicamento inibidor da enzima conversora de angiotensina (IECA) foi mais prevalente no grupo SEVO, porém sem relação com os resultados da resposta inflamatória. O mesmo não se pode dizer sobre o uso das estatinas, já comprovadamente associadas a redução de processos inflamatórios[56], inclusive no período pós-CEC, mesmo tendo sido iniciado poucos dias antes da cirurgia, conforme Ozguler *et al*.[57].

Um dado interessante nos nossos resultados clínicos pós-operatórios apontou para uma diferença significativa no tempo de intubação orotraqueal, maior no grupo SEVO (**p=0,049**).

Landoni *et al*[58] em um estudo comparando a anestesia inalatória com sevoflurano e anestesia intravenosa total com propofol não observou diferença no tempo de ventilação mecânica. Uma possível explicação para nosso estudo ter divergido dos outros dois se deve ao fato do tempo de intubação ter sido medido em minutos e não em horas como os anteriores ou pelo fato das populações estudadas serem diferentes entre si, no caso do primeiro, tem-se uma população pediátrica e no caso do segundo foram avaliados pacientes de alto risco (EuroSCORE médio > 6). No tempo de permanência na UTI o nosso estudo se assemelhou ao segundo, pois não houve diferença significativa entre os dois grupos (p=0,11 e p=0,2, respectivamente).

No período de recuperação dos pacientes podemos citar ainda as complicações pós-operatórias que mostraram semelhança entre os dois grupos estudados. Isso também ficou comprovado a partir do estudo multicêntrico de Landoni[58] e da metanálise de Yu *et al*[59] que provaram não haver repercussões clínicas capazes de impactar diretamente na morbidade quando se utilizou ou não o sevoflurano.

Sobre a mortalidade em 30 dias nossos dados são concordantes com a literatura mais recente, visto que não houve diferença significativa. Foram apenas 5 óbitos, sendo 2 no grupo CONTROLE e 3 no grupo SEVO (p=0,212). Esse resultado mostrou semelhança ao estudo MYRIAD, cuja mortalidade em 30 dias e 1 ano não foi diferente entre os grupos com e sem o uso de sevofluorano[60].

Nesse sentido o estudo de Nader *et al*[61] que adiciona o sevoflurano na solução de cardioplegia e compara um grupo sevoflurano com um grupo controle identificou uma redução de IL-6 nos pacientes do grupo do sevoflurano.

Nossos resultados corroboram a literatura[11,61], pois quanto aos valores das proteínas, quando avaliada a diferença relativa de produção entre os tempos pré e pós CEC, foi observada uma diminuição maior na produção de IL-1b e IL-8 no grupo SEVO, uma menor redução da IL-4 também no grupo SEVO e um aumento na produção de IL-6 no plasma circulante menos importante no grupo SEVO, porém um aumento menos pronunciado da IL-10 que é uma citocina anti-inflamatória, sugerindo uma resposta anti-inflamatória proporcional a resposta inflamatória.

Diante dos resultados encontrados, os dados sugerem que pode ter ocorrido uma regulação pós-transcricional que interferiu na etapa final de síntese (tradução) dos marcadores inflamatórios IL-1b, IL-4, IL-6, IL-8 e IL-10. No caso da IL-1b, IL-8 e IL-6, que são citocinas pró-inflamatórias, a menor produção dessas proteínas leva a uma diminuição do estado inflamatório do paciente. No entanto, isso também ocorreu com a IL-4, que é uma citocina anti-inflamatória. O processo cirúrgico mais a CEC leva ao estimulo do processo inflamatório de forma importante, o impacto da redução da citocina anti-inflamatória é menor do que o impacto da redução das citocinas pró-inflamatórias, o que consequentemente nos mostra um perfil menos inflamado dos pacientes do grupo SEVO.

A PMN-elastase, têm diferentes dinâmicas em sua liberação após a ativação inflamatória de leucócitos[62]. Ela está contida em grânulos polimorfonucleares e é liberada precocemente, sendo responsável pela defesa imunológica extracelular após a exposição ao circuito da CEC com um pico de concentração em 90 minutos in vitro[9]. Curiosamente,

a inibição da ativação de neutrófilos sugerida em alguns estudos experimentais pelo inibidor específico de neutrófilos chamado sivelestat[63,64] reduziu os valores de PMN-elastase da mesma forma que o sevoflurano fez *in vitro*[9].

A expressão diminuída dos miRNAs nos leucócitos dos pacientes do grupo SEVO em relação ao CONTROLE, podem indicar um maior deslocamento e ação desses miRNAs no principal foco da inflamação, no caso local da cirurgia ou nos tecidos onde o processo de IR são mais importantes como coração, pulmão, rins, intestino. Sendo assim, esses miRNAs estariam realizando uma maior clivagem dos mRNA no local da inflamação levando a uma menor produção das citocinas locais.

Alguns estudos indicam que o canal de potássio sensível ao trifosfato de adenosina (ATP) pode ter papel fundamental na proteção do miocárdio induzido pelo sevoflurano[65,66]. Existem estudos clínicos demonstrando que o sevoflurano reduz a adesão de neutrófilos no sistema coronário em um modelo cardíaco de IR[67], inibe a migração de neutrófilos[68], a geração de radicais livres de oxigênio por células inflamatórias[69], complicações pulmonares[70] e também a liberação de citocinas por células mononucleares periféricas humanas cultivadas[71]. Esses estudos sugerem que o sevoflurano pode proteger contra a IR por meio da inibição das citocinas pró-inflamatórias liberadas durante a CEC, ao contrário de um estudo com sevoflurano antes da CEC[7].

Sabe-se que a IL-8 pode ativar neutrófilos. Isso proporciona um aumento nos receptores de adesão de neutrófilos como o Mac-1, que indiretamente acaba prejudicando a microcirculação e danificando os tecidos ao seu redor. Essa resposta é mantida por um ciclo vicioso que pode ser suprimido pela redução da liberação de IL-8[72,73].

A liberação de IL-6, bem como de IL-8, tem um impacto negativo na contratilidade miocárdica, pois produz uma regulação negativa dos receptores beta[74] pós-IR. Portanto, promover uma redução dessas duas citocinas pode resultar em melhores desfechos cardíacos no pós-operatório. Nosso estudo observou uma redução dessas duas citocinas, porém o número de complicações foi idêntico entre os dois grupos.

A IL-1b é uma citocina pró-inflamatória produzida por monócitos e macrófagos em resposta a outras citocinas[75,76]. Como nossa pesquisa evidenciou uma regulação negativa na expressão de 18 miRNAs nos leucócitos circulantes do grupo SEVO de forma significativa, deveríamos esperar que o processo de transcrição da IL-1b sofresse interferência positiva, ou seja, um aumento de IL-1b, assim como Hutchison *et al.*[77] mostrou em relação ao miR181 que foi capaz de aumentar a IL-1b quando regulado

negativamente. Porém, nossas evidências sugerem o contrário, visto que o miR181 esta reduzido nos pacientes do grupo SEVO, bem como e a IL-1b que foi regulada por leva, levando a crer num mecanismo diferente do poderia ser esperado.

Diante disso, a IL-1b implicada na mudança de macrófagos associados a ferida operatória para um modo anti-inflamatório com aumento da expressão da IL-10[78] como auto regulação da inflamação, sustentaria uma ação conjunta desses citocinas no ambiente de uma cirurgia de revascularização do miocárdio com CEC, pois tanto a IL-1b quanto a IL-10 estão mais reduzidas no grupo SEVO, supondo uma atuação mais local e menos sistêmica, o que poderia justificar uma redução dos miRNA leucocitários deslocados para atuar em sítios inflamatórios específicos como a ferida operatória.

Chafin *et al*[79] ao estudar a inflamação local de células mesangiais renais de camundongos com lupus verificou que a superexpressão do miRNA let-7a causou um aumento de IL-6. Ao mesmo tempo quando se utilizou a medicação Actinomicina D houve uma maior degradação da IL-6 com forte atuação sobre a proteína tristetraprolina que uma vez reduzida, diminui a ação do miRNA let-7a, que degrada mRNA da IL-6. Podemos supor pelos nossos resultados que o sevoflurano pode influenciar negativamente os miRNA da família let-7, que atua em todas as proteínas estudadas, deixando de exercer seu efeito positivo sobre elas e ao invés de fazê-las aumentar, as fez diminuir (IL-1, IL-4, IL-6 e IL-8) proporcionalmente na comparação entre os grupos estudados.

A redução da expressão dos miRNAs poderia ser responsável pelo aumento geral também das citocinas anti-inflamatórias, porém observou-se uma diminuição da IL-4 (p=0,021) menor no pós-CEC do grupo SEVO. No entanto, a expressão gênica leucocitária desta citocina e de todas as demais não apresentou diferença no pós-CEC, restando uma provável ação epigenética na qual os miRNAs sofrem alguma interferência pelo sevoflurano que cria um possível fenótipo anti-inflamatório durante a CEC que reduz a ação degradadora dos miRNA sobre a IL-4. Esta por sua vez é produzida por linfócitos T e mastócitos e estimula os linfócitos B a produzir anticorpos[80] que será menos importante no cenário da revascularização com CEC.

O mesmo processo pode ser observado com os miRNAs que podem influenciar na síntese da IL-10, pois o grupo CONTROLE com mais miRNAs diferentemente expressos teria uma maior degradação da proteína alvo, nesse caso a IL-10. Porém o que se observou foi um aumento maior dessa proteína no plasma dos pacientes que não receberam sevoflurano. Isso leva a crê mais uma vez numa ação conjunta e equilibrada

das vias inflamatória e anti-inflamatória, pois tanto a IL-1b quanto a IL-10 do grupo SEVO estão menores em comparação ao CONTROLE.

Estes resultados mostram que o efeito benéfico do sevoflurano tem mecanismo atuantes no processo anti-inflamatório induzindo e inibindo citocinas com esta função. Finalmente, estudos sugerem que dependendo de qual fase do ciclo esteja uma determinada célula os diferentes miRNAs podem atuar supra ou infra regulando o mRNA e diminuindo ou aumentando sua tradução e a formação das citocinas a elas relacionadas[81,82].

6 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

6 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

As limitações do nosso estudo incluem:

a) Ausência de medidas laboratoriais para avaliação epigenética além da expressão de miRNAs como metilação de DNA e de histonas.
b) Dosagem de miRNAs apenas leucocitários.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Apesar de não haver diferenças na expressão dos genes pró e anti-inflamatórios presentes nos leucócitos entre os grupos, o uso do anestésico sevoflurano durante a CEC não mostrou diminuição da resposta inflamatória a partir da redução da medida da PMN-elastase no grupo SEVO. Os miRNAs diferentemente expressos com significância estatística tiveram menor expressão no grupo SEVO em todos os casos sugerindo um mecanismo alternativo para regulação negativa dos mRNAs da IL-1b, IL-4, IL-6 e IL-8 e positiva no caso da IL-10. O sevoflurano diminuiu a resposta inflamatória sem impacto direto na morbimortalidade. Entretanto, são necessários mais estudos clínicos e laboratoriais para comparar o perfil anti-inflamatório e pesquisar o real papel dos miRNAs nesse processo.

8 ANEXOS

8 ANEXOS

8.1 ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
Coordenadoria de Serviços de Saúde
INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA
Comitê de Ética em Pesquisa

DATA DA ENTRADA: 23 de outubro de 2015.
DATA DA 1ª AVALIAÇÃO: 03 de novembro de 2015.
DATA DA AVALIAÇÃO FINAL: 09 de novembro de 2015.
CAAE: 50361215.5.0000.5462
Nº DO PROTOCOLO NO CEP: 4617
(este nº deverá citar nas correspondências referentes a este projeto)
Investigador Principal: Thiago Augusto Azevedo Maranhão Cardoso
Orientadores: Profª Dra. Amanda GMR Sousa e Prof. Dr. Caetano Nigro Neto
Nº Total de Sujeitos no Centro: 100
Nº Total de Sujeitos no Brasil: 100
Nº Total de Sujeitos no Estudo: 100
Área de Conhecimento: Grande Área 4. Ciências da Saúde
Área Temática Especial: Não se aplica
Fase: Não se aplica
Duração do Estudo: 18 meses
Apoio/ Patrocinador: FAPESP
Instituição Proponente: Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia
CEP Proponente: Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia

Projeto de Pesquisa Clínica/ Tese de Doutorado: Avaliação da resposta inflamatória sistêmica com o uso de anestésico inalatório sevoflurano durante a circulação extracorpórea.
Considerações/Comentários: A presente pesquisa tem como objetivo é analisar se o anestésico inalatório sevoflurano pode alterar a reposta inflamatória induzida pela CEC, reduzindo de forma significativa a liberação de marcadores inflamatórios, principalmente a PMN elastase.

Ao se proceder à análise ao projeto em questão, considera-se que:

a) O projeto preenche os requisitos fundamentais da Resolução CNS 466 de 12 de Dezembro de 2012, sobre as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, do Conselho Nacional de Saúde / Agência Nacional de Vigilância Sanitária e as Boas Práticas de Pesquisa Clínica do ICH-GCP.
b) O Comitê de Ética em Pesquisa avaliou e aprovou o Projeto de Pesquisa e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.
c) O Comitê de Ética em Pesquisa segue os preceitos da Resolução CNS 466 de 12 de Dezembro de 2012, sobre as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, do Conselho Nacional de Saúde / Conselho Nacional de Ética em Pesquisa / Agência Nacional de Vigilância Sanitária e as Boas Práticas de Pesquisa Clínica do ICH-GCP.

Diante do exposto, O Comitê de Ética em Pesquisa, manifesta-se pela:

- Protocolo de Pesquisa Clínica – Aprovado
- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Aprovado
- Declarações do Pesquisador: Carta de orientação; Declaração de realização do estudo Gisele Medeiros Bastos e Dr. Luiz Carlos Bento de Souza; Compromisso da Instituição; Orçamento financeiro detalhado; Forma de recrutamento; Propriedade das informações; Manuseio de material biológico; Publicação dos resultados; Responsabilidade, direitos

Av. Dr. Dante Pazzanese, 500 • Ibirapuera • São Paulo – SP • CEP: 04012-909 • Fone: (11) 5085 6040 • E-mail: cep@dantepazzanese.org.br

FORM 501/DPC Mar/09 rev.1

57

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
Coordenadoria de Serviços de Saúde
INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA
Comitê de Ética em Pesquisa

e obrigações; Compromisso do investigador; Lista de centros; Riscos e benefícios; Confidencialidade; Notificação de EAS ao CEP; Currículo Lattes – Entregue

- Carta de encaminhamento ao CEP – Entregue
- Folha de Rosto – Entregue

O Comitê de Ética em Pesquisa solicita:

a) Comunicar qualquer alteração no projeto e/ou TCLE.
b) Comunicar qualquer evento adverso sério ocorrido durante a condução do estudo.
c) Elaborar e apresentar ao CEP relatórios semestrais sobre o andamento da pesquisa.

Situação: Protocolo Avaliado e Aprovado por este Comitê de Ética em Pesquisa em 09 de Novembro de 2015.

São Paulo, 09 de novembro de 2015.

Dr. Pedro Silvio Farsky
Coordenador do CEP
Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia

Av. Dr. Dante Pazzanese, 500 - Ibirapuera - São Paulo – SP - CEP: 04012-909 - Fone: (11) 5085 6040 - E-mail: cep@dantepazzanese.org.br

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
Coordenadoria de Serviços de Saúde
INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA
Comitê de Ética em Pesquisa

Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia

Membros do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia
GESTÃO 2014/2017

MEMBROS INDICADOS	PROFISSÃO
Abílio Augusto Fragata Filho	Médico
Antonio Flavio Sanchez de Almeida	Médico
Celia Hiromi Shiotsu	Enfermeira
Cristiane Kovacs Amaral	Nutricionista
Daniel Fomariz Legendre	Engenheiro
Flávia Rezende Pizardo	Advogada
Gláucio Furlanetto	Médico
Gustavo Bernardes de Figueiredo Oliveira	Médico
José de Ribamar Costa Junior	Médico
Michele Fernanda Canfild Antunes Germini	Fonoaudióloga
Otílio Geraldo Basílio	Representante dos Usuários
Patrícia Paiva	Farmacêutica
Pedro Silvio Farsky	Médico
Priscila Cristina de Abreu Sperandio	Fisioterapeuta
Rika Miyahara Kobayashi	Enfermeira
Rudy Antonio Mildner	Padre/ Capelania
Sônia Lima Medeiros	Assistente Social

Av. Dr. Dante Pazzanese, 500 • Ibirapuera • São Paulo – SP • CEP: 04012-909 • Fone: (11) 5085 6040 • E-mail: cep@dantepazzanese.org.br

8.2 ANEXO B – Registro do clinicaltrials.gov

ClinicalTrials.gov PRS
Protocol Registration and Results System

Contact ClinicalTrials.gov PRS
Org: Dantepazzanese User: TCardoso Logout

Quick Links
New Record
Quick Start Guide
Problem Resolution Guide

Records Accounts Help

Email: thiago-ma@hotmail.com [Update]
Help us improve: PRS Survey

Record List

Showing: 1 record

Show/Hide Columns

	Protocol ID	ClinicalTrials.gov ID	Brief Title	Record Status	Last Update	Responsible Party	Problems
Open	4617	NCT02672345	Systemic Inflammatory Response Evaluation With the Use of Inhaled Anesthetic Sevoflurane During CPB	Public	06/20/2020 20:12	Thiago Augusto Azevedo Maranhão Cardoso thiago-ma@hotmail.com	

KEY: R Results DR Delayed Results D Study Documents PR PRS Review
U XML Upload NP No longer public PRS Review Comments

Download...

U.S. National Library of Medicine | U.S. National Institutes of Health | U.S. Department of Health & Human Services

9 APÊNDICES

9 APÊNDICES

9.1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
Coordenadoria de Serviços de Saúde
INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TÍTULO DO ESTUDO: Avaliação da resposta inflamatória sistêmica com o uso de anestésico inalatório sevoflurano durante a circulação extracorpórea.

CENTRO: INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA
INVESTIGADOR:
NÚMERO DO PACIENTE:
INICIAIS DO PACIENTE:

OBJETIVO DESTE ESTUDO

Você está sendo convidado para participar deste estudo, porque queremos avaliar como o Sevoflurano (um gás anestésico normalmente usado durante a cirurgia) pode contribuir para dar menos inflamação provocada durante a cirurgia cardíaca. Essa avaliação será feita a partir da medição em laboratório da quantidade de algumas substâncias no sangue, produzidas pelo próprio paciente durante e após sua cirurgia. O objetivo é esclarecer os benefícios reais da diminuição dessa inflamação quando comparamos a anestesia com esse gás anestésico em relação a anestesia sem ele durante e após uma cirurgia cardíaca, que utiliza na sua técnica operatória o circuito de Circulação Extracorpórea (que chamamos de CEC).

PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

Caso você queira participar deste estudo, você será submetido a anestesia geral. Todas essas medicações são utilizadas de rotina em nossa instituição. Caso

quando os resultados do estudo forem publicados, pois, você está autorizando que seus dados sejam publicados em revistas, artigos e sejam tema de debates e aulas. As informações coletadas durante o estudo serão armazenadas em um computador, mas seu nome não. Seu médico será informado de sua participação neste estudo.

NOVOS ACHADOS

Você será informado sobre quaisquer novos achados importantes que se tornarem disponíveis durante o estudo e que possam influenciar seu desejo de continuar ou não a participar do estudo.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA E CONSENTIMENTO

Sua participação neste estudo é voluntária. Você pode se recusar a participar ou pode desistir, a qualquer momento durante o estudo, sem ter que dar explicações. Isso não mudará a qualidade de atendimento que você estará recebendo, nem lhe causará qualquer tipo de penalidade.

Os membros da equipe de pesquisa podem encerrar sua participação no programa de pesquisa após análise das razões pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição. O motivo será explicado a você e pode ser devido a alguma alteração médica que possa colocá-lo em risco de outras complicações se continuar a participar, cancelamento do estudo pela coordenação do estudo, por você não cumprir as orientações dadas pela equipe de pesquisa ou outras questões administrativas. Caso isso venha a acontecer seu tratamento continuará sendo feito pelo seu médico da mesma forma como seria feito rotineiramente.

Caso você apresente algum efeito colateral durante o estudo, você deve entrar em contato imediatamente com o (responsável pelo estudo) pelos telefones (11)941477885 ou (11)5085-6153 ou (11)5085-6188 ou (11)3262-1144.

SOLICITAÇÃO DE INFORMAÇÕES ADICIONAIS

quando os resultados do estudo forem publicados, pois, você está autorizando que seus dados sejam publicados em revistas, artigos e sejam tema de debates e aulas. As informações coletadas durante o estudo serão armazenadas em um computador, mas seu nome não. Seu médico será informado de sua participação neste estudo.

NOVOS ACHADOS

Você será informado sobre quaisquer novos achados importantes que se tornarem disponíveis durante o estudo e que possam influenciar seu desejo de continuar ou não a participar do estudo.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA E CONSENTIMENTO

Sua participação neste estudo é voluntária. Você pode se recusar a participar ou pode desistir, a qualquer momento durante o estudo, sem ter que dar explicações. Isso não mudará a qualidade de atendimento que você estará recebendo, nem lhe causará qualquer tipo de penalidade.

Os membros da equipe de pesquisa podem encerrar sua participação no programa de pesquisa após análise das razões pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição. O motivo será explicado a você e pode ser devido a alguma alteração médica que possa colocá-lo em risco de outras complicações se continuar a participar, cancelamento do estudo pela coordenação do estudo, por você não cumprir as orientações dadas pela equipe de pesquisa ou outras questões administrativas. Caso isso venha a acontecer seu tratamento continuará sendo feito pelo seu médico da mesma forma como seria feito rotineiramente.

Caso você apresente algum efeito colateral durante o estudo, você deve entrar em contato imediatamente com o (responsável pelo estudo) pelos telefones (11)941477885 ou (11)5085-6153 ou (11)5085-6188 ou (11)3262-1144.

SOLICITAÇÃO DE INFORMAÇÕES ADICIONAIS

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
Coordenadoria de Serviços de Saúde
INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA

O investigador clínico, Dr. Thiago Augusto Azevedo Maranhão Cardoso, tel (11)941477885 ou (11)5085-6153 ou (11)5085-6188, irá responder todas as dúvidas que você possa ter sobre sua participação neste estudo. Em caso de dúvidas ou preocupações quanto aos seus direitos como participante deste estudo, você pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia no tel 5085-6040. Uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será entregue a você.

Li e compreendi este termo de consentimento e todas as minhas dúvidas foram resolvidas. Recebi explicações sobre o objetivo da pesquisa, os procedimentos de estudo a que serei submetido e os possíveis riscos e desconfortos e os benefícios que posso apresentar. As alternativas à minha participação neste estudo também foram discutidas. Portanto, concordo voluntariamente em fornecer meu consentimento para participar deste estudo clínico.

_____	_____	____:____ h
Assinatura do Paciente	Data	Hora
_____	_____	____:____ h
Testemunha (se necessário)	Data	Hora
_____	_____	____:____ h
Assinatura do Investigador	Data	Hora

9.2 Ficha de Dados demográficos e clínicos pré e pós-operatórios

FICHA DE AVALIAÇÃO

Critérios de Inclusão

Idade ≥ 18 anos	**( ) Sim**	**( ) Não**
Termo de consentimento livre e esclarecido	**( ) Sim**	**( ) Não**
Cirurgia eletiva	**( ) Sim**	**( ) Não**
Cirurgia cardíaca eletiva com CEC	**( ) Sim**	**( ) Não**

Critérios de Exclusão

Pacientes em uso de corticosteróides, anti-inflamatórios ou qualquer medicação imunossupressora	**( ) Sim**	**( ) Não**
Reoperações de cirurgias cardíacas	**( ) Sim**	**( ) Não**
Presença de asma, DPOC, doenças autoimunes	**( ) Sim**	**( ) Não**
Participação em outros estudos clínicos	**( ) Sim**	**( ) Não**
Presença de insuficiências cardíaca (classe funcional III ou IV), hepática ou renal	**( ) Sim**	**( ) Não**
Cirurgia combinada eletiva (ex.: correção aneurisma + revascularização do miocárdio)	**( ) Sim**	**( ) Não**
Infarto agudo do miocárdio nos últimos 30 dias	**( ) Sim**	**( ) Não**
Angina instável	**( ) Sim**	**( ) Não**
Obesidade (IMC>50kg/m^2)	**( ) Sim**	**( ) Não**
Gravidez	**( ) Sim**	**( ) Não**
Procedimentos de emergência	**( ) Sim**	**( ) Não**
Bloqueio de neuro-eixo	**( ) Sim**	**( ) Não**

OBS : Médico responsável pela pesquisa : Dr. Thiago Augusto Azevedo Maranhão Cardoso. Qualquer dúvida entrar em contato com: (11)941477885, (11)55746227, (11)55395996 ou (11)50854000 ramal 4153.

FICHA DE AVALIAÇÃO

Pré e Intra-Operatório

1. Nome:_____ 2. Tel.: _____

3. Nº da Randomização:_____ 4. Data: ____/_____/____

5. Sexo: _____ 6. Idade: _____

7. Peso: _____ 8. Altura: _____ 9. IMC:_____

10. ASA: 0.I 1.II 2.III 3.IV

11. Fatores de risco:

Diabetes Mellitus	0.sim	1.não
Hipertensão Arterial	0.sim	1.não
Dislipidemia	0.sim	1.não
Tabagismo	0.sim	1.não

12. Medicações pré-operatórias

Beta-bloqueador	0.sim	1.não
IECA ou BRA	0.sim	1.não
Diurético	0.sim	1.não
Bloqueador de Cálcio	0.sim	1.não
Estatina	0.sim	1.não
Digital	0.sim	1.não
Nitrato	0.sim	1.não
Outros	0.sim	1.não

13. Pré-Anestésico: horário/medicação:_____/_____

14. Anestesia: hora do início:_____ hora do término:_____

15. Cirurgia: hora do início:_____ hora do término:_____

16. CEC: tempo de anóxia:_____ tempo de perfusão:_____

OBS : Médico responsável pela pesquisa : Dr. Thiago Augusto Azevedo Maranhão Cardoso. Qualquer dúvida entrar em contato com: (11)941477885, (11)55746227, (11)55395996 ou (11)50854000 ramal 4153.

FICHA DE AVALIAÇÃO

Pós-operatório

1. Nome:_____ **2. Tel.:** _____

3. Nº da Randomização:_____ **4. Data:** ____/_____/____

18. Horário de Extubação: _____hs **19. Tempo de ventilação mecânica:** _____

20. Complicações pós-operatório:

Necessidade de marca passo	0.sim	1.não
Reoperação	0.sim	1.não
Reintubação	0.sim	1.não
Arritmias	0.sim	1.não
Transfusão maciça (1,5x a volemia ou >20U de hemácias)	0.sim	1.não
Insuficiência renal	0.sim	1.não
Infarto	0.sim	1.não
Morte	0.sim	1.não
Outras	0.sim	1.não

21. Alta da UTI
data:_____/_____/_____
horário:_____hs

22. Painel de marcadores inflamatórios

	PMN elastase	IL1 β	IL 8	TGFβ1	IL 6	TNFα	IL10
T0 – basal (antes da indução)							
T1 – pré-CEC pós indução							
T2 – 90 minutos pós-CEC							
T3 – 24 hs pós-CEC							

23. Mortalidade Cardiovascular em 30 dias
( ) Sim ( ) Não

24. Mortalidade Cardiovascular em 1 ano
( ) Sim ( ) Não

OBS : Médico responsável pela pesquisa : Dr. Thiago Augusto Azevedo Maranhão Cardoso. Qualquer dúvida entrar em contato com: (11)941477885, (11)55746227, (11)55395996 ou (11)50854000 ramal 4153.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS[1]

1. Kaufman R, Kuschnir MCC, Xavier RMA, Santos MA, Chaves RBM, Müller RE *et al*. Perfil Epidemiológico na Cirurgia de Revascularização Miocárdica. Rev Bras Cardiol. 2011;24(6):369-376.
2. Paez RP, Hossne Junior NA, Santo JADE, Berwanger O, Santos RHN, Kalil RAK *et al*. Coronary Artery Bypass Surgery in Brazil: Analysis of the National Reality Through the BYPASS Registry. Braz J Cardiovasc Surg 2019;34(2):142-148.
3. Passaroni AC, Silva MAM, Yoshida WB. Cardiopulmonary bypass: development of John Gibbon's heart-lung machine. Braz J Cardiovasc Surg 2015;30(2):235-245.
4. Grocott HP, Stafford-smith FM, Mora-mangano CT. 31 - Cardiopulmonary Bypass Management and Organ Protection. In: Kaplan's Cardiac Anesthesia. Seventh Ed. Elsevier Inc. 2017, pp. 1111–1161.
5. Sugita J, Fujiu K. Systemic Inflammatory Stress Response During Cardiac Surgery. Int Heart J 2018; 59: 457-459.
6. Verrier ED. Cardiac Surgery. J Am Coll Surg 1999;188(2):104-110.
7. Karuppasamy P, Chaubey S, Dew T, Musto R, Sherwood R, Desai J, John L *et al*. Remote intermittent ischemia before coronary artery bypass graft surgery: a strategy to reduce injury and inflammation?. Basic Res Cardiol 2011 106:511–519.
8. Bronicki RA, Hall M. Cardiopulmonary Bypass-Induced Inflammatory Response: Pathophysiology and Treatment. Pediatr Crit Care Med 2016;17:272–278.
9. Schmid E, Krajewski S, Bachmann D, Kurz J, Wendel HP, Rosenberger P *et al*. The volatile anesthetic sevoflurane inhibits activation of neutrophil granulocytes during simulated extracorporeal circulation. International Immunopharmacology 2012;14(2):202–208.
10. Squiccimarro E, Labriola C, Malvindi PG, Margari V, Guida P, Visicchio G *et al*. Prevalence and clinical impact of systemic inflammatory reaction after cardiac surgery. J Cardiothorac Vasc Anesth 2019;33(6):1682-1690.
11. Kawamura T, Kadosaki M, Nara N, Kaise A, Suzuki H, Endo S *et al*. Effects of Sevoflurane on Cytokine Balance in Patients Undergoing Coronary Artery Bypass Graft Surgery. J Cardiothorac Vasc Anesth 2006;20(4):503–508.

12. Annecke T, Chappell D, Chen C, Jacob M, Welsch U, Sommerhoff CP *et al*. Sevoflurane preserves the endothelial glycocalyx against ischaemia-reperfusion injury. Br J Anaesth 2010;104(4):414–421.
13. Chappell D, Heindl B, Jacob M, Annecke T, Chen C, Rehm M *et al*. Sevoflurane reduces leukocyte and platelet adhesion after ischemia-reperfusion by protecting the endothelial glycocalyx. Anesthesiology 2011;115(3):483–491.
14. Landoni G, Fochi O, Bignami E, Calabrò MG, D'Arpa MC, Moizo E *et al*. Cardiac protection by volatile anesthetics in non-cardiac surgery ? A meta-analysis of randomized controlled studies on clinically relevant endpoints. HSR Proc Intensive Care Cardiovasc Anesth 2009;1(4):34-43.
15. Bignami E, Biondi-Zoccai G, Landoni G, Fochi O, Testa V, Sheiban I *et al*. Volatile anesthetics reduce mortality in cardiac surgery . J Cardiothorac Vasc Anesth 2009;23(5):594–599.
16. Nordén I. The influence of anaesthetics on systemic vascular resistance during cardiopulmonary bypass. Scand Cardiovasc J 1974;8(2):81–87.
17. Landoni G, Biondi-Zoccai GGL, Zangrillo A, Bignami E, D'Avolio S, Marchetti C, et al. Desflurane and sevoflurane in cardiac surgery: a meta-analysis of randomized clinical trials. J Cardiothorac Vasc Anesth 2007;21(4):502–511.
18. Jakobsen CJ, Berg H, Hindsholm KB, Faddy N, Sloth E. The Influence of Propofol Versus Sevoflurane Anesthesia on Outcome in 10,535 Cardiac Surgical Procedures. J Cardiothorac Vasc Anesth 2007;21(5):664–671.
19. De Hert SG, Ten Broecke PW, Mertens E, Van Sommeren EW, De Blier IG, Stockman BA, et al. Sevoflurane but not propofol preserves myocardial function in coronary surgery patients. Anesthesiology 2002;97(1):42–49.
20. Nigro Neto C, Simone F De, Cassarà L, Silva CGS, Cardoso TAAM *et al*. Tricks, tips , and literature review on the adapted vaporize system to deliver volatile agents during cardiopulmonary bypass. Ann Card Anaesth 2016;19(2):240-244.
21. De Hert SG, Van Der Linden PJ, Cromheecke S, Meeus R, Nelis A, Van Reeth V *et al*. Cardioprotective properties of sevoflurane in patients undergoing coronary surgery with cardiopulmonary bypass are related to the modalities of its administration. Anesthesiology 2004;101(2):299–310.
22. Landoni G, Augoustides JG, Guarracino F, Santini F, Ponschab M, Pasero D *et al*. Mortality reduction in cardiac anesthesia and intensive care: Results of the first

International Consensus Conference. Acta Anaesthesiol Scand 2011;55(3):259-266.

23. Kortekaas KA, Van Der Baan A, Aarts LPHJ, Palmen M, Cobbaert CM, Verhagen JCM *et al*. Cardiospecific sevoflurane treatment quenches inflammation but does not attenuate myocardial cell damage markers: A proof-of-concept study in patients undergoing mitral valve repair. Br J Anaesth 2014;112(6):1005–1014.
24. Nigro Neto C, Arnoni R, Rida BS, Landoni G, Tardelli MA. Randomized trial on the effect of sevoflurane on polypropylene membrane oxygenator performance. J Cardiothorac Vasc Anesth 2013;27(5):903–907.
25. Nigro Neto C, Landoni G, Cassar L, De Simone F, Zangrillo A, Tardelli MA. Use of volatile anesthetics during cardiopulmonary bypass: A systematic review of adverse events. J Cardiothorac Vasc Anesth 2014;28(1):84–89.
26. Julier K, Da Silva R, Garcia C, Bestmann L, Frascarolo P, Zollinger A, et al. Preconditioning by sevoflurane decreases biochemical markers for myocardial and renal dysfunction in coronary artery bypass graft surgery: A double-blinded, placebo-controlled, multicenter study. Anesthesiology 2003;98(6):1315–1327.
27. Cain BS, Meldrum DR, Cleveland JC Jr, Meng X, Banerjee A, Harken AH. Clinical L-type Ca(2+) channel blockade prevents ischemic preconditioning of human myocardium. J Mol Cell Cardiol 1999;31(12):2191-2197.
28. Maulik N, Engelman RM, Rousou JA, Flack JE, Deaton D, Das DK. Ischemic preconditioning reduces apoptosis by upregulating anti-death gene Bcl-2. Circulation 1999;100(19):369-375.
29. Skinner MK, Manikkam M, Guerrero-Bosagna C. Epigenetic transgenerational actions of environmental factors in disease etiology. Trends Endocrinol Metab 2010;21(4):214-222.
30. Gomez A, Ingelman-Sundberg M. Pharmacoepigenetics: Its Role in Interindividual Differences in Drug Response. Clin Pharmacol Ther 2009;85(4):426-430.
31. Lukong KE, Chang KW, Khandjian EW, Richard S. RNA-binding proteins in human genetic disease. Trends Genet 2008;24(8):416-425.
32. Moore MJ. From birth to death: The complex lives of eukaryotic mRNAs. Science 2005;309(5740):1514-1518.
33. Wilkie GS, Dickson KS, Gray NK. Regulation of mRNA translation by 5′- and 3′-UTR-binding factors. Trends Biochem Sci 2003;28(4):182-188.

34. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell 2004 23;116(2):281-297.
35. Bushati N, Cohen SM. microRNA functions. Annu Rev Cell Dev Biol 2007;23:175-205.
36. Visone R, Croce CM. MiRNAs and cancer. Am J Pathol 2009;174(4):1131-1138.
37. Mazière P, Enright AJ. Prediction of microRNA targets. Drug Discov Today. 2007;12(11-12):452-458.
38. Li Y, Zeng Q-G, Qiu J-L, Pang T, Wang H, Zhang X-X. Sevoflurane inhibits the progression of PTC by downregulating miR-155. Eur Rev Med Pharmacol Sci 2019;23(15):6579-6587.
39. Feldman A, Moreira DAR, Gun C, Wang HTL, Hirata MH, Germano JF *et al*. Analysis of circulating miR-1, miR-23a, and miR-26a in atrial fibrillation patients undergoing coronary bypass artery grafting surgery. Ann Hum Genet 2017;81(3):99-105.
40. Sun Y, Li Y, Liu L, Wang Y, Xia Y, Zhang L *et al*. Identification of miRNAs Involved in the Protective Effect of Sevoflurane Preconditioning Against Hypoxic Injury in PC12 Cells. Cell Mol Neurobiol 2015;35(8):1117-1125.
41. Ma F, Xu S, Liu X, Zhang Q, Xu X, Liu M *et al*. The microRNA miR-29 controls innate and adaptive immune responses to intracellular bacterial infection by targeting interferon-γ. Nat Immunol 2011;12(9):861-869.
42. Ma F, Liu X, Li D, Wang P, Li N, Lu L *et al*. MicroRNA-466l upregulates IL-10 expression in TLR-triggered macrophages by antagonizing RNA-binding protein tristetraprolin-mediated IL-10 mRNA degradation. J Immunol 2010;184(11):6053-6059.
43. Madrigal-Matute J, Rotllan N, Aranda JF, Fernández-Hernando C. MicroRNAs and atherosclerosis. Curr Atheroscler Rep 2013;15(5):322.
44. Sell H, Dietze-Schroeder D, Eckardt K, Eckel J. Cytokine secretion by human adipocytes is differentially regulated by adiponectin, AICAR, and troglitazone. Biochem Biophys Res Commun 2006;343(3):700-706.
45. Xie H, Sun L, Lodish HF. Targeting microRNAs in obesity. Expert Opin Ther Targets 2009;13(10):1227-1238.
46. Thompson JW, Dave KR, Young JI, Perez-Pinzon MA. Ischemic Preconditioning Alters the Epigenetic Profile of the Brain from Ischemic Intolerance to Ischemic Tolerance. Neurotherapeutics. 2013;10(4):789–797.

47. Costa JF, Fontes-Carvalho R, Leite-Moreira AF. Myocardial remote ischemic preconditioning: from pathophysiology to clinical application. Rev Port Cardiol 2013;32(11):893-904.
48. Pagel PS, Farber NE. Inhaled Anesthetics : Cardiovascular Pharmacology. In: Miller`s Anesthesia. Eighth Ed. Elsevier *Inc*. 2015, pp. 614-637.
49. Pasqualin RC, Mostarda CT, Souza LE, Vane MF, Sirvente R, Otsuki DA *et al*. Sevoflurane preconditioning during myocardial ischemia-reperfusion reduces infarct size and preserves autonomic control of circulation in rats. Acta Cir Bras 2016;31(5):338-345.
50. Zhao J, Wang F, Zhang Y, Jiao L, Lau WB, Wang L *et al*. Sevoflurane preconditioning attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury via caveolin-3-dependent cyclooxygenase-2 inhibition. Circulation 2013;128(11):121-129.
51. Qiao S, Olson JM, Paterson M, Yan Y, Zaja I, Liu Y *et al*. MicroRNA-21 Mediates Isoflurane-induced Cardioprotection against Ischemia-Reperfusion Injury via Akt/Nitric Oxide Synthase/Mitochondrial Permeability Transition Pore Pathway. Anesthesiology 2015;123(4):786-798.
52. Lu Y, Wang J, Yan J, Yang Y, Sun Y, Huang Y *et al*. Sevoflurane attenuate hypoxia-induced VEGF level in tongue squamous cell carcinoma cell by upregulating the DNA methylation states of the promoter region. Biomed Pharmacother 2015;71:139-145.
53. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. Nature Protocols. 2008;3(6):1101–1108.
54. Hofland J, Ouattara A, Fellahi JL, Gruenewald M, Hazebroucq J, Ecoffey C *et al*. Xenon-CABG Study Group. Effect of xenon anesthesia compared to sevoflurane and total intravenous anesthesia for coronary artery bypass graft surgery on postoperative cardiac troponin release: an international, multicenter, phase 3, single-blinded, randomized noninferiority trial. Anesthesiology 2017;127(6):918-933.
55. Lemoine S, Zhu L, Gérard JL, Hanouz JL. Sevoflurane-induced cardioprotection in coronary artery bypass graft surgery: Randomised trial with clinical and ex-vivo endpoints. Anaesth Crit Care Pain Med 2018;37(3):217-223.
56. Weidmann L, Obeid S, Mach F, Shahin M, Yousif N, Denegri A, et al. Pre-existing treatment with aspirin or statins influences clinical presentation, infarct

size and inflammation in patients with de novo acute coronary syndromes. Int J Cardiol 2019;275:171–178.

57. Ozguler IM, Burma O, Uysal A, Akbulut H. Rosuvastatin Lowers Systemic Inflammatory Response in Coronary Artery Bypass Graft Accompanied by Cardiopulmonary Bypass Surgery: A Randomized Controlled Study. Clin Invest Med 2015;38(4):154-163.
58. Landoni G, Guarracino F, Cariello C, Franco A, Baldassarri R, Borghi G *et al*. Volatile compared with total intravenous anaesthesia in patients undergoing high-risk cardiac surgery: a randomized multicentre study. Br J Anaesth 2014;113(6):955-963.
59. Yu CH, Beattie WS. The effects of volatile anesthetics on cardiac ischemic complications and mortality in CABG: a meta-analysis. Can J Anaesth 2006;53(9):906-918.
60. Landoni G, Lomivorotov VV, Nigro Neto C, Monaco F, Pasyuga VV, Bradic N *et al*. MYRIAD Study Group. Volatile Anesthetics versus Total Intravenous Anesthesia for Cardiac Surgery. N Engl J Med 2019;380(13):1214-1225.
61. Nader ND, Li CM, Khadra WZ, Reedy R, Panos AL. Anesthetic myocardial protection with sevoflurane. J Cardiothorac Vasc Anesth 2004;18(3):269-274.
62. Postl LK, Bogner V, Griensven MV, Beirer M, Kanz KG, Egginger C *et al*. Polymorphonuclear (PMN) elastase in patients after severe traumatic brain injury. Eur J Med Res 2018; 23:44.
63. Yoshimura Y, Hiramatsu Y, Sato Y, Homma S, Enomoto Y, Jikuya T *et al*. ONO-6818, a novel, potent neutrophil elastase inhibitor, reduces inflammatory mediators during simulated extracorporeal circulation. Ann Thorac Surg 2003;76:1234–1239.
64. Matsuzaki K, Hiramatsu Y, Homma S, Sato S, Shigeta O, Sakakibara Y. Sivelestat reduces inflammatory mediators and preserves neutrophil deformability during simulated extracorporeal circulation. Ann Thorac Surg 2005;80:611–617.
65. Novalija EFS, Kampine JP, Stowe DF. Sevoflurane mimics ischemic preconditioning effects on coronary flow and nitric oxide release in isolated hearts. Anesthesiology 1999;91:701–712.

66. Toller WG, Kersten JR, Pagel PS, Hettrick DA, Warltier DC. Sevoflurane reduces myocardial infarct size and decreases the time threshold for ischemic preconditioning in dogs. Anesthesiology 1999;91:1437–1446.
67. Kowalski C, Zahler S, Becker BF, Flaucher A, Conzen PF, Gerlach E *et al*. Halothane, isoflurane, and sevoflurane reduce postischemic adhesion of neutrophils in the coronary system. Anesthesiology 1997;86:188–195.
68. Tait AR, Davidson BA, Johnson KJ, Remick DG, Knight PR. Halothane inhibits the intraalveolar recruitment of neutrophils, lymphocytes, and macrophages in response to influenza virus infection in mice. Anesth Analg 1993;76:1106–1113.
69. Barth J, Petermann W, Entzian P, Wustrow C, Wustrow J, Ohnhaus EE. Modulation of oxygen-free radicals from human leukocytes during halothane- and enflurane-induced general anesthesia. Acta Anaesthesiol Scand 1987; 31:740–743.
70. de la Gala F, Pi~neiro P, Vara E, Olmedilla L, Cruz P, Garutti I. Postoperative pulmonary complications, pulmonaryand systemic inflammatory responses after lungresection surgery with prolonged one-lung ventilation. Randomized controlled trial comparing intravenous and inhalational anaesthesia. Br J Anaesth 2017;119: 655–663.
71. Mitsuhata H, Shimizu R, Yokoyama MM. Suppressive effects of volatile anesthetics on cytokine release in human peripheral blood mononuclear cells. Int J Immunopharmacol 1995;17:529–534.
72. Fung M, Loubser PG, Ündar A, Mueller M, Sun C, Sun WN *et al*. Inhibition of complement, neutrophil, and platelet activation by an anti-factor D monoclonal antibody in simulated cardiopulmonary bypass circuits. J Thorac Cardiovasc Surg 2001;122:113–122.
73. Finn A, Morgan BP, Rebuck N, Klein N, Rogers CA, Hibbs M *et al*. Effects of inhibition of complement activation using recombinant soluble complement receptor 1 on neutrophil CD11b/CD18 and L-selectin expression and release of interleukin-8 and elastase in simulated cardiopulmonary bypass. J Thorac Cardiovasc Surg 1996;111:451–459.

74. Lahtinen M, Borowiec J, Venge P, Henze P, Stiernström H. Nitric Oxide increases leukocyte granule release during simulated extracorporeal circulation. Thorac Cardiovasc Surg 2000;48:151–156.
75. Dinarello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. Blood 2011;117(14):3720-3732.
76. Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A. The interleukin-1 family: back to the future. Immunity 2013;39(6):1003-1018.
77. Hutchison ER, Kawamoto EM, Taub DD, Lal A, Abdelmohsen K, Zhang Y *et al*. Evidence for miR-181 involvement in neuroinflammatory responses of astrocytes. Glia 2013;61(7):1018-1028.
78. Marques-Rocha JL, Samblas M, Milagro FI, Bressan J, Martínez JA, Marti A. Noncoding RNAs, cytokines, and inflammation-related diseases. FASEB J 2015;29(9):3595-3611.
79. Chafin CB, Regna NL, Dai R, Caudell DL, Reilly CM. MicroRNA-let-7a expression is increased in the mesangial cells of NZB/W mice and increases IL-6 production in vitro. Autoimmunity 2013;46(6):351-362.
80. de Oliveira CMB, Sakata RK, Issy AM, Gerola LR, Salomão R. Cytokines and Pain. Rev Bras Anestesiol 2011;61(2):255-265.
81. Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. Cell-cycle control of microRNA-mediated translation regulation. Cell Cycle 2008;7(11):1545-1549.
82. Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. Science 2007;318(5858):1931-1934.

[1] De acordo com Estilo Vancouver