

FELIPE DA SILVA PAULITSCH

Alterações hemostáticas e clínicas em cirurgias de revascularização miocárdica com e sem circulação extracorpórea: estudo prospectivo randomizado

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

Área de concentração: Cardiologia

Orientadora: Dra. Neuza Helena Moreira Lopes

São Paulo

2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Paulitsch, Felipe da Silva

Alterações hemostáticas e clínicas em cirurgias de revascularização miocárdica com e sem circulação extracorpórea : estudo prospectivo randomizado / Felipe da Silva Paulitsch. -- São Paulo, 2009.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Departamento de Cardio-Pneumologia.

Área de concentração: Cardiologia.

Orientadora: Neuza Helena Moreira Lopes.

Descritores: 1. Ponte de artéria coronária 2.Inflamação 3.Ponte de artéria coronária sem circulação extracorpórea 4.Trombose/cirurgia 5.Revascularização miocárdica 6.Circulação extracorpórea

USP/FM/SBD-108/09

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Dra. Neuza Helena Moreira Lopes, minha orientadora, pela oportunidade e por acreditar em meu trabalho. Qualquer elogio a você será pouco para descrever a pessoa maravilhosa que você é.

Ao Prof. Whady Hueb, por me permitir trabalhar em seu grupo de pesquisa, pelo apoio e por seus ensinamentos ao longo desse período.

À equipe do MASS, com a qual convivi anos muito bons da minha vida: Giovana, Marcela, Laura, Eliana, Myrthes, Célia, Teryo, Priscyla, Cibele, Rosa, Jorge e Bethy.

Ao Prof. Alberto Levy, meu orientador de iniciação científica durante a graduação, que despertou em mim a vocação da pesquisa e sempre me estimulou a dar continuidade aos meus estudos de pós-graduação; e também pelo seu carinho e amizade.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro do projeto.

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

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

Regras do Acordo Ortográfico da Língua Portuguesa de janeiro de 2009.

SUMÁRIO

Lista de abreviações

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de gráficos

Resumo

Summary

1	Introdução.....	1
1.1	Atividade hemostática	4
1.1.1	Marcadores de hemostasia	7
1.1.1.1	Dímeros-D	7
1.1.1.2	PAI-1	8
1.1.2	Marcadores de inflamação	9
1.1.2.1	PCR	9
1.1.3	Marcadores de inflamação e hemostasia	10
1.1.3.1	Fibrinogênio	10
1.2	Estudos clínicos em doença coronária crônica.....	11
2	Objetivos.....	13
3	Metodologia	15
3.1	Comitê de ética em pesquisa	16
3.2	Projeto <i>Medicine, Angioplasty, or Surgical Study</i> – MASS III	16
3.2.1	CrITÉrios de inclusão	17
3.2.2	CrITÉrios de não-inclusão	18
3.2.3	Procedimento anestésico e cirúrgico	20
3.2.3.1	Geral	20
3.2.3.2	Cirurgia com circuito extracorpóreo	21
3.2.3.3	Cirurgia sem circuito extracorpóreo	21
3.3	Estudo da atividade hemostática e inflamatória	22
3.3.1	Definições.....	22
3.3.2	Bioquímica.....	24

3.3.3	Marcadores inflamatórios e de hemostasia dosados.....	25
3.3.3.1	Fibrinogênio	26
3.3.3.2	Proteína C reativa	28
3.3.3.3	Dímeros-D	28
3.3.3.4	Inibidor da ativação do plasminogênio tipo 1	29
3.3.4	Análise estatística.....	30
4	Resultados.....	35
4.1.	Dados basais dos pacientes estudados	36
4.2.	Dados do intra e pós-operatório	38
4.3	Análise do hematócrito, hemoglobina, leucócitos, plaquetas, coagulação e marcadores de hemostasia em cada grupo	41
4.4 .	Evolução clínica no pós-operatório imediato e em 1 ano	54
4.5 .	Correlação entre marcadores de fibrinólise e sangramento	54
5	Discussão	62
6	Conclusões.....	68
7	Anexo	70
7.1.	Técnica de Elisa	71
8	Referências	73

LISTA DE ABREVIATURAS

AVC	= acidente vascular cerebral
CEC	= circulação extracorpórea
CHAd	= concentrado de hemácias do adulto
CK-MB	= creatinofosfoquinase fração MB
DAC	= doença arterial coronariana
DD	= dímero d
FIB	= fibrinogênio
FT	= fator tissular
IAM	= infarto agudo do miocárdio
MASS	= <i>Medicine, Angioplasty, or Surgery Study</i>
PAI1	= inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1
PBST	= Solução de lavagem tampão (<i>Phosphate Buffered Saline Tween</i>)
PCR	= proteína C reativa
RM	= revascularização miocárdica
TP	= tempo de pró-trombina
tPA	= ativador do plasminogênio tecidual
TTPa	= tempo de tromboplastina ativada
TVP	= trombose venosa profunda
u-PA	= ativador do plasminogênio tipo uriquinase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Cascata de coagulação e seus mecanismos de regulação.....	5
Figura 2 -	Fisiologia da fibrinólise endógena e liberação de dímeros-D. PAI-1, inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1; tPA, ativador do plasminogênio tecidual.	6
Figura 3 -	Plano de trabalho com os momentos em que foram coletados os marcadores bioquímicos e quantificados os sangramentos. As bioquímicas da rotina foram coletadas no momento pré e 24h após a cirurgia.	35
Figura 4 -	Etapas do processo de incubação da técnica de ELISA Sanduíche.	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Características basais dos pacientes.	36
Tabela 2 -	Características dos valores bioquímicos basais dos pacientes.	37
Tabela 3 -	Características dos pacientes cirúrgicos.	38
Tabela 4 -	Eventos ocorridos no pós-operatório até alta hospitalar.....	40
Tabela 5 -	Eventos após 1 ano de seguimento.	40
Tabela 6 -	Valores de marcadores de inflamação e hemostasia dosados no estudo, em diferentes tempos nos grupos com e sem CEC.	42
Tabela 7 -	Todos os pacientes. Correlação entre sangramento per-operatório, 6 e 48h após a cirurgia cardíaca e marcadores inflamatórios e de fibrinólise em todos os pacientes da amostra (n = 92).	55
Tabela 8 -	Grupo COM CEC. Correlação entre sangramento per-operatório, 6 e 48h após procedimento e marcadores inflamatórios e de fibrinólise em pacientes do grupo submetido a cirurgia com circuito extracorpóreo (n = 41).	57
Tabela 9 -	Grupo SEM CEC. Correlação entre sangramento perioperatório, 6 e 48h após procedimento e marcadores inflamatórios e de fibrinólise em pacientes do grupo submetido a cirurgia sem circuito extracorpóreo (n = 51).	58

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Valores de proteína C reativa (média±erro padrão) nos grupos com e sem CEC, nos momentos pré-operatório (pré), após a cirurgia (pós) e 24 horas após o procedimento (24h). CEC, circulação extracorpórea; PCR, proteína C reativa.43
- Gráfico 2 - Valores de fibrinogênio (média±erro padrão) nos grupos com e sem CEC, nos momentos pré-operatório (pré), após a cirurgia (pós) e 24 horas após o procedimento (24h). CEC, circulação extracorpórea.44
- Gráfico 3 - Valores de dímero-D (média±erro padrão) nos grupos com e sem CEC, nos momentos pré-operatório (pré), após a cirurgia (pós) e 24 horas após o procedimento (24h). CEC, circulação extracorpórea.45
- Gráfico 4 - Valores do Inibidor do Ativador de Plasminogênio-1 (média±erro padrão) nos grupos com e sem CEC, nos momentos pré-operatório (pré), após a cirurgia (pós) e 24 horas após o procedimento (24h). CEC, circulação extracorpórea; PAI-1, Inibidor do Ativador de Plasminogênio-1.46
- Gráfico 5 - Valores da relação do tempo de pró-trombina (média±erro padrão) nos grupos com e sem CEC, nos momentos pré-operatório (pré) e após a cirurgia (pós). CEC, circulação extracorpórea; TP, tempo de pró-trombina.47
- Gráfico 6 - Valores da relação do tempo de tromboplastina ativada (média±erro padrão) nos grupos com e sem CEC, nos momentos pré-operatório (pré) e após a cirurgia (pós). CEC, circulação extracorpórea; TTPa, tempo de tromboplastina ativada.48
- Gráfico 7 - Valores da hemoglobina (média±erro padrão) nos grupos com e sem CEC, nos momentos pré-operatório (pré), após a cirurgia (pós) e 24h após o procedimento (24h). CEC, circulação extracorpórea; Hb, hemoglobina.49

Gráfico 8 -	Valores do hematócrito (média±erro padrão) nos grupos com e sem CEC, nos momentos pré-operatório (pré), após a cirurgia (pós) e 24h após o procedimento (24h). CEC, circulação extracorpórea; Ht, hematócrito.	50
Gráfico 9 -	Valores das plaquetas (média±erro padrão) nos grupos com e sem CEC, nos momentos pré-operatório (pré), após a cirurgia (pós) e 24h após o procedimento (24h). CEC, circulação extracorpórea; *análise Post Hoc com o teste de Tukey honest significant difference (HSD) para comparações múltiplas.	51
Gráfico 10 -	Valores dos leucócitos (média±erro padrão) nos grupos com e sem CEC, nos momentos pré-operatório (pré), após a cirurgia (pós) e 24h após o procedimento (24h). CEC, circulação extracorpórea; Leuc, leucócitos.	52
Gráfico 11 -	Valores do sangramento (média±erro padrão) nos grupos com e sem CEC, nos momentos per-operatório (per-op), 6h após a cirurgia (6h) e 48h após o procedimento (48 horas). CEC, circulação extracorpórea; *análise Post Hoc com o teste de LSD para comparações múltiplas.	53
Gráfico 12 -	Curva ROC do fibrinogênio sérico dosado 24h após cirurgia em pacientes do grupo com circulação extracorpórea (CEC) em pacientes com sangramento superior a 1.000 ml após 48h do procedimento	60

RESUMO

Paulitsch FS. Alterações hemostáticas e clínicas em cirurgias de revascularização miocárdica com e sem circulação extracorpórea: estudo prospectivo randomizado [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2009. 89 p.

Introdução: a revascularização miocárdica (RM) sem circulação extracorpórea (CEC) tem sido associada a menores complicações quando comparadas à com CEC. **Objetivos:** determinar os efeitos da CEC em marcadores de hemostasia, fibrinólise, inflamação e correlacionar com eventos clínicos. **Método:** os pacientes foram incluídos de forma prospectiva e randomizada para cirurgia de RM com (n=41) ou sem CEC (n=51). As concentrações de proteína C reativa (PCR), fibrinogênio, dímero-D e inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI1) foram quantificadas antes e após (1 e 24 horas) a RM. As técnicas cirúrgicas e anestésicas foram padronizadas para ambos os grupos. Eventos clínicos foram avaliados durante a hospitalização inicial e após 1 ano de seguimento. **Resultados:** as concentrações de PAI1 e dímeros-d foram maiores quando comparados os valores pré-operatórios com os de 1 e 24 h, após a RM em ambos os grupos, porém as concentrações de PAI1 aumentadas estenderam-se por 24 h após a RM com CEC ($p < 0,01$). A concentração de PCR teve um aumento de pequena magnitude imediatamente após a cirurgia em ambos os grupos e aumentou de modo similar 24h após a RM ($p < 0,01$). A RM com CEC foi associada com maior perda sanguínea durante a cirurgia e mais sangramento pós-operatório ($p < 0,01$). A incidência de todas as outras complicações foi similar nos dois grupos. **Conclusão:** a RM com CEC apresentou evidências bioquímicas de um estado pró-trombótico precoce após a cirurgia, porém, sem evidências no aumento no número de eventos trombóticos. O estado pró-trombótico pode ser consequência do circuito extracorpóreo, resposta compensatória ao sangramento, ou a ambos em pacientes submetidos à cirurgia com CEC.

Descritores: 1. Ponte de artéria coronária 2. Inflamação 3. Ponte de artéria coronária sem circulação extracorpórea 4. Trombose/cirurgia 5. Revascularização miocárdica 6. Circulação extracorpórea

SUMMARY

Paulitsch FS. Hemostatic changes and clinical sequelae after on-pump compared with off-pump coronary artery bypass surgery: a prospective randomized study. [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo", 2009. 89 p.

Objective: To delineate the effects of extracorporeal bypass on biomarkers of hemostasis, fibrinolysis, and inflammation and clinical sequelae. **Methods:** Patients were assigned prospectively and randomly to either on-pump (n=41) or off-pump (n=51) coronary bypass surgery. The concentrations of C-reactive protein (CRP), fibrinogen, D-dimer, and plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) in blood were quantified before and after (1 hour and 24 hours) surgery. Similar surgical and anesthetic procedures were used for both groups. Clinical events were assessed during initial hospitalization and at the end of 1 year. **Results:** The concentrations of PAI-1 and d-dimer were greater compared with preoperative values 1 hour and 24 hours after surgery in both groups, but their concentrations increased to a greater extent 24 hours after surgery in the on-pump group ($p < 0.01$). The concentration of CRP did not change appreciably immediately after surgery in either group but increased in a parallel fashion 24 hours after either on-pump or off-pump surgery ($p < 0.01$). Bypass surgery in the on-pump group was associated with greater blood loss during surgery and more bleeding after surgery ($p \leq 0.01$). The incidence of all other complications was similar in the 2 groups. **Conclusion:** On-pump surgery was associated with biochemical evidence of a pro-thrombotic state early after surgery but no greater incidence of thrombotic events. The pro-thrombotic state may have been a consequence of extracorporeal bypass, compensation in response to more bleeding, or both in patients undergoing on-pump surgery.

Descriptors: 1. Coronary artery bypass graft 2. Inflammation 3. Off-pump CABG 4. Thrombosis/surgery 5. Cardiac surgery 6. Extracorporeal circulation

1 INTRODUÇÃO

O uso de técnicas menos invasivas para a abordagem cirúrgica do coração nem se difundido nos últimos anos pelos diversos serviços no Brasil¹⁻³ e no Mundo⁴⁻⁶. Para diminuir os efeitos adversos do circuito extracorpóreo (CEC), diferentes vias de acesso e de aparelhos têm sido utilizadas para se realizar as cirurgias cardíacas sem o auxílio desse dispositivo⁷⁻¹⁰. A esternotomia mediana sem o uso da CEC^{1,11,12} e a cirurgia coronariana minimamente invasiva (acesso mínimo)⁸⁻¹⁰ são exemplos de técnicas preconizadas para realização de cirurgias cardíacas de revascularização miocárdica (RM), em que existiriam vantagens ao se utilizar como alternativa a técnica com o uso da CEC^{1,12,13}. A principal vantagem da RM sem CEC, como o próprio nome informa, é evitar o uso da CEC, levando a menos complicações pós-operatórias, recuperação mais rápida e retorno às atividades habituais em tempo menor¹⁴.

Acredita-se que, após uma cirurgia sem o uso do circuito extracorpóreo, a hemostasia esteja preservada e o sangramento pós-operatório é significativamente reduzido, comparado com procedimentos que utilizam esse tipo de circuito¹⁵⁻¹⁷, podendo levar a menor necessidade do uso de hemoderivados e antifibrinolíticos. No entanto, essa hemostasia preservada pode resultar em atividade pró-coagulante após cirurgias sem CEC¹⁸. Este estado pró-coagulante é descrito em cirurgias de grande

porte¹⁹⁻²¹ e, também, pode ser esperado após cirurgias cardíacas como a revascularização miocárdica, acarretando um risco aumentado de trombozes. Além disso, na cirurgia sem CEC, existe maior dificuldade técnica em relação à cirurgia que utiliza a parada cardioplégica do coração, o que pode levar a uma revascularização incompleta com maior frequência.²²⁻²⁴

Alguns marcadores vêm se mostrando úteis para estudar a atividade pró-coagulante e comparar a fisiologia da hemostasia entre cirurgias com e sem CEC. Por isso, o conhecimento do papel de cada um deles durante o processo hemostático fisiológico é fundamental para a compreensão de seu comportamento durante essas cirurgias. No entanto, não se pode deixar de pensar que, apesar dos avanços nas técnicas de perfusão, anestesia e cirúrgica e mesmo quando se comparam dois procedimentos de grande porte, a atividade inflamatória desencadeada²⁵ pode levar a reações importantes e desencadear maior sangramento²⁶, retenção de fluidos e disfunção orgânica temporária²⁷⁻²⁹. Desse modo, estudar atividade hemostática sem dosar fatores inflamatórios pode levar a conclusões equivocadas.

1.1 ATIVIDADE HEMOSTÁTICA

Resumidamente³⁰, o evento que desencadeia a coagulação do sangue é a lesão da parede do vaso e a apresentação do fator tissular (FT). A ligação do fator tissular com outros fatores forma complexos que irão desencadear a cascata de coagulação, tanto na vias intrínsecas como nas extrínsecas. Isso forma o fator Xa (transformação do fator X em sua forma ativada) que, por sua vez, irá atuar na protrombina, transformando-a em trombina. Por sua vez, a trombina, é regulada pela antitrombina III e trombomodulina, que inibem sua atividade proteolítica. A antitrombina III inibe tanto diretamente a trombina como de forma indireta, por meio da inibição dos fatores XI, IX e X. Enquanto a trombomodulina regula, ativando os sistemas C e S que inibem os fatores V e VIII, sem ação direta sobre a trombina. Quando presente na circulação, a trombina converte o fibrinogênio em monômeros de fibrina, que se agregam espontaneamente, formando protofibrilas. Além disso, a trombina ativa o fator XIII (XIIIa), agregando as fibrilas em vários sentidos para solidificar o coágulo (Figura 1)³⁰.

Regulação da Cascata de Coagulação

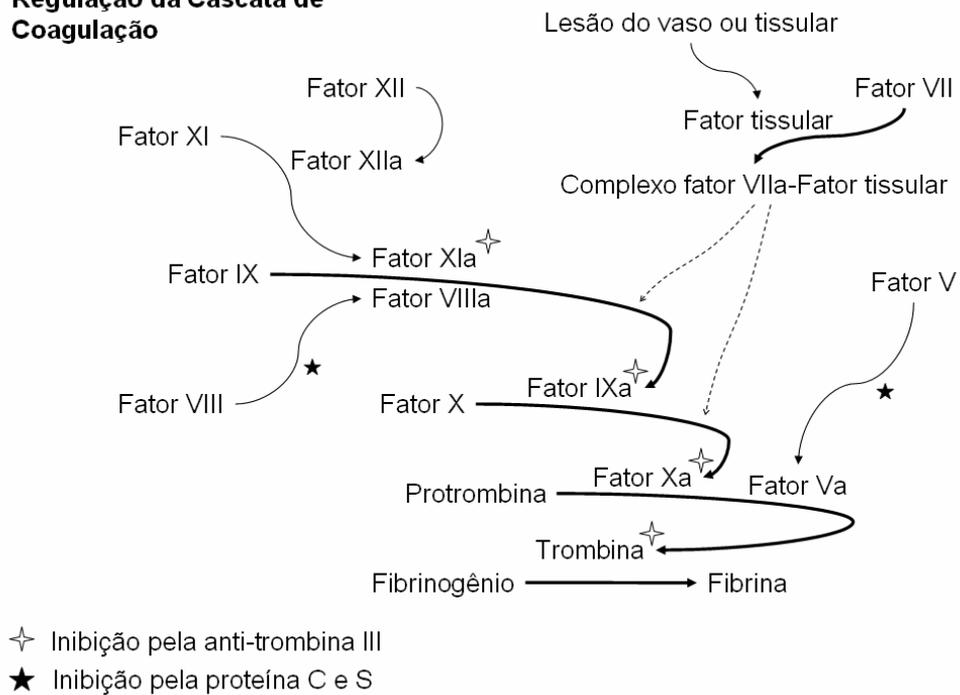


Figura 1 - Cascata de coagulação e seus mecanismos de regulação

O plasminogênio circulante liga-se ao coágulo de fibrina e é convertido em plasmina pelo ativador do plasminogênio tissular (t-PA). Desse modo, a plasmina é liberada na circulação e liga-se à fibrina dissolvendo-a. Isso resulta em lise do coágulo e liberação de produtos da degradação da rede de fibrina, contendo dímeros-D (Figura 2). Associadas às plaquetas, as mesmas células endoteliais ativadas que liberam t-PA liberam, também, o inibidor do plasminogênio tecidual tipo 1 (PAI-1). Desse modo, o t-PA estimula a liberação de seu inibidor, o PAI-1, fazendo um controle hemostático e permitindo uma regulação da ativação da plasmina, inibindo sua ativação excessiva e potencialmente deletéria. Além disso, o

fator XIIIa promove a ligação da alfa-2-antiplasmina ao coágulo de fibrina. Assim esses dois inibidores (PAI-1 e alfa-2-antiplasmina) atuam no controle da fibrinólise³⁰. Portanto, o PAI-1, os dímeros-D e o fibrinogênio são proteínas que participam diretamente do processo de fibrinólise e que refletem mecanismos envolvidos durante a ativação da hemostasia (Figura 2).

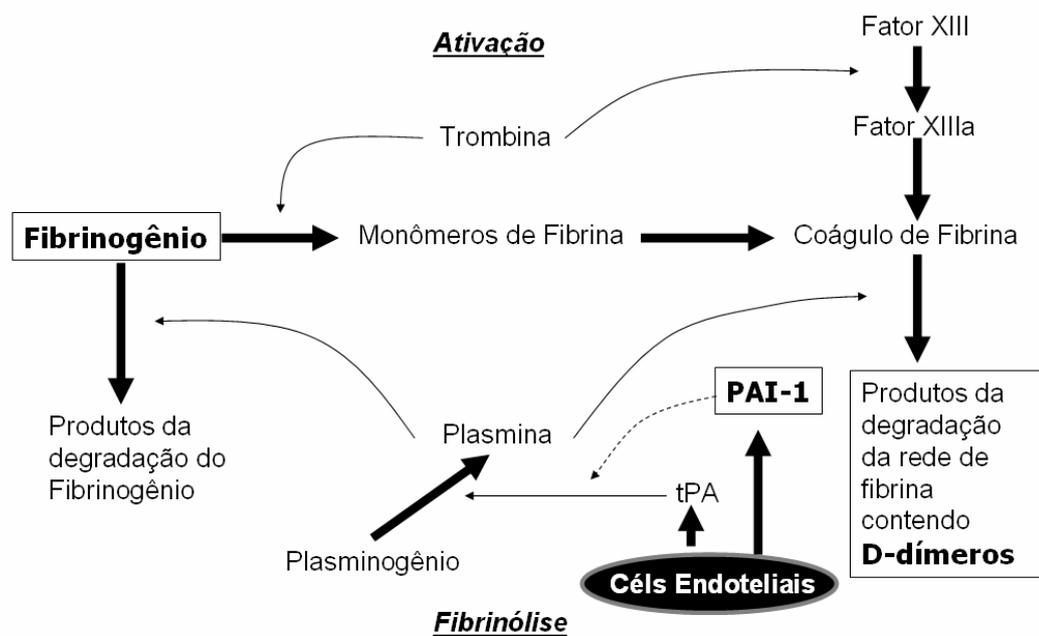


Figura 2 - Fisiologia da fibrinólise endógena e liberação de dímeros-D. PAI-1, inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1; tPA, ativador do plasminogênio tecidual

Outra via que deve ser citada no mecanismo de ativação da fibrinólise é por intermédio do fator XII, pré-caliceína e cininogênio de alto peso

molecular (CAPM). O sangue em contato com a superfície do circuito extracorpóreo sofreria uma ativação dessa via de contato, ativando a via intrínseca da cascata de coagulação e posterior fibrinólise³⁰.

1.1.1 Marcadores de hemostasia

1.1.1.1 Dímeros-D

Detalhando o mecanismo de formação dos dímeros-D durante a formação do coágulo, a trombina é ativada, clivando os fibrinopeptídeos do fibrinogênio e formando os monômeros de fibrina. Posteriormente, ocorre uma polimerização com a formação de uma rede de fibrina. Esta rede é inicialmente, solúvel, sendo estabilizada com ligações covalentes por meio do fator XIIIa, produzindo, desse modo, um coágulo de fibrina insolúvel no plasma. A rede de fibrina estabilizada será, posteriormente, degradada pela atividade de uma enzima fibrinolítica, a plasmina, cujo processo é denominado fibrinólise³¹. Em condições fisiológicas normais, a plasmina é neutralizada pela alfa-2-antiplasmina na região do coágulo. Uma variedade de produtos de degradação da fibrina é formada, dependendo da extensão da fibrinólise. O menor fragmento é uma espécie de plasmina resistente, os dímeros-D³⁰. Conseqüentemente, a detecção de dímeros-D indica a seqüência de eventos: ativação da trombina, formação de coágulo e subsequente lise^{30,32}.

O aumento dos dímeros-D indica atividade fibrinolítica e é visto em inúmeros estados trombóticos arteriais e venosos³³, incluindo trombozes venosas profundas³⁴ (TVP) e/ou embolia pulmonar³⁵, infarto agudo de miocárdio³⁶, coagulação intravascular disseminada³⁷ e fibrinólise primária³⁸, doenças hepáticas³⁸, sepsis grave³⁸, cirurgias³⁹ e pré-eclâmpsia⁴⁰. A elevação expressiva ou persistente deles no pós-operatório pode preceder episódio tromboembólico³⁸. Seus valores têm sido utilizados também para monitorar o curso e a resposta à terapia trombolítica³⁸.

1.1.1.2 PAI-1

O inibidor da ativação do plasminogênio tipo 1 (PAI-1) inibe a ativação do plasminogênio plasmático rapidamente, inativando tanto a forma tecidual (t-PA) como a forma uroquinase (u-PA). O PAI-1 é uma cadeia simples glicoprotéica com peso molecular de 47 kD⁴¹. Durante a fibrinólise, o t-PA converte a forma protéica do plasminogênio inativa em plasmina, que exerce atividade proteolítica localizada fazendo a degradação da fibrina. Isso estimula a liberação do PAI-1, que é um regulador fisiológico da ação da plasmina⁴².

O PAI-1 é sintetizado no fígado e pelas células endoteliais, sua síntese é regulada por diversos mediadores fisiológicos, incluindo endotoxinas, interleucina-1, fator de crescimento de fibroblasto tipo 2 e lipídeos⁴¹. O PAI-1 é um importante inibidor do sistema fibrinolítico. Assim,

níveis elevados podem suprimir a fibrinólise e resultar em risco aumentado para trombose. A elevação plasmática de PAI-1 tem sido demonstrada como um fator pró-trombótico em distúrbios tromboembólicos arteriais e venosos⁴³. Além disso, níveis altos de PAI-1 são relacionados à maior incidência de síndromes coronarianas agudas⁴³. Verificou-se também que pacientes com doença arterial coronária crônica e que apresentaram re-estenose após angioplastia mostraram níveis maiores de PAI-1⁴³.

1.1.2 Marcadores de Inflamação

1.1.2.1 PCR

A Proteína C Reativa (PCR) é uma proteína da fase aguda produzida exclusivamente no fígado, foi identificada, em 1930, no plasma de pacientes com quadro de pneumonia e foi denominada por sua capacidade de se ligar ao polissacarídeo C do pneumococo^{44,45}. A PCR pertence à família das alfa-globulinas composta de cinco subunidades idênticas resultando em um peso molecular de 110-140 kD⁴⁴.

Os papéis fisiológicos da PCR são numerosos, sendo a mais importante a função de participação no sistema de defesa⁴⁴. A PCR é sintetizada rapidamente pelos hepatócitos em resposta a citocina, e liberada na circulação por leucócitos ativados. Os níveis séricos e plasmáticos de PCR têm se mostrado elevados durante a resposta inflamatória em uma

larga variedade de doenças incluindo infecções bacterianas⁴⁶, fase aguda de artrite reumatóide⁴⁵, inflamação das vias biliares⁴⁶. Uma PCR elevada também pode ser encontrada na Síndrome de Guillain-Barret, esclerose múltipla, infecções virais, tuberculose, hepatite infecciosa aguda, doenças necróticas, pacientes vítimas de queimaduras e após trauma cirúrgico⁴⁶⁻⁴⁸.

A PCR tem se mostrado um bom marcador de processos inflamatórios. Em média, aumenta no soro ou no plasma após 24h do dano tissular agudo, tendo seu valor máximo no pico do processo agudo e diminuindo gradativamente com a resolução da inflamação ou trauma^{49,50}. Além de ser um marcador de doenças inflamatórias, a PCR parece ter valor como marcador cardíaco na avaliação do risco cardiovascular e de doenças vasculares periféricas⁵¹⁻⁵⁸.

1.1.3 Marcadores de Inflamação e Hemostasia

1.1.3.1 Fibrinogênio

O fibrinogênio é um polipeptídeo complexo, produzido pelo fígado e constituído por três diferentes pares de cadeias. Além de sua importância primária, como proteína da coagulação (quando sob a ação proteolítica da trombina, forma a fibrina), é também uma proteína de fase aguda e, portanto, eleva-se em todas as situações que envolvem dano, infecção ou inflamação tissular (neoplasias, pós-operatórios e síndrome nefrótica) e,

também, na gestação^{30,59,60}. A determinação do fibrinogênio é usada nas situações onde se procura o diagnóstico diferencial das coagulopatias congênitas, adquiridas e de consumo (coagulação intravascular disseminada e fibrinogênólise), no diagnóstico da disfibrinogenemia, hipofibrinogenemia e afibrinogenemia, no controle da fibrinólise primária e secundária, no diagnóstico diferencial de indivíduos com risco trombótico aumentado^{30,60,61}.

1.2 ESTUDOS CLÍNICOS EM DOENÇA CORONÁRIA CRÔNICA

O estudo MASS⁶²⁻⁶⁴ (Medicine, Angioplasty or Surgery Study) é um grande projeto desenvolvido no Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, que analisa o efeito terapêutico de diversas estratégias para o tratamento da doença arterial coronariana crônica com função sistólica preservada. A sua terceira versão (denominada MASS III) foi projetada para comparar a eficiência, segurança, comorbidades cerebrais, morbidade e mortalidade, qualidade de vida e custo-efetividade da cirurgia de revascularização com e sem uso de circuito extracorpóreo em pacientes com doença arterial coronariana multiarterial que necessitem de terapia cirúrgica, passível de ser realizada por ambas as técnicas. Até a elaboração deste trabalho, um total de 304 pacientes neste único centro já havia sido randomizado para uma das estratégias.

Estudos em literatura que comparem mudanças hemostáticas de forma prospectiva são escassos e com número reduzido de pacientes²⁵. O MASS III, por se tratar de um estudo randomizado e prospectivo produz grupos homogêneos e comparáveis entre si, e permite atribuir ao uso do circuito extracorpóreo as diferenças encontradas. Vieses como erros e dificuldades de técnica são controlados pela própria randomização. Desse modo, podemos realizar um subestudo em que se avaliem as alterações hemostáticas durante o ato cirúrgico e o pós-operatório, correlacionando-as com eventos adversos e necessidade de intervenções específicas.

2 OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo foram:

- Comparar o comportamento de variáveis selecionadas de hemostasia e inflamação em pacientes submetidos à cirurgia com e sem circulação extracorpórea que possam determinar um estado pró-trombótico ou sangramento, correlacionando com eventos clínicos adversos;
- Correlacionar as variáveis de inflamação e hemostasia com sangramento e número de transfusões, determinando se existem valores que possam prever esses eventos precocemente.

3 METODOLOGIA

3.1 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O projeto MASS III foi aprovado pela Comissão Científica e de Ética do Instituto do Coração em 394/01/16 de 06/09/2001, protocolo de pesquisa SDC – 1926/01/114 e pela Comissão de Normas Éticas e Regulamentares do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob o nº 698/01 em 10/10/2001.

O projeto de análise da atividade hemostática, é um subestudo do MASS III (Medicine, Angioplasty, or Surgical Study III), foi aprovado pela Comissão Científica e de Ética do Instituto do Coração e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 25/05/2006 com o protocolo SDC 2774/06/019, número 421/06.

3.2 PROJETO MEDICINE, ANGIOPLASTY, OR SURGICAL STUDY – MASS III

O estudo MASS III está sendo desenvolvido no Instituto do Coração (InCor) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

Entre os pacientes que acompanham no ambulatório do InCor, são considerados admissíveis para o estudo aqueles que não foram submetidos à cirurgia cardíaca prévia, que apresentavam função ventricular esquerda preservada e doença arterial coronariana com indicação de cirurgia de revascularização miocárdica. Além disso, deverá haver concordância do cirurgião de que a cirurgia seja factível de ser realizada, tanto pelas técnicas com e sem circulação extracorpórea (CEC). Esta seleção depende predominantemente da localização precisa da estenose, da capacidade do coração de resistir à oclusão temporária das artérias coronárias envolvidas e das consequências hemodinâmicas da imobilização da parede ventricular.

Após a concordância e assinatura do Termo de Consentimento Informado, os pacientes foram incluídos de forma prospectiva e randomizados em dois grupos: **grupo com CEC** – com pacientes randomizados para cirurgia de RM, com auxílio de CEC; e **grupo sem CEC** – com pacientes randomizados para RM, sem auxílio de CEC.

3.2.1 Critérios de inclusão

O diagnóstico de doença arterial coronariana (DAC) é definido pela presença de lesões coronarianas obstrutivas superiores a 70% no cateterismo. Os critérios de inclusão foram:

1. Idade acima de 18 anos;
2. Angina estável e/ou isquemia documentada devido à doença multiarterial coronariana e função ventricular esquerda preservada;
3. Doença arterial coronariana multiarterial confirmada por cineangiocoronariografia com, ao menos duas artérias epicárdicas com lesão $\geq 70\%$ em, pelo menos, dois territórios arteriais diferentes: Descendente Anterior, Circunflexa e Coronária Direita;
4. Pacientes factíveis de serem operados por ambas as técnicas cirúrgicas: com e sem CEC;
5. Podem ser incluídos pacientes sem lesão significativa de estenose em tronco de coronária esquerda;
6. Possibilidade de realizar as visitas de acompanhamento e realização dos exames pertinentes ao estudo;
7. Concordância e assinatura do consentimento informado.

3.2.2 Critérios de não inclusão

Os critérios de não inclusão foram:

1. Idade inferior a 18 anos;
2. Insuficiência cardíaca classes III ou IV da NYHA;
3. Cirurgia cardíaca valvar ou de revascularização miocárdica prévia;
4. Angioplastia com implante de stent nos últimos 6 meses;

5. Acidente vascular cerebral (AVC) prévio nos últimos 6 meses ou paciente com AVC há mais de 6 meses, porém com sequelas neurológicas, definidas como pontuação no escore de Ranking > 1;
6. Necessidade concomitante de outra cirurgia de grande porte, tais como: cirurgia valvar, ressecção de aneurisma ventricular, cirurgia cardíaca de doença congênita, cirurgia vascular de carótidas ou aorta torácica, ou abdominal;
7. Doenças concomitantes que tornem o acompanhamento por, pelo menos, 5 anos improvável ou impossível, tais como: neoplasias, hepatopatias ou doenças malignas sistêmicas importantes;
8. Infarto do miocárdio com surgimento de onda Q no eletrocardiograma de repouso nas últimas 6 semanas;
9. Diátese hemorrágica ou estado de hipercoagulabilidade;
10. Deformações torácicas que impeçam a cirurgia sem o circuito extracorpóreo;
11. Incapacidade de compreensão e assinatura do Termo de Consentimento Informado.

Os pacientes foram acompanhados durante todo seu período de internação e em seguimento ambulatorial.

3.2.3 Procedimento anestésico e cirúrgico

3.2.3.1 Geral

O procedimento foi realizado, conforme as recomendações atuais das técnicas anestésicas e cirúrgicas para revascularização miocárdica. A cirurgia é realizada por pessoal experiente nas técnicas com e sem circulação extracorpórea. O acesso cirúrgico é feito por esternotomia mediana em todos os casos. As técnicas de incisão e sutura são idênticas em ambos os grupos, mas a informação do tipo da técnica cirúrgica para o qual foi randomizado, não foi divulgada aos familiares nem ao médico assistente do grupo.

Não havia restrições quanto ao uso do procedimento de reaproveitamento de sangue autólogo no intraoperatório, que é definido como sendo a aspiração de sangue de circuitos sanguíneos extracorpóreos com subsequente retorno deste sangue ao paciente. Para este procedimento, são utilizadas máquinas de autotransusão automática intraoperatória, que lavam e concentram hemácias. O uso destas máquinas reduz a exposição a doadores halogênicos, além de possibilitar a obtenção rapidamente do volume de sangue necessário em casos de transfusão maciça. O reservatório Fresenius (Fresenius Kabi, Alemanha) foi utilizado para retornar o conteúdo sanguíneo para todos os pacientes, quando em quantidade suficiente.

3.2.3.2 Cirurgia com circuito extracorpóreo

A cirurgia convencional com auxílio de circulação extracorpórea é realizada com a tentativa de minimizar o impacto da CEC. Previamente ao ato cirúrgico, é administrado um grama de hidrocortisona, conforme protocolo da equipe de cirurgia cardíaca do InCor. Os pacientes são rotineiramente resfriados até 34 °C para operações com três enxertos e 32 °C para quatro enxertos ou mais. A cardioplegia com solução sanguínea resfriada é feita por via anterógrada (raiz aórtica) e retrógrada (seio coronário), seguida por heparinização de 300 UI/Kg. A protamina é utilizada para reverter os efeitos da heparinização somente na técnica com CEC. Todas as anastomoses são suturadas manualmente.

3.2.3.3 Cirurgia sem circuito extracorpóreo

A cirurgia sem circuito extracorpóreo utiliza o estabilizador Octopus® (Medtronic Inc., Minneapolis, Estados Unidos da América). A porção distal do estabilizador com dois braços e ventosas é colocada em ambos os lados da artéria a ser revascularizada. Este procedimento fixa a artéria nativa e permite uma imobilização suficiente para a anastomose do enxerto. O protocolo de heparinização utiliza 150 UI/Kg na cirurgia sem CEC. O uso de shunt intracoronário não é rotineiramente utilizado; indicações para seu emprego incluem visibilidade ruim, alterações do segmento ST e instabilidade hemodinâmica.

3.3 ESTUDO DA ATIVIDADE HEMOSTÁTICA E INFLAMATÓRIA

Foram analisados os 100 primeiros pacientes randomizados pelo estudo MASS III para marcadores inflamatórios e de atividade fibrinolítica. Similarmente ao estudo MASS III os pacientes foram divididos nos dois grupos: **com CEC** – pacientes randomizados para cirurgia de RM com CEC; e **sem CEC** – pacientes randomizados para cirurgia de RM sem CEC.

3.3.1 Definições

O momento basal foi considerado como o período que precede o procedimento cirúrgico, momento pós foi considerado o período em torno da primeira hora após o término do ato cirúrgico e o momento 24h foi o período em torno da 24ª hora após o término da cirurgia.

O diabetes melitus foi considerado como glicemia de jejum superior a 126 mg% (em duas amostras diferentes ou em uma amostra, porém acompanhada de sintomas: polifagia, polidipsia e poliúria) ou maior que 200 mg% na glicemia ao acaso, ou pacientes com história de diabetes e em uso de medicação específica para tratamento. A hipertensão arterial sistêmica foi definida com níveis tensionais superiores a 140/90 mmHg em duas visitas ou pacientes em uso de medicação anti-hipertensiva que referiam história de hipertensão. Hipercolesterolemia foi definida como níveis de colesterol total superior a 240 mg/dL, hipertrigliceridemia foi considerada como triglicérides

superior a 200 mg/dL e dislipidemia foi definida como a presença de hipercolesterolemia ou hipertrigliceridemia. A infecção de ferida operatória foi definida como secreção purulenta pela ferida operatória com cultura positiva para micro-organismos e que requer antibioticoterapia. Os critérios de infarto do miocárdio perioperatório foram a presença de nova onda Q maior que 0,04 ms e aumento de CK-MB superior a três vezes o valor basal. Insuficiência renal aguda foi definida com aumento de uréia e creatinina (superior a 1 mg/dL ao dia).

Acidente vascular cerebral foi definido como lesão cerebral focal que persiste por mais de 24h acompanhado de sintoma neurológico que eleve a escala de Ranking em mais de 1 ponto, com aparecimento súbito e achados de tomografia computadorizada do crânio compatível com isquemia cerebral. Insuficiência cardíaca sistólica foi definida como fração de ejeção inferior a 40% pela ecocardiografia utilizando-se o método bidimensional de Simpson. Sangramento elevado foi definido como volume de sangramento superior a 400 ml no perioperatório, dosado por meio do aspirado do campo cirúrgico, resíduo de circulação extracorpórea e peso de compressas; volume de sangramento superior a 400 ml pelos drenos mediastinais e pleurais nas primeiras 6h; e volume de sangramento superior a 1.000 ml pelos drenos nas primeiras 48h após a cirurgia. Morte foi considerada como morte por qualquer causa.

3.3.2 Bioquímica

Os seguintes exames bioquímicos foram dosados: hematócrito, hemoglobina, leucócitos, número de plaquetas, tempo de protrombina (TP), tempo parcial de tromboplastina ativada, ureia, creatinina, glicemia, velocidade de hemossedimentação e colesterol total e frações.

As dosagens foram realizadas em todos os pacientes antes do procedimento cirúrgico. As dosagens de hematócrito, hemoglobina, leucócitos, plaquetas, tempo de protrombina (TP), tempo parcial de tromboplastina ativada foram repetidas nos momentos pós. Vinte e quatro horas após a cirurgia, as dosagens de hematócrito e hemoglobina foram repetidas novamente. A Figura 3 mostra esquematicamente os momentos das coletas realizadas.

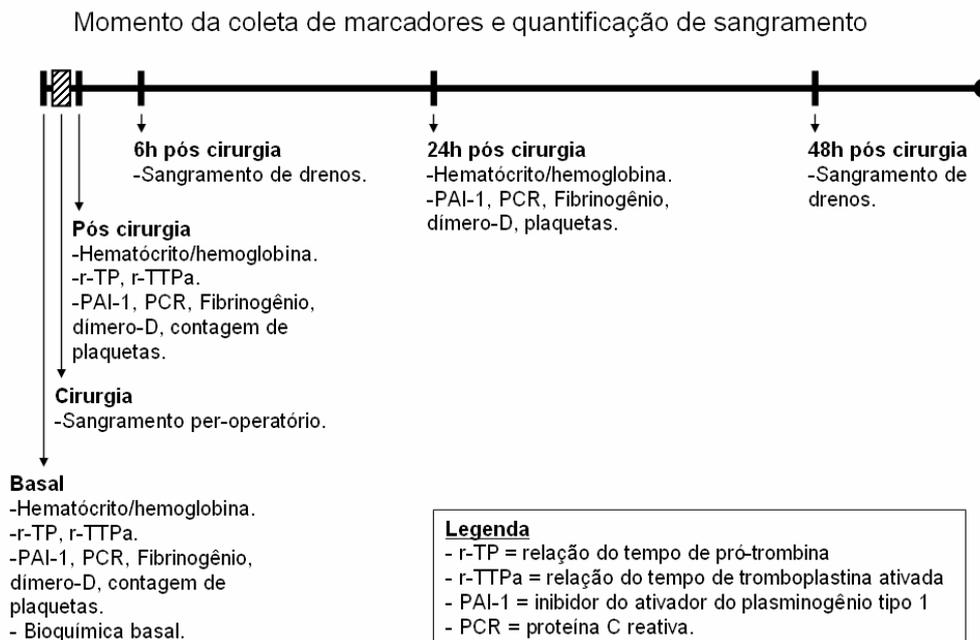


Figura 3 - Plano de trabalho com os momentos em que foram coletados os marcadores bioquímicos e quantificados os sangramentos. As bioquímicas da rotina foram coletadas no momento pré e 24h após a cirurgia

3.3.3 Marcadores inflamatórios e de hemostasia dosados

Marcadores inflamatórios e de hemostasia (proteína C reativa, fibrinogênio, dímero-D e PAI-1) foram dosados. As amostras foram coletadas nos momentos pré-procedimento, e pós e 24h após o término da cirurgia. Amostras do plasma foram obtidas de sangue anticoagulado com Citrato de Sódio (0,129 M, pH 6,0, 1:10 V/V), após centrifugação (30.000 G x min) e foram armazenadas a -80 °C até aferição. As amostras foram analisadas utilizando a técnica de ELISA, que está descrita em detalhes no anexo 7.

3.3.3.1 Fibrinogênio

Em nosso estudo, o fibrinogênio foi mensurado, usando-se reagente antifibrinogênio pelo método ELISA (Affibody Fibrinogen®, Affibody®, Bromma, Suécia), conforme orientações do fabricante. Esta molécula tem uma afinidade específica que se liga ao fibrinogênio humano e favorece a captura do reagente na técnica de ELISA. A sensibilidade da técnica é de 2 ng de fibrinogênio/ml.

A técnica consiste em diluir o reagente Affibody® em uma de solução buffer, até obter-se uma concentração final de 5,0 µg/ml. Cobre-se apenas o fundo da placa de 96 micropoços com a adição de 50 µl do reagente diluído por micropoço. Fecha-se a placa com adesivo plástico e incuba-se a +4 °C por toda noite. Remove-se a camada da solução e lava-se a placa duas vezes com água deionizada. As gotículas remanescentes são removidas com papel toalha. Tapam-se os sítios de ligação das proteínas remanescentes, fazendo-se a incubação com buffer. Adicionam-se 200 µl por micropoço, cobre-se a placa com cobertura plástica e incuba-se por 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, a placa é esvaziada sem lavagem.

Adicionam-se 50 µl da amostra e de um controle negativo diluído com PBST (2,68 mM KCl, 1,47 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, pH 7,4, 0,05%) por micropoço. Utiliza-se o fibrinogênio purificado como padrão. As concentrações foram determinadas pelo usuário. Logo após, cobre-se

novamente a placa com adesivo plástico e incuba-se por 1h à temperatura ambiente, sendo lavada novamente 4 vezes com PBST.

Dilui-se o anticorpo antifibrinogênio para uma concentração final de 1:10.000 em PBST. Adicionam-se 50 µl de anticorpo por micropoço, cobre-se a placa com cobertura plástica e incuba-se por 1h à temperatura ambiente. Adicionam-se 50 µl de anticorpo por micropoço, cobre-se com plástico e incuba-se por 1h. Lava-se a placa novamente 4 vezes com PBST. Dilui-se o conjugado HRP (anti-IgG de coelho) 1:10.000 em PBST. Adicionam-se 50 µl por micropoço, cobre-se a placa com plásticos e incuba-se por mais 1h à temperatura ambiente. Após, lava-se mais 4 vezes com PBST.

Adicionam-se 50 µl por micropoço de substrato ImmunoPure® TMB preparado, conforme as especificações do fabricante. Para-se a reação após 30 minutos com buffer específico (2 M H₂SO₄), 50 µl por micropoço. Em seguida, mede-se a absorvância em placas a 450 nm, usando espectrofotômetro. Com isso, é traçada uma curva com o valor de referência obtido contra a concentração utilizada. Esta curva é usada para determinar a concentração do fibrinogênio.

3.3.3.2 Proteína C reativa

A PCR foi determinada pela técnica de ELISA (Human Soluble high sensity CRP Immunoassay, R&D Systems Inc, Mineápolis, MN), conforme orientações do fabricante. Em resumo, o princípio fundamental do teste é a existência de um revestimento de proteínas policlonais anti-PCR humana em uma placa, onde a PCR presente na amostra liga-se a aos anticorpos dessa superfície. Lava-se o material, sendo retirado o material que não se ligou à superfície. A seguir, liga-se um substrato que tem a propriedade de assumir coloração diferente quando em contato com a enzima, sendo proporcional à quantidade de PCR presente na amostra. A leitura é feita em leitoras de placas (BioRad, Tóquio, Japão) a 450 nm e comparada com uma curva-padrão obtida com concentrações conhecidas de mediadores recombinantes.

3.3.3.3 Dímeros-D

A técnica de ELISA foi usada para dosagem de dímero-D (TintElize® D-Dimer, BioPool®, Umea, Suécia), conforme as orientações do fabricante. Este reagente é de uso exclusivo para pesquisas e utiliza o princípio do duplo anticorpo. Amostras de plasma são adicionadas ao recipiente do teste, o que é coberto com um anticorpo monoclonal, MA-8D3, contra o dímero-D. Depois da incubação, suficiente para permitir que mais que 85% do dímero-D liguem-se aos anticorpos. Os HRP IgG marcados com fragmentos Fab de

antidímeros-D são adicionados. Isso permite a reação com os dímeros-d adsorvidos. Os micropoços da placa são esvaziados e lavados para remover o conjugado não ligado. Em seguida, o conjugado peroxidase (OPD/H₂O₂) é adicionado. Assim, a quantidade de coloração amarela desenvolvida é diretamente proporcional à quantidade de dímero-D presente na amostra.

3.3.3.4 Inibidor da ativação do plasminogênio tipo 1

A técnica utilizada para dosagem do PAI-1 foi a de ELISA (TintElize®, BioPool®, Umea, Suécia), conforme as orientações do fabricante. Este reagente é de uso exclusivo em pesquisas, e não é empregado comercialmente para procedimentos diagnósticos.

O teste TintElize® PAI-1 é baseado no princípio do duplo anticorpo e utiliza a mesma cobertura de anticorpos (MA-7D4B7). Durante a análise, são usados anticorpos normais e inativos para excluir resultados falso-positivos em uma resposta específica, uma limitação do teste ELISA convencional. Este método para obter um ELISA específico é denominado ISAC (Immunological Specificity and Accuracy Control).

Os micropoços A (de cor verde) contêm anticorpos monoclonais contra PAI-1 imobilizados na superfície dos micropoços, assim como anticorpos solúveis contra PAI-1. Os micropoços N (de cor azul) contêm os

mesmos anticorpos monoclonais contra PAI-1, imobilizados na superfície dos micropoços e anticorpos não imunes solúveis.

Durante a incubação da amostra, o antígeno PAI-1 na amostra é quantitativamente ligado a anticorpos cobertos nos micropoços N, mas não nos micropoços A (isso previne a ligação pelos anticorpos solúveis anti-PAI-1). O conjugado HRP e anti-PAI-1 são adicionados e também se ligam à molécula PAI-1. Isso forma um sanduíche de cobertura de anticorpos-PAI-1-anticorpo conjugado.

Os micropoços são lavados para remover o excesso de conjugado e outros materiais não ligados. O substrato HRP (OPD/H₂O₂) é adicionado e convertido em um produto amarelo na proporção da quantidade de HRP-conjugado ligado. A diferença na resposta entre o micropoço N e o A é a resposta específica ao PAI-1.

3.3.4 Análise Estatística

Os dados foram analisados após os cálculos realizados em software estatístico específico SPSS 13.0.

As variáveis foram analisadas descritivamente, obtendo-se valores mínimos e máximos, cálculo da média, desvio-padrão, erro-padrão e medianas para variáveis quantitativas; e valores de frequência absoluta e relativa para as variáveis qualitativas.

Para as variáveis ordinais e nominais, foi usado o teste Qui-quadrado para testar a igualdade entre as amostras, entre os grupos com e sem CEC. O Qui-quadrado compara as frequências observadas e esperadas em cada categoria, e testa se cada categoria contém a mesma proporção de valores ou que cada categoria contém uma proporção de valores especificados pelo usuário. O teste não paramétrico não requer a suposição sobre o tipo de distribuição dos dados.

Assim, as frequências esperadas para cada categoria foram de, ao menos 1, e não mais que 20% das categorias esperada que tiveram frequências menores que 5. No caso da frequência esperada ser inferior a 5, foi utilizado o teste de exatidão de Fisher. Esta variante do teste Qui-quadrado permite calcular a probabilidade de associação das características que estão em análise, ou seja, a probabilidade de tais características serem independentes, quando o número total de dados é pequeno. Assim, em amostras pequenas deve-se executar esse teste, pois produz erro menor que o teste de Qui-quadrado⁶⁵.

Para testar diferenças entre os grupos, entre variáveis quantitativas com distribuição Gaussiana e valores de base entre os grupos, foi utilizado o test t de Student para amostras independentes.

Este teste compara médias entre dois grupos de casos. Idealmente, para este teste, os sujeitos da pesquisa devem ser randomicamente distribuídos entre os grupos, como é o caso do presente estudo. Desse

modo, não é esperada diferença entre os grupos em relação aos dados de base (se houver, é atribuído à randomização), e qualquer diferença na resposta é atribuída ao tratamento ou à falta do mesmo, e não a outros fatores⁶⁵.

Quanto à suposição de normalidade dos dados rejeitada, utilizou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney que avalia se duas amostras de populações distintas são equivalentes para determinada categoria. As observações de ambos os grupos são combinadas e classificadas e, no caso de empate entre os valores, a média do mesmo é utilizada. O número de empates deve ser inferior ao número de observações. Se as populações forem idênticas, as classificações serão randomicamente misturadas entre as duas amostras⁶⁵. O nível de significância é calculado, levando-se em consideração o menor valor entre o número de vezes que o grupo com CEC precedeu sobre o grupo sem CEC, e o número de vezes que o grupo sem CEC precedeu sobre o grupo com CEC.

A análise de variância (ANOVA – Analysis Of Variance) bicaudal foi utilizada para analisar os dados de atividade inflamatória, fibrinolítica e função plaquetária, assim como as aferições bioquímicas e quantificação de sangramento. As medidas dessas variáveis foram feitas em três momentos diferentes em cada sujeito do estudo, sendo procedido o cálculo com a análise de variância de medidas repetidas. A circulação extracorpórea foi especificada como fator que divide a população em grupos (grupo com CEC e grupo sem CEC), e investigadas interações entre os fatores, bem como

seus efeitos individuais. Além disso, os efeitos de covariáveis e suas interações também foram incluídos. No caso de significância entre o fator e o grupo, o teste de Tukey HSD (*honest significant difference*) ou o teste LSD (*Least significant difference*) foi utilizado para estabelecer diferenças ponto a ponto na análise *post hoc* com comparações múltiplas⁶⁵.

Como a ANOVA é um teste indicado para distribuição gaussiana, foi feita conversão logarítmica dos valores previamente à análise, com o objetivo de normalizar os valores. Por meio dessa conversão, a diferença entre os números que estejam muito altos ou muito baixos é reduzida após esse cálculo.

A curva ROC (Receive Operator Characteristic) é usada para avaliar o desempenho de um teste diagnóstico, na qual uma variável existe com duas categorias, nas quais o sujeito pode ser classificado⁶⁵. Este teste foi utilizado para determinarmos o melhor ponto de corte entre variáveis contínuas de atividade inflamatória e fibrinolítica em relação à quantidade de sangramentos considerados elevados.

As correlações entre sangramentos, transfusões e marcadores de inflamação e hemostasia foram realizadas por intermédio do cálculo de Spearman para variáveis não paramétricas. O coeficiente de correlação varia entre -1 e 1. Coeficientes de correlação maiores que zero indicam uma correlação linear positiva; e os coeficientes menores que zero indicam uma correlação linear negativa. Quanto mais distante do zero o coeficiente de

correlação maior será a sua associação. Via de regra, valores entre 0,00 e $\pm 0,19$ indicam uma correlação bem fraca; entre $\pm 0,20$ e $\pm 0,39$, uma correlação fraca; entre $\pm 0,40$ e $\pm 0,69$, uma correlação moderada; entre $\pm 0,70$ e $\pm 0,89$, uma correlação forte; e entre $\pm 0,90$ e $\pm 1,00$, uma correlação muito forte.

O valor de p inferior a 0,05 foi considerado como estatisticamente significativo. A menos que outra definição seja indicada, os dados apresentados serão mencionados nos gráficos como média com erro-padrão (EP).

4 RESULTADOS

4.1 DADOS BASAIS DOS PACIENTES ESTUDADOS

Dos 100 primeiros pacientes randomizados pelo estudo MASS III, oito tiveram perda do material após a coleta (hemólise ou coagulação da amostra), prejudicando a análise e sendo retirados do estudo. O presente estudo contou, então, com 92 pacientes com amostra íntegra, e 41 foram randomizados para o grupo com CEC e 51, ao grupo com CEC.

Os dados da Tabela 1 mostram que os grupos com e sem CEC foram similares em relação à idade (anos), sexo, infarto do miocárdio prévio, hipertensão, diabetes, tabagismo, dislipidemia, angina e número de vasos com doença coronariana.

Tabela 1 - Características basais dos pacientes

Características	Com CEC (n=41)	Sem CEC (n=51)	Valor de p
Idade (anos)	59,3±9,7	61,4±8,9	0,21
Sexo feminino (%)	19	35	0,08
Infarto prévio (%)	46	42	0,68
Hipertensão (%)	60	65	0,62
Diabetes (%)	18	26	0,34
Tabagismo (%)	42	22	0,06
Dislipidemia (%)	81	72	0,31
Angina	47	53	1,00
Biarterial	31	69	0,31
Triarterial	46	54	

CEC, circulação extracorpórea.

Os dados da Tabela 2 mostram a fração de ejeção, hemoglobina, hematócrito, número de plaquetas, número de leucócitos, relação de tempo de protrombina, relação de tempo de tromboplastina parcial ativado, velocidade de hemossedimentação, colesterol total, ureia, creatinina e glicemia. Com exceção do LDL colesterol que se apresentava mais elevado no grupo com CEC ($p = 0,02$), os demais valores foram similares em ambos os grupos.

Tabela 2 - Características dos valores bioquímicos basais dos pacientes

Características	Com CEC (n=41)	Sem CEC (n=51)	Valor de p
Hemoglobina (g/dL)	12,82±1,22	12,37±1,65	0,15
Hematócrito (%)	37,77±3,79	36,29±4,75	0,09
Plaquetas (x 103/mcL)	205±55	192±55	0,24
Leucócitos (x 103/mcL)	6,5±1,8	7,1±2,4	0,70
Relação de tempo de protrombina	1,02±0,05	1,08±0,17	0,22
Relação de tempo de tromboplastina parcial ativada	1,07±0,23	1,07±0,17	0,62
Velocidade de sedimentação glomerular (s)	22,2±13,1	22,2±13,2	0,81
Fração de ejeção (%)	62±14	64±12	0,43
Colesterol total (mg/dL)	224±49	211±53	0,14
HDL colesterol (mg/dL)	39±9	45±28	0,88
LDL colesterol (mg/dL)	142±47	125±50	0,02
Triglicérides (mg/dL)	84±10	86±17	0,46
Glicemia (mg/dL)	116±44	110±34	0,83
Creatinina (mg/dL)	1,1±0,25	1,1±0,32	0,86
Ureia (mg/dL)	43±11	40±11	0,33

CEC, circulação extracorpórea.

4.2 DADOS DO INTRA E PÓS-OPERATÓRIO

O tempo de circulação extracorpórea média foi de 77,02±28,51 minutos nos pacientes do grupo com CEC. A duração da cirurgia (com CEC: 289±62 minutos vs sem CEC: 248±65 minutos; $p < 0,01$), número de enxertos (com CEC: 2,93 vs sem CEC: 2,37; $p < 0,01$), número de territórios com enxerto ($p < 0,01$) foram maiores no grupo com CEC. Os grupos mostraram-se similares quando comparados quanto à revascularização completa, uso de antifibrinolíticos, tempo de internação em unidade de terapia intensiva e tempo de hospitalização (Tabela 3).

Tabela 3 - Características dos pacientes cirúrgicos

Característica	Com CEC (n=41)	Sem CEC (n=51)	Valor de p
Tempo de CEC (min)	77,02±28,51	NA	NA
Tempo de cirurgia (min)	289±62	248±65	<0,01
Número de enxertos	2,93	2,37	<0,01
Revascularização completa (%)	62	48	0,17
Tempo de pinçamento (min)	48,13	NA	NA
Número de territórios tratados (%)			
2	14,6	56,9	< 0,01
3	85,4	43,1	
Uso de antifibrinolítico (%)	15	8	0,33
Transfusão peroperatória (%)	37	25	0,26
Volume de transfusão peroperatória (número de bolsas/paciente)	0,70±0,99	0,45±0,82	0,25
Sangramento peroperatório (mL)	381 ±177	288±114	0,01
Sangramento pós-operatório (mL) (6h)	211 ±150	176±152	0,30
Sangramento pós-operatório (mL) (48h)	814±372	591±379	<0,01
Tempo em unidade de terapia intensiva (dias)	2,42±0,81	3,21±5,35	0,16
Tempo de hospitalização (dias)	12,05±10,29	13,64±14,82	0,52

CEC, circulação extracorpórea; NA, não aplicável.

A média do sangramento durante o procedimento cirúrgico foi significativamente maior no grupo com CEC nos momentos perioperatórios ($p = 0,01$) e 48h após a cirurgia ($p < 0,01$), em relação ao grupo sem CEC. Embora a perda sanguínea, 6h após a cirurgia, tenha sido também superior no grupo com CEC (211 ± 150 ml) em relação ao grupo sem CEC (176 ± 152 ml), ela não foi estatisticamente significativa ($p = 0,30$).

Os dados da Tabela 4 e 5 mostram os eventos avaliados, tais como: morte, acidente vascular cerebral, infarto do miocárdio, transfusão, insuficiência cardíaca/síndrome de baixo débito cardíaco, transfusão sanguínea, infecção respiratória, derrame pleural, insuficiência renal aguda e mediastinite. A incidência de eventos não foi estatisticamente significativa entre os grupos quando comparados até a alta hospitalar (Tabela 4) e até um ano após a cirurgia (Tabela 5).

Tabela 4 - Eventos ocorridos no pós-operatório até alta hospitalar

Evento	Com CEC (n=41)		Sem CEC (n=51)		Valor de p
	eventos	%	eventos	%	
Morte	1	2,4	0	0,0	0,56
Infarto	2	4,9	5	9,8	0,31
Baixo débito cardíaco	1	2,4	4	7,8	0,25
Síndrome da angústia respiratória do adulto	1	2,4	2	3,9	0,58
Insuficiência renal	1	2,4	1	2,0	0,69
Acidente vascular cerebral	3	7,3	0	0,0	0,08
Insuficiência cardíaca	0	0,0	0	0,0	ns
Transfusão sanguínea	22	53,7	25	49,0	0,65
Derrame pleural	3	7,3	3	5,9	0,55
Infecção respiratória	2	4,9	3	5,9	0,60
Fibrilação atrial	3	7,3	6	11,8	0,36
Mediastinite	1	2,4	1	2,0	0,69

CEC, circulação extracorpórea; ns, não significativo.

Tabela 5 - Eventos após 1 ano de seguimento

Evento	Com CEC (n=40)		Sem CEC (n=51)		Valor de p
	eventos	%	eventos	%	
Nova cirurgia	1	2,5	0	0	0,44
Nova angioplastia	1	2,5	2	3,9	0,59
Infarto do miocárdio	0	0,0	3	6,3	0,17
Angina	4	10,0	10	19,6	0,20
Morte	0	0,0	1	2,0	0,56
Acidente vascular cerebral	0	0,0	0	0,0	ns
Eventos combinados (*)	5	12,2	11	21,6	0,24

CEC, circulação extracorpórea; (*) Eventos combinados: combinação dos eventos infarto, nova cirurgia, nova angioplastia, angina, morte e acidente vascular cerebral.

4.3 ANÁLISE DO HEMATÓCRITO, HEMOGLOBINA, LEUCÓCITOS, PLAQUETAS, COAGULAÇÃO E MARCADORES DE HEMOSTASIA EM CADA GRUPO

Os dados da Tabela 6 mostram os valores de PCR, fibrinogênio, dímero-D, plaquetas, hematócrito, hemoglobina, leucócitos, relação de TP e TTPa nos grupos com e sem CEC, nos diferentes momentos das coletas pré, pós e 24h após a cirurgia.

Tabela 6 - Valores de marcadores de inflamação e hemostasia dosados no estudo, em diferentes tempos nos grupos com e sem CEC

		COM CEC	SEM CEC	p*
PCR (mcg/mL)	<i>PRÉ</i>	5,16±9,29	3,92±6,55	ns
	<i>PÓS</i>	22,76±41,73	10,43±17,32	0,03
	<i>24H</i>	81,06±35,13	86,48±38,68	ns
Fibrinogênio (mg/dL)	<i>PRÉ</i>	355,63±158,47	309,25±89,20	ns
	<i>PÓS</i>	283,24±92,43	258,57±92,48	ns
	<i>24H</i>	381,98±93,39	406,86±153,24	ns
Dímero D (mcg/dL)	<i>PRÉ</i>	0,48±0,52	0,93±1,57	ns
	<i>PÓS</i>	2,50±2,70	1,42±0,83	< 0,01
	<i>24H</i>	0,87±0,73	1,57±2,36	ns
PAI-1 (ng/mL)	<i>PRÉ</i>	41,61±20,66	30,63±19,82	ns
	<i>PÓS</i>	102,73±81,64	65,58±47,24	< 0,01
	<i>24H</i>	55,15±53,69	35,56±20,51	0,03
Plaquetas (x 10 ³ /mL)	<i>PRÉ</i>	205±55	192±55	ns
	<i>PÓS</i>	161±54	176±52	ns
	<i>24H</i>	150±46	168±47	ns
Hemoglobina (g/dL)	<i>PRÉ</i>	12,82±1,22	12,3±1,65	ns
	<i>PÓS</i>	10,78±1,08	10,74±1,33	ns
	<i>24H</i>	10,46±2,72	10,71±0,98	ns
Hematócrito (%)	<i>PRÉ</i>	37±3,79	36±4,75	ns
	<i>PÓS</i>	31±3,20	31±3,73	ns
	<i>24H</i>	31±8,41	31±2,84	ns
Leucócitos (10 ³ /mCL)	<i>PRÉ</i>	6,54±1,83	7,08±2,45	ns
	<i>PÓS</i>	18,2±1,27	15,0±5,5	ns
	<i>24H</i>	14,5±6,4	18,1±13,3	ns
Relação de TP	<i>PRÉ</i>	1,02±0,05	1,08±0,17	ns
	<i>PÓS</i>	1,24±0,28	1,27±0,25	ns
Relação de TTPa	<i>PRÉ</i>	1,07±0,23	1,07±0,17	ns
	<i>PÓS</i>	1,02±0,24	1,03±0,14	ns

CEC, circulação extracorpórea; PCR, proteína C reativa; PAI-1, inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1; PRE, momento pré-operatório; PER, durante a cirurgia; PÓS, momento pós-cirurgia; 6h, 6h após a cirurgia; 24h, 24h após a cirurgia; 48h, 48h após a cirurgia; ns = não significativo; *comparações entre os grupos realizadas pelo teste de análise de variância (ANOVA) bicaudal.

No Gráfico 1 observamos que a proteína C reativa mostrou uma tendência a ter níveis maiores no pós-operatório imediato no grupo com CEC, comparado com o grupo sem CEC. Aumentos de grandeza semelhante foram vistos em ambos os grupos 24 h após a cirurgia ($p < 0,01$).

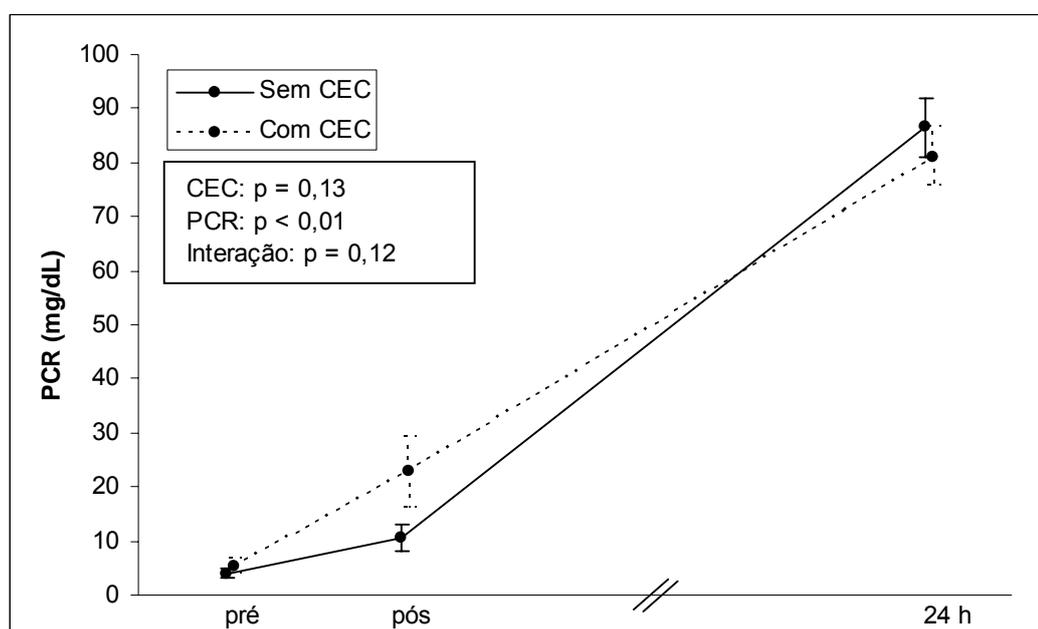


Gráfico 1 - Valores de proteína C reativa (média \pm erro-padrão) nos grupos com e sem CEC, nos momentos pré-operatório (pré), após a cirurgia (pós) e 24 horas após o procedimento (24h). CEC, circulação extracorpórea; PCR, proteína C reativa

Em ambos os grupos, a queda na concentração de fibrinogênio (Gráfico 2) foi modesta e não significativa no momento pós. Como era previsto, a concentração do fibrinogênio aumentou substancialmente e de forma significativa ($p < 0,01$) 24h após a cirurgia em ambos os grupos.

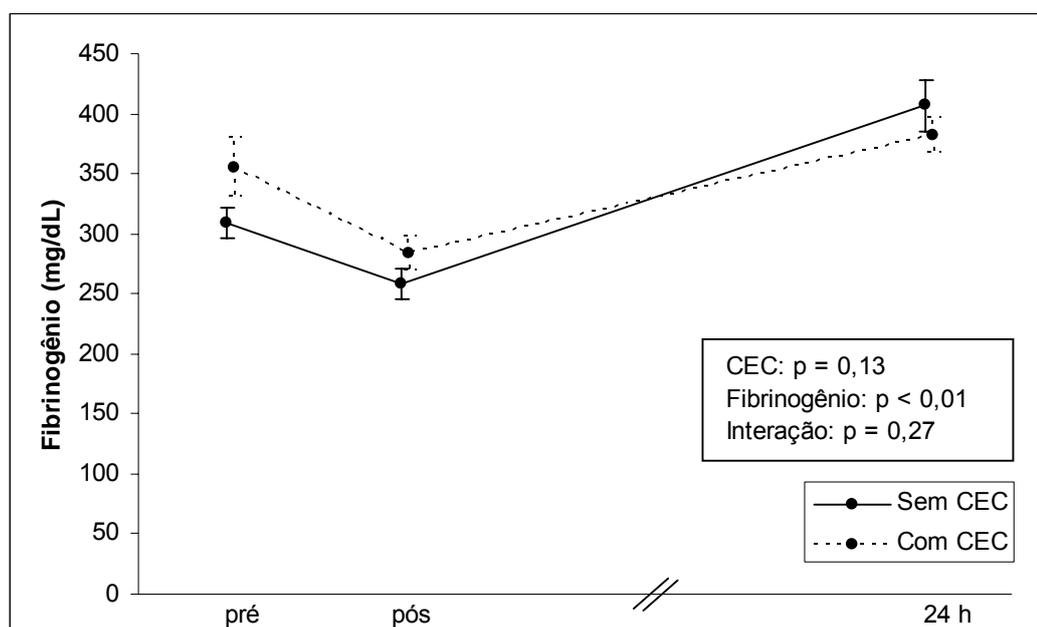


Gráfico 2 - Valores de fibrinogênio (média \pm erro-padrão) nos grupos com e sem CEC, nos momentos pré-operatório (pré), após a cirurgia (pós) e 24 horas após o procedimento (24h). CEC, circulação extracorpórea

O dímero-D (gráfico 3) apresentou um aumento significativo em ambos os grupos no momento pós-procedimento, porém sua concentração no grupo com CEC foi significativamente maior ($p < 0,01$). Também no grupo com CEC, o dímero-D foi significativamente maior no momento pós-cirurgia quando comparado com o momento pré-cirúrgico ($p < 0,01$).

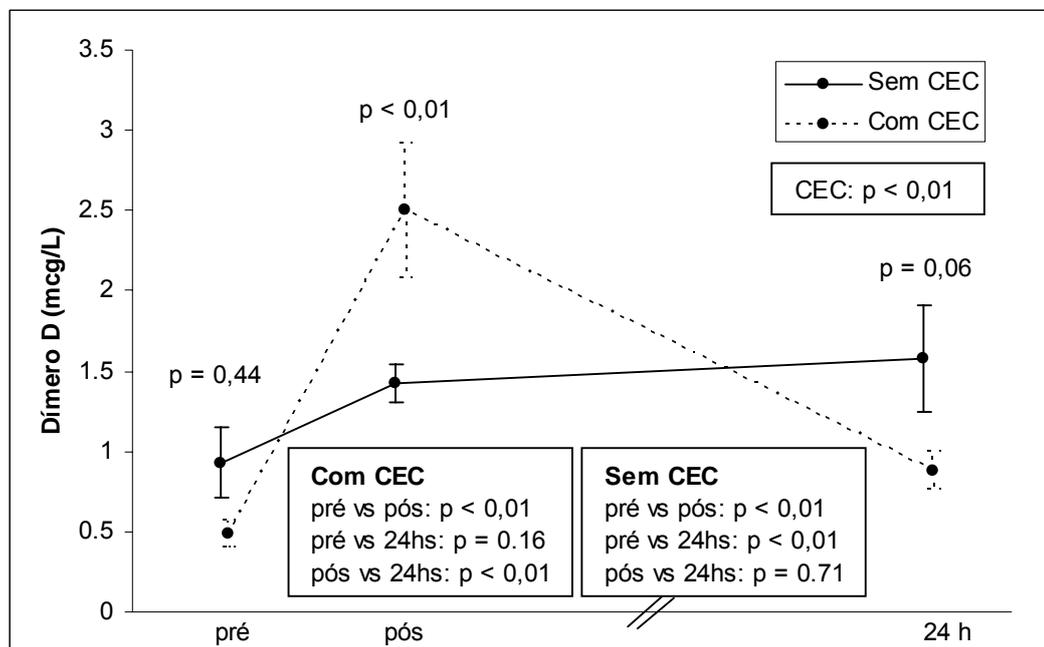


Gráfico 3 - Valores de dímero-D (média \pm erro-padrão) nos grupos com e sem CEC, nos momentos pré-operatório (pré), após a cirurgia (pós) e 24 horas após o procedimento (24h). CEC, circulação extracorpórea

A proteína de expressão do PAI-1 mostrada no Gráfico 4, aumentou significativamente no pós-cirurgia em ambos os grupos ($p < 0,01$), porém a magnitude do aumento foi maior no grupo com CEC (pré = $41,61 \pm 20,66$ ng/ml; pós = $102,73 \pm 81,64$ ng/ml), comparado com o grupo sem CEC (pré = $30,63 \pm 19,82$; pós = $65,58 \pm 47,24$ ng/ml). A concentração de PAI-1 foi significativamente maior no grupo com CEC quando comparada ao grupo sem CEC, no momento pós ($p < 0,01$).

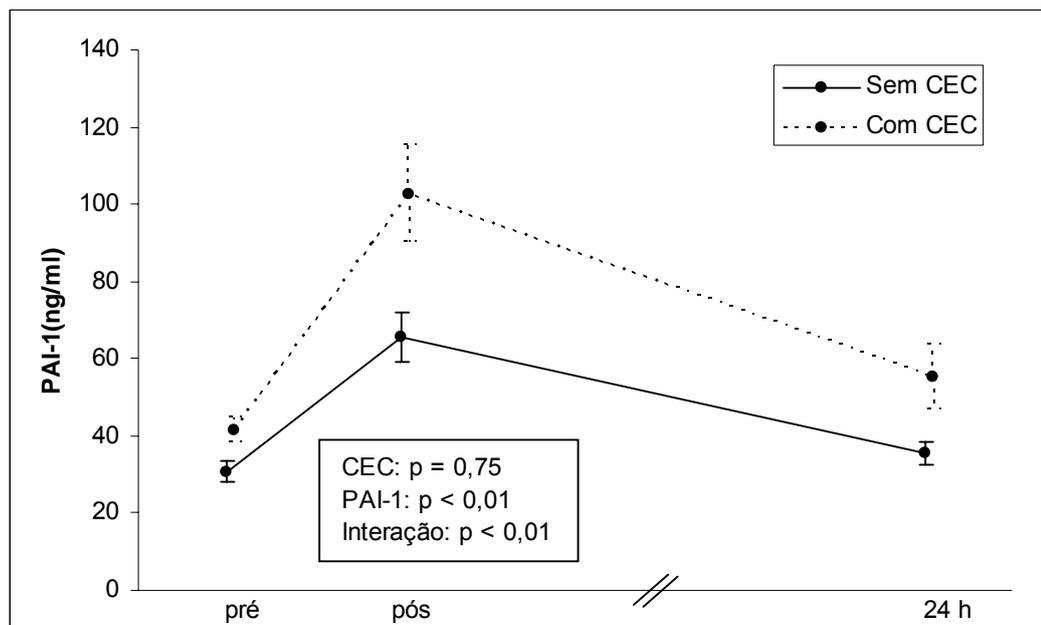


Gráfico 4 - Valores do Inibidor do Ativador de Plasminogênio-1 (média \pm erro-padrão) nos grupos com e sem CEC, nos momentos pré-operatório (pré), após a cirurgia (pós) e 24 horas após o procedimento (24h). CEC, circulação extracorpórea; PAI-1, Inibidor do Ativador de Plasminogênio-1

A relação do tempo de pró-trombina aumentou de forma paralela em ambos os grupos após a cirurgia ($p < 0,01$). Quando se comparou o grupo com e sem CEC no momento pós da cirurgia, não se observou diferença significativa (Gráfico 5). Inversamente, a relação de tempo de tromboplastina ativada apresentou pequena redução nos valores nos dois grupos ($p < 0,01$) considerando estes dois momentos analisados, sem diferença estatística entre os grupos (Gráfico 6).

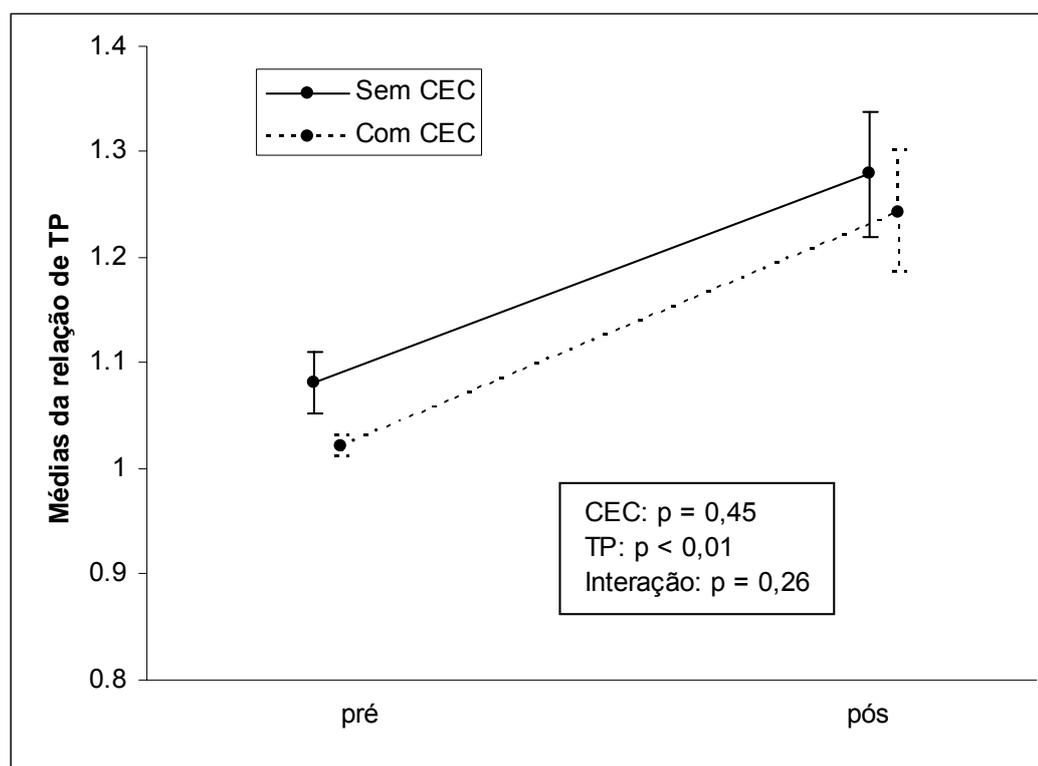


Gráfico 5 - Valores da relação do tempo de pró-trombina (média \pm erro-padrão) nos grupos com e sem CEC, nos momentos pré-operatórios (pré) e após a cirurgia (pós). CEC, circulação extracorpórea; TP, tempo de protrombina

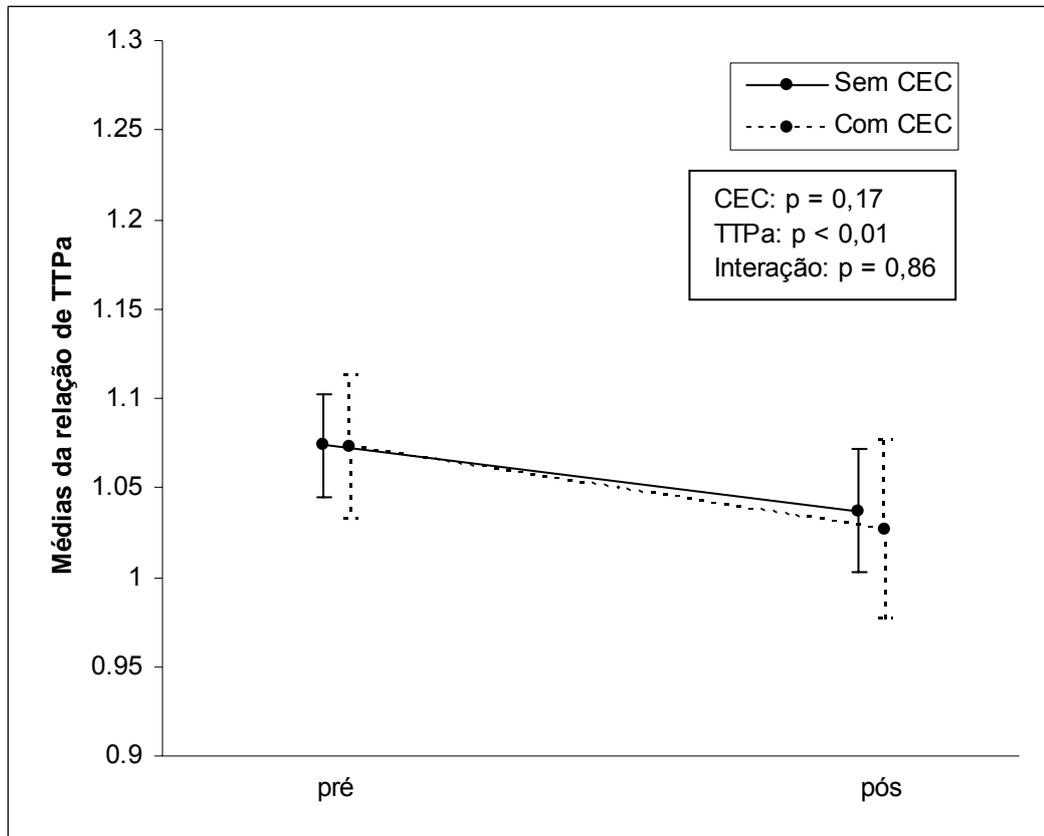


Gráfico 6 - Valores da relação do tempo de tromboplastina ativada (média \pm erro-padrão) nos grupos com e sem CEC, nos momentos pré-operatórios (pré) e após a cirurgia (pós). CEC, circulação extracorpórea; TTPa, tempo de tromboplastina ativada

As análises de hemoglobina (Gráfico 7) e hematócrito (Gráfico 8) apresentaram queda significativa e paralela em ambos os grupos ($p < 0,01$), sendo mais acentuadas no momento pós-cirurgia. Em relação ao uso de circulação extracorpórea, a magnitude da queda dos valores foi similar nos dois grupos.

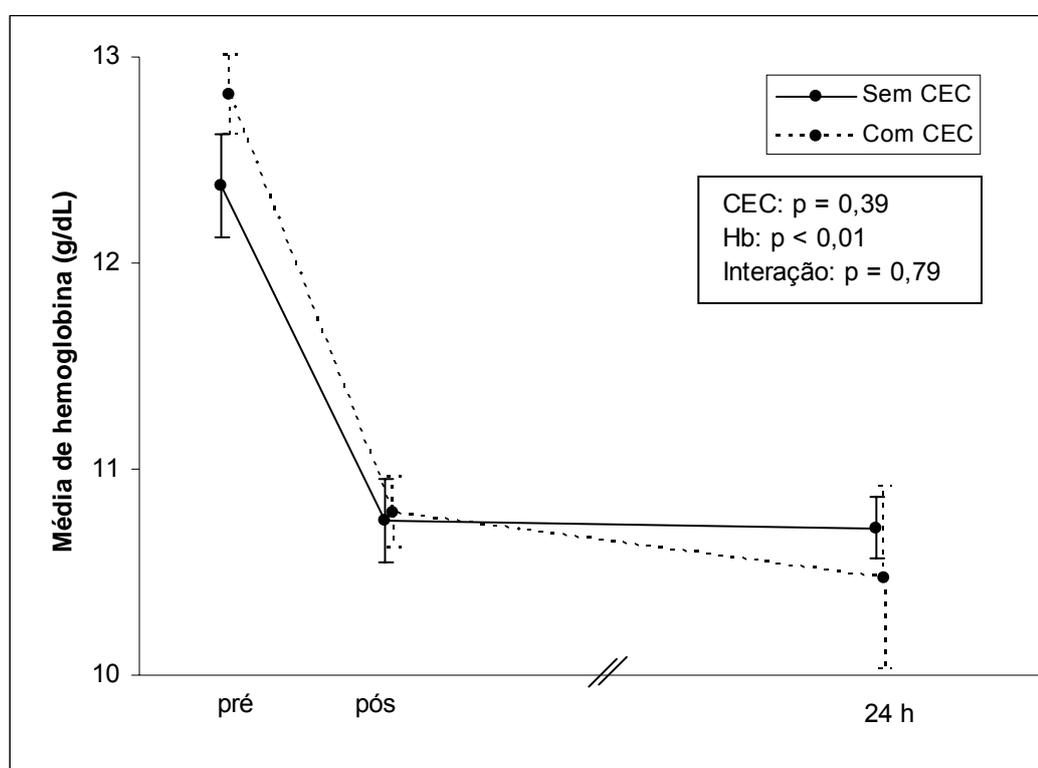


Gráfico 7 - Valores da hemoglobina (média \pm erro-padrão) nos grupos com e sem CEC, nos momentos pré-operatórios (pré), após a cirurgia (pós) e 24h após o procedimento (24h). CEC, circulação extracorpórea; Hb, hemoglobina

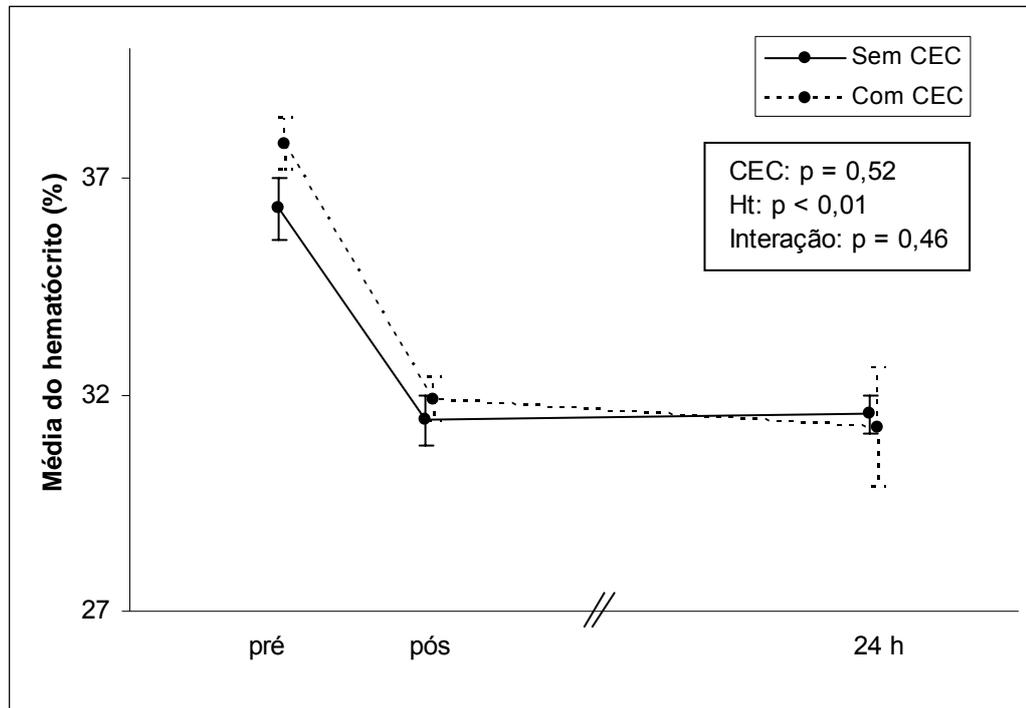


Gráfico 8 - Valores do hematócrito (média \pm erro-padrão) nos grupos com e sem CEC, nos momentos pré-operatórios (pré), após a cirurgia (pós) e 24h após o procedimento (24h). CEC, circulação extracorpórea; Ht, hematócrito

A contagem de plaquetas apresentou queda em ambos os grupos após a revascularização do miocárdio, sendo significativa no grupo com CEC em razão da magnitude da redução ter sido maior (pré = $205 \pm 55 \times 10^3/\text{ml}$; pós = $161 \pm 54 \times 10^3/\text{ml}$; $p < 0,01$) em relação ao grupo sem CEC (pré = $192 \pm 55 \times 10^3/\text{ml}$; pós = $176 \pm 52 \times 10^3/\text{ml}$; $p = 0,09$). O Gráfico 9 mostra que essa queda manteve-se do momento pós-operatório até 24h após a cirurgia em ambos os grupos, porém de forma não significativa (com CEC: $p = 0,64$; sem CEC: $p = 0,63$). Além disso, a diferença no número de plaquetas entre os dois grupos manteve-se não significativa nos momentos pós ($p = 0,12$) e 24h ($p = 0,09$).

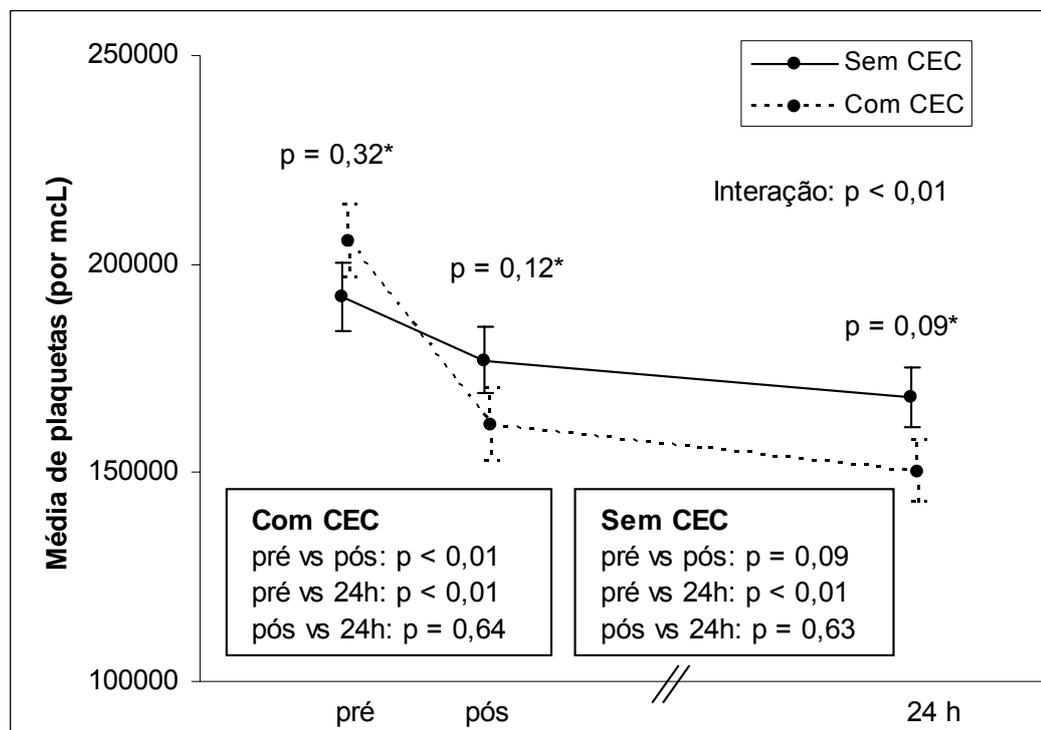


Gráfico 9 - Valores das plaquetas (média \pm erro-padrão) nos grupos com e sem CEC, nos momentos pré-operatórios (pré), após a cirurgia (pós) e 24h após o procedimento (24h). CEC, circulação extracorpórea; *análise Post Hoc com o teste de Tukey honest significant difference (HSD) para comparações múltiplas

Como era esperado, os leucócitos aumentaram significativamente no pós-procedimento em ambos os grupos ($p < 0,01$), e mantiveram-se elevados até 24h após a cirurgia de forma similar entre os grupos com e sem CEC (Gráfico 10).

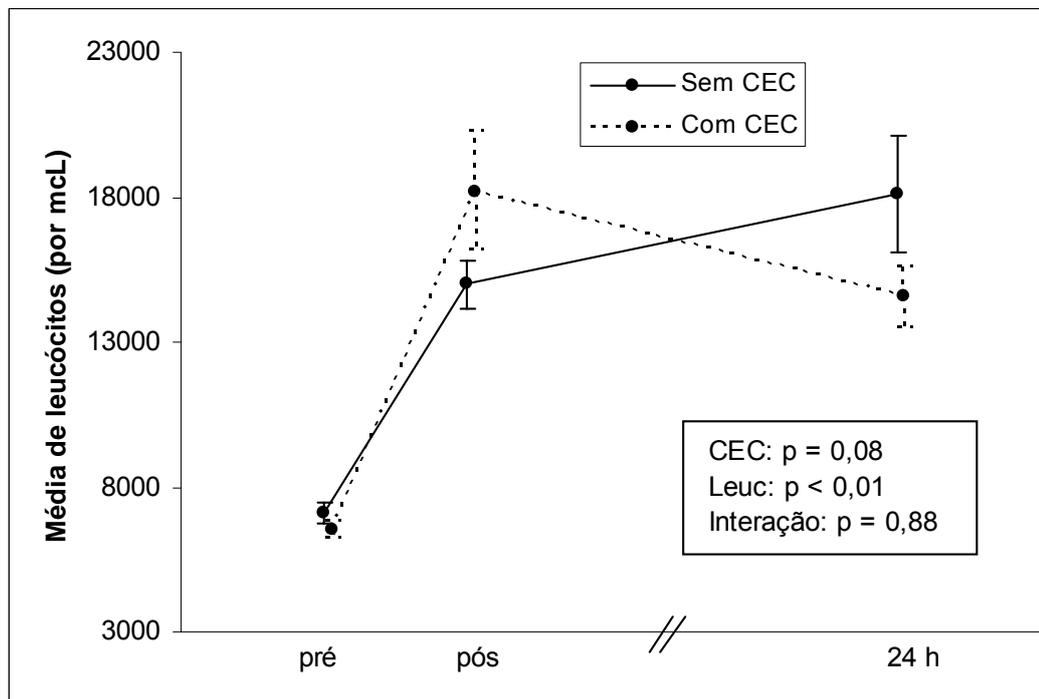


Gráfico 10 - Valores dos leucócitos (média \pm erro-padrão) nos grupos com e sem CEC, nos momentos pré-operatórios (pré), após a cirurgia (pós) e 24h após o procedimento (24h). CEC, circulação extracorpórea; Leuc, leucócitos

A diferença entre os grupos considerando o volume de sangramento foi significativa nos momentos pré-operatórios ($p = 0,03$) e 48h após a cirurgia ($p < 0,01$). O grupo com CEC apresentou um maior volume de sangramento ($p < 0,01$), como era previsto. Em ambos os grupos, o sangramento foi maior em 48h.

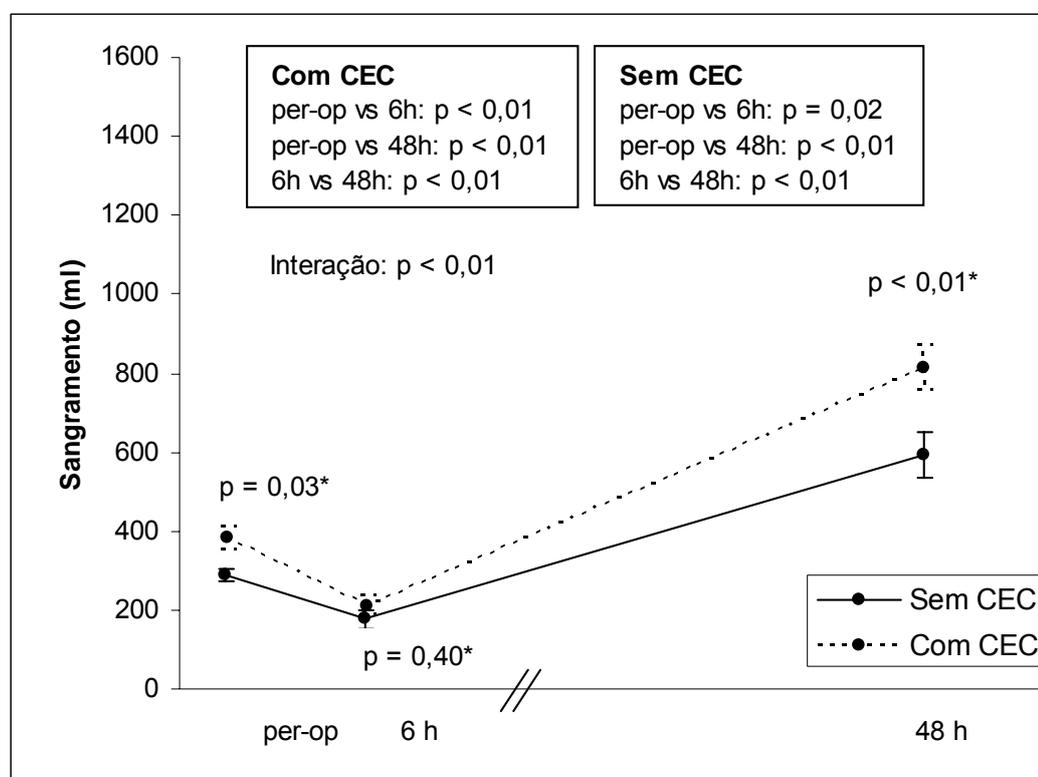


Gráfico 11 - Valores do sangramento (média \pm erro-padrão) nos grupos com e sem CEC, nos momentos pré-operatórios (pre), 6h após a cirurgia (6h) e 48h após o procedimento (48 horas). CEC, circulação extracorpórea; *análise Post Hoc com o teste de LSD para comparações múltiplas

4.4 EVOLUÇÃO CLÍNICA NO PÓS-OPERATÓRIO IMEDIATO E EM 1 ANO

Durante o período de internação hospitalar dos pacientes (Tabela 4) não se observou diferença estatisticamente significativa entre os grupos quando comparados quanto aos eventos infarto do miocárdio, síndrome de baixo débito cardíaco, síndrome de estresse respiratório do adulto, insuficiência renal aguda, acidente vascular cerebral, insuficiência cardíaca, transfusão sanguínea, derrame pleural, pneumonia, fibrilação atrial, confusão mental, mediastinite e óbito. Após 1 ano de seguimento, também, não foram encontradas diferenças entre os dois grupos nos eventos analisados (Tabela 5).

4.5 CORRELAÇÃO ENTRE MARCADORES DE FIBRINÓLISE E SANGRAMENTO

Os dados da Tabela 7 mostram que independente do uso de circuito extracorpóreo, houve correlação significativa entre o fibrinogênio dosado nas 24h e o sangramento de 48h após o procedimento; o número de plaquetas mensuradas antes da cirurgia também se correlacionou com sangramento durante o procedimento, 6h e 48h após seu término.

Tabela 7 – Todos os pacientes. Correlação entre sangramento perioperatório, 6 e 48h após a cirurgia cardíaca e marcadores inflamatórios e de fibrinólise em todos os pacientes da amostra (n = 92)

		<i>Pre</i>	<i>6h</i>	<i>48h</i>
PCR pré	cc	0,11	-0,08	-0,03
	p	0,33	0,48	0,75
PCR pós	cc	*	0,08	0,12
	p	*	0,48	0,26
PCR 24h	cc	*	*	-0,08
	p	*	*	0,49
DD pré	cc	-0,01	0,05	0,02
	p	0,91	0,60	0,83
DD pós	cc	*	-0,07	0,09
	p	*	0,51	0,41
DD 24h	cc	*	*	-0,06
	p	*	*	0,57
Fib pré	cc	-0,06	-0,02	-0,03
	p	0,61	0,83	0,76
Fib pós	cc	*	-0,04	-0,11
	p	*	0,70	0,29
Fib 24h	cc	*	*	-0,23
	p	*	*	0,03
PAI1 pré	cc	0,09	-0,09	-0,06
	p	0,40	0,37	0,56
PAI1 pós	cc	*	0,09	0,01
	p	*	0,37	0,96
PAI1 24h	cc	*	*	0,01
	p	*	*	0,92
Plaquetas pré	cc	0,24	-0,21	-0,20
	p	0,02	0,05	0,06
Plaquetas pós	cc	*	-0,28	-0,36
	p	*	0,01	< 0,01
Plaquetas 24h	cc	*	*	-0,41
	p	*	*	< 0,01
Transfusão per-operatória	cc	0,34	0,12	0,16
	p	< 0,01	0,26	0,15
Número de CHAd infundidas no perioperatório	cc	0,35	0,15	0,17
	p	< 0,01	0,17	0,11
Número de CHAd infundidas no pós-operatório	cc	*	0,22	0,29
	p	*	0,04	< 0,01

PCR, proteína C reativa; DD, dímero d; Fib, fibrinogênio; PAI1, inibidor da ativação do plasminogênio tipo 1; per, pré-operatório; pós, após a cirurgia; 24h, 24h após a cirurgia; cc, coeficiente de correlação; p, nível de significância; Per, sangramento perioperatório; 6h, sangramento 6h após cirurgia; 48h, sangramento 48h após cirurgia; CHAd, concentrado de hemácias do adulto; * sem significado clínico.

Os pacientes do grupo com CEC apresentaram correlação com fibrinogênio dosado 24h e sangramento em 48h após procedimento; A contagem de plaquetas basais correlacionou-se com o sangramento pré-operatório (Tabela 7). Entre os pacientes do grupo sem CEC, houve correlação entre sangramento em 48h e fibrinogênio dosado após procedimento; a contagem de plaquetas basais correlacionou-se com sangramento 6h e 48h após a cirurgia (Tabela 8).

Tabela 8 - Grupo COM CEC. Correlação entre sangramento pré-operatório, 6 e 48h após procedimento e marcadores inflamatórios e de fibrinólise em pacientes do grupo submetido à cirurgia com circuito extracorpóreo (n = 41)

		Per	6h	48h
PCR pré	cc	0,23	-0,03	0,06
	p	0,16	0,86	0,74
PCR pós	cc	0,23	0,30	0,23
	p	*	0,06	0,15
PCR 24h	cc	*	*	0,15
	p	*	*	0,36
DD pré	cc	-0,14	0,20	0,17
	p	0,41	0,22	0,31
DD pós	cc	*	-0,19	-0,05
	p	*	0,25	0,76
DD 24h	cc	*	*	0,02
	p	*	*	0,92
Fib pré	cc	-0,17	-0,02	-0,03
	p	0,31	0,91	0,84
Fib pós	cc	*	0,11	-0,03
	p	*	0,50	0,84
Fib 24h	cc	*	*	-0,32
	p	*	*	0,04
PAI1 pré	cc	-0,20	-0,03	-0,12
	p	0,23	0,84	0,48
PAI1 pós	cc	*	-0,04	-0,18
	p	*	0,80	0,28
PAI1 24h	cc	*	*	0,03
	p	*	*	0,86
Plaquetas pré	cc	0,34	-0,14	-0,13
	p	0,04	0,40	0,42
Plaquetas pós	cc	*	-0,20	-0,22
	p	*	0,21	0,17
Plaquetas 24h	cc	*	*	-0,16
	p	*	*	0,32
Transfusão perioperatória	cc	0,26	0,24	0,18
	p	0,10	0,13	0,26
Número de CHAd infundidas no perioperatório	cc	0,30	0,22	0,17
	p	0,06	0,16	0,28
Número de CHAd infundidas no pós-operatório	cc	*	0,18	0,31
	p	*	0,25	0,05

PCR, proteína C reativa; DD, dímero d; Fib, fibrinogênio; PAI1, inibidor da ativação do plasminogênio tipo 1; per, pré-operatório; pós, após a cirurgia; 24h, 24h após a cirurgia; CC, coeficiente de correlação; p, nível de significância; Per, sangramento perioperatório; 6h, sangramento 6h após cirurgia; 48h, sangramento 48h após cirurgia; CHAd, concentrado de hemácias do adulto; * sem significado clínico.

Tabela 9 - Grupo SEM CEC. Correlação entre sangramento perioperatório, 6 e 48h após procedimento e marcadores inflamatórios e de fibrinólise em pacientes do grupo submetido à cirurgia sem circuito extracorpóreo (n = 51)

		<i>Per</i>	<i>6h</i>	<i>48h</i>
PCR pré	cc	-0,05	-0,10	-0,15
	p	0,74	0,51	0,35
PCR pós	cc	*	-0,17	-0,09
	p	*	0,29	0,56
PCR 24h	cc	*	*	-0,23
	p	*	*	0,14
DD pré	cc	0,26	-0,01	0,02
	p	0,10	0,97	0,90
DD pós	cc	*	0,04	0,11
	p	*	0,79	0,48
DD 24h	cc	*	*	0,05
	p	*	*	0,76
Fib pré	cc	0,02	-0,08	-0,10
	p	0,88	0,63	0,51
Fib pós	cc	*	-0,25	-0,35
	p	*	0,11	0,02
Fib 24h	cc	*	*	-0,17
	p	*	*	0,28
PAI1 pré	cc	0,18	-0,21	-0,17
	p	0,26	0,17	0,27
PAI1 pós	cc	*	0,21	0,09
	p	*	0,19	0,55
PAI1 24h	cc	*	*	-0,06
	p	*	*	0,70
Plaquetas pré	cc	0,10	-0,28	-0,38
	p	0,53	0,07	0,01
Plaquetas pós	cc	*	-0,31	-0,43
	p	*	0,04	< 0,01
Plaquetas 24h	cc	*	*	-0,58
	p	*	*	< 0,01
Transfusão perioperatória	cc	0,38	-0,03	0,04
	p	0,01	0,84	0,80
Número de CHAd infundidas no perioperatório	cc	0,38	< 0,01	0,06
	p	0,01	0,97	0,71
Número de CHAd infundidas no pós-operatório	cc	*	0,22	0,34
	p	*	0,15	0,02

PCR, proteína C reativa; DD, dímero d; Fib, fibrinogênio; PAI1, inibidor da ativação do plasminogênio tipo 1; per, perioperatório; pós, após a cirurgia; 24h, 24h após a cirurgia; CC, coeficiente de correlação; p, nível de significância; Per, sangramento perioperatório; 6h, sangramento 6h após cirurgia; 48h, sangramento 48h após cirurgia; CHAd, concentrado de hemácias do adulto; * sem significado clínico.

Mostraram-se também significativas as correlações entre o fibrinogênio dosado imediatamente após a cirurgia no grupo sem CEC e o sangramento 48h após o procedimento (coeficiente de correlação = -0,35; $p = 0,02$). Também o dímero-D dosado imediatamente após a cirurgia (momento pós) correlacionou-se com o número de concentrados de hemácias transfundidos no período entre o momento após o término da cirurgia até a alta hospitalar, com coeficiente de correlação de 0,33 ($p = 0,03$). As demais correlações entre os marcadores de inflamação e hemostasia com o número de concentrados de hemácias transfundidos, tanto no perioperatório como no pós-operatório não foram significativas.

Com a finalidade de avaliar uma utilização em potencial de variáveis como marcadores precoces de sangramento, aplicamos o teste de curva ROC, utilizando as dosagens de plaquetas, dímeros-D, fibrinogênio, PAI-1 e PCR nos momentos pós e 24h após a cirurgia, considerando como padrão as mensurações de sangramento 6h e 48h. O marcador positivo foi aquele que se associou com o sangramento de 6h superior a 400 ml e sangramento de 48h superior a 1.000 ml.

Não houve significância estatística entre os marcadores dosados no momento imediatamente após a cirurgia, e o sangramento em 6h considerando a amostra inteira ou dividindo em grupos com e sem CEC.

O fibrinogênio dosado 24h após a cirurgia com CEC mostrou boa acurácia na determinação de sangramento elevado em 48h, com área sob a curva (ASC) de 0,747 ($p=0,015$). Os pacientes do grupo com CEC que tiveram sangramento superior a 1.000 ml nas primeiras 48h apresentaram uma dosagem de fibrinogênio 24h de 317 ± 27 mg/dL contra 405 ± 15 mg/dL entre aqueles com sangramento inferior a 1.000 ml.

Curva ROC - Fibrinogênio 24h, grupo com CEC

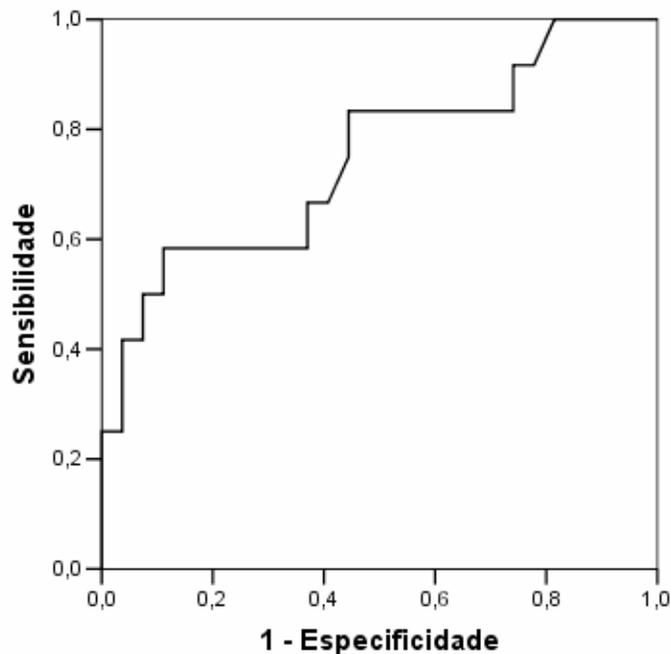


Gráfico 12 - Curva ROC do fibrinogênio sérico dosado 24h após cirurgia em pacientes do grupo com circulação extracorpórea (CEC) em pacientes com sangramento superior a 1.000 ml após 48h do procedimento

Já no grupo sem CEC, a contagem de plaquetas dosadas 24h após o procedimento apresentou uma ASC de 0,817 ($p=0,023$) em relação ao sangramento de 48h. Também nesse grupo, em pacientes com sangramento superior a 1.000 ml após 48h da RM, a média do fibrinogênio dosado foi de 195 ± 16 mg/dL no momento pós-RM, contra a média de 264 ± 14 mg/dL entre os demais que tiveram sangramento inferior a 1.000 ml. Embora exista correlação negativa desse sangramento com os valores de fibrinogênio do momento pós, a curva ROC não se mostrou significativa ($p = 0,08$). Quando analisados todos os pacientes da amostra, não houve variáveis com significância estatística.

5 DISCUSSÃO

Em nosso estudo, os pacientes submetidos à cirurgia com CEC tiveram maior quantidade de sangramento perioperatório com uma incidência similar de eventos adversos, em relação ao grupo sem CEC. Os marcadores bioquímicos demonstraram que pacientes de qualquer um dos grupos com e sem CEC exibiram uma resposta inflamatória refletida pelo aumento das concentrações séricas de proteína C reativa (PCR) e do fibrinogênio.

Além disso, pacientes do grupo com CEC tiveram maiores concentrações de dímero-D e inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1 (PAI-1) no pós-operatório imediato. Os resultados são compatíveis com um estado pró-trombótico precoce após a RM com CEC e podem ser consequência de maior perda sanguínea, do circuito extracorpóreo, ou de ambos.

Uma resposta inflamatória à RM já foi demonstrada em outros estudos^{66,67}. Optamos por estudar esta resposta pela dosagem da PCR, uma vez que a elevação de outros marcadores inflamatórios culmina por elevar a PCR. Além disso, também, acreditávamos que a resposta inflamatória seria similar entre os grupos, visto que se tratava de pacientes de baixo risco, observação esta constatada por outros pesquisadores⁶⁸⁻⁷¹.

Desse modo, nossos dados demonstram uma elevação da PCR precoce imediatamente após a cirurgia no grupo com CEC, porém, com aumento similar entre os grupos após 24 horas. Em outro estudo randomizado, mostrou-se que concentrações de PCR foram maiores após cirurgias com CEC⁷², porém, diferentes de nossa amostra, a elevação ocorreu de forma persistente.

Quanto à hemostasia, o circuito extracorpóreo ativa, tanto coagulação como fibrinólise^{73,74}. A ativação da cascata de coagulação pela via de contato leva à geração de trombina e plasmina⁷³. Assim, a exposição do sangue ao circuito extracorpóreo leva à formação de trombina que gera fibrina, ativando a fibrinólise e as plaquetas; como parte de uma resposta inflamatória sistêmica, a ativação do sistema de hemostasia pode levar à geração de microtrombos^{28,74}, apesar da heparinização plena.

Quando o sangue circulante entra em contato com esses microtrombos, o ativador de plasminogênio tecidual (t-PA) presente no sangue liga-se à fibrina dos mesmos e gera plasmina. A fibrinólise, que é a degradação de fibrina mediada pela plasmina, é associada à exposição do sangue ao circuito extracorpóreo e leva à geração de produtos de degradação de fibrina e do dímero-D³⁰. Em nosso estudo, o circuito extracorpóreo e a oclusão aórtica aumentaram a proteína de expressão PAI-1, que é o inibidor fisiológico do t-PA³⁰. Uma concentração elevada de PAI-1 em pacientes submetidos à cirurgia com CEC sugere que o balanço entre fibrinólise e trombose é favorável à trombose após cirurgia com CEC.

Nossos resultados são consistentes com os de outros pesquisadores que determinaram a concentração de marcadores de coagulação e fibrinólise após uso de CEC⁷⁵⁻⁷⁷. A concentração de trombina-antitrombina III e do dímero-D é elevada nas 24 horas após cirurgias torácicas sem CEC. Por outro lado, aumentos substanciais são demonstrados após o uso de CEC⁷⁵. Além disso, semelhantemente aos nossos achados, outros estudos demonstraram que pacientes operados com o auxílio extracorpóreo tiveram uma atividade aumentada de PAI-1⁷⁸.

Um dos mecanismos que media a resposta pró-coagulante do circuito extracorpóreo, é a ativação de monócitos pelo fator nuclear kB, ativado após a exposição do sangue à CEC⁷⁹. Outro estudo, com desenho diferente do nosso, porém, com resultados similares, comparou a cirurgia com e sem CEC com a cirurgia minimamente invasiva, demonstrando maior ativação perioperatória da coagulação e da fibrinólise no grupo com CEC e similar ativação tanto nos grupos minimamente invasivo e sem CEC⁸⁰.

Nosso estudo foi concordante com outros que observaram redução significativa na contagem de plaquetas⁷⁶. Em nossa amostra, 24h após a cirurgia, a CEC mostrou maior consumo de plaquetas, maior sangramento pós-operatório e não houve correlação entre a queda no número de plaquetas e o sangramento.

Por outro lado, mesmo apresentando maior conservação no número de plaquetas, a cirurgia sem CEC mostrou correlação entre sangramento

pós-operatório e queda no número de plaquetas. Embora em 24h após a RM, o número de plaquetas seja menor na RM com CEC, este não foi clinicamente relevante (com CEC = $161 \pm 8 \times 10^3/\text{ml}$ versus sem CEC = $176 \pm 7 \times 10^3/\text{ml}$).

Assim, acreditamos que, em pacientes de baixo risco e com tempo cirúrgico reduzido, o contato do sangue com a CEC ativa mediadores de inflamação e de coagulação, que levam a uma ativação plaquetária, destruição mecânica e à hemodiluição, o que justificaria a plaquetopenia nesse grupo.

Outro dado interessante é o fibrinogênio sérico, que se correlacionou com sangramento pós-operatório nos dois grupos separadamente e quando toda a amostra foi testada. Valores baixos de fibrinogênio, 12h após CEC ou imediatamente após cirurgia sem auxílio de CEC correlacionaram-se com sangramento 48h após a cirurgia. Além disso, independente do uso de CEC, a dosagem de fibrinogênio 24h após a RM apresentou uma significativa correlação com sangramento pós-operatório.

Assim, o fibrinogênio poderia ser utilizado como um marcador de sangramento nessa cirurgia, uma vez que os marcadores habituais de hemostasia (r-TP e r-TTPa) não se alteraram de forma significativa comparando o pré com o pós-operatório.

Além disso, deve ser lembrado que neste estudo a administração desproporcional de protamina e heparina entre os grupos (ou seja, o grupo

com CEC recebeu o dobro de heparina que o sem CEC) pode levar a alteração nos resultados comparativos entre esses dois grupos. Mas esta é a técnica-padrão utilizada no InCor e o delineamento planejado no estudo MASS III, e em outras pesquisas^{18,81}, também, foram desenhadas de maneira similar a nosso estudo. Outro fator que contribuiu para uma análise mais cautelosa foi a utilização de antifibrinolítico no pós-operatório⁸². Seu critério de administração ficava a cargo da rotina protocolar do serviço de cirurgia e hemoterapia da instituição. No entanto, seu uso não influenciou os dados e sua análise, visto que o número de pacientes que o utilizou foi pequeno, mesmo quando retiramos esses pacientes da amostra e analisamos somente aqueles que não fizeram uso desse medicamento, os resultados não se alteraram (os valores de p mantiveram-se significativos após a análise pela ANOVA).

Em resumo, em nosso estudo demonstramos que a RM com ou sem CEC leva a uma resposta inflamatória demonstrada pelas concentrações elevadas de PCR e fibrinogênio após o procedimento. Além disso, valores baixos de fibrinogênio após a cirurgia podem estar relacionados a um sangramento aumentado 48h após a cirurgia. Por último, concentrações elevadas de dímero-D e de PAI-1 na cirurgia estão relacionadas a um estado pró-trombótico, que pode ser consequente a um maior sangramento ou ao circuito extracorpóreo, ou a ambos.

6 CONCLUSÕES

A cirurgia de revascularização com e sem CEC leva a uma resposta inflamatória, demonstrada pelo aumento das concentrações de PCR e fibrinogênio 24h após o procedimento. A RM com CEC apresentou evidências bioquímicas de um estado pró-trombótico precoce após a cirurgia, porém, sem evidências do aumento do número de eventos trombóticos. O estado pró-trombótico pode ser consequência do circuito extracorpóreo, resposta compensatória ao sangramento ou a ambos em pacientes submetidos à cirurgia com CEC. Além disso, valores baixos de fibrinogênio sérico foram preditores de sangramento aumentado em ambos os grupos na amostra analisada.

TÉCNICA DE ELISA

A técnica de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) é um teste imunoenzimático que permite a detecção de marcadores específicos no sangue. O método consiste em detectar a presença de uma proteína-alvo no sangue com o auxílio de uma reação enzimática. Inicialmente, adsorve-se o anticorpo na placa de poliestireno, sendo o soro-teste adicionado logo após na placa. Isso permite que as proteínas-alvo específicas liguem-se aos anticorpos. Após um período de incubação, a placa é lavada para retirar as proteínas não ligadas. Para detectar as proteínas-alvo ligadas aos anticorpos, é utilizado um conjugado (anticorpo anti-imunoglobulina ligado quimicamente a uma enzima), que se unirá à proteína-alvo ligada à placa, obtendo-se o complexo anticorpo-proteína-anticorpo-enzima (técnica do sanduíche) (Figura 4). Após um período de incubação, a placa é lavada para retirar os conjugados não ligados e é adicionado um substrato cromogênico para detectar a presença da ligação antígeno-anticorpo. A intensidade da cor desenvolvida pelo substrato é proporcional à quantidade de anticorpos (específicos para o antígeno) presente no soro. Esta intensidade é analisada por um espectrofotômetro, permitindo uma análise quantitativa⁸³.

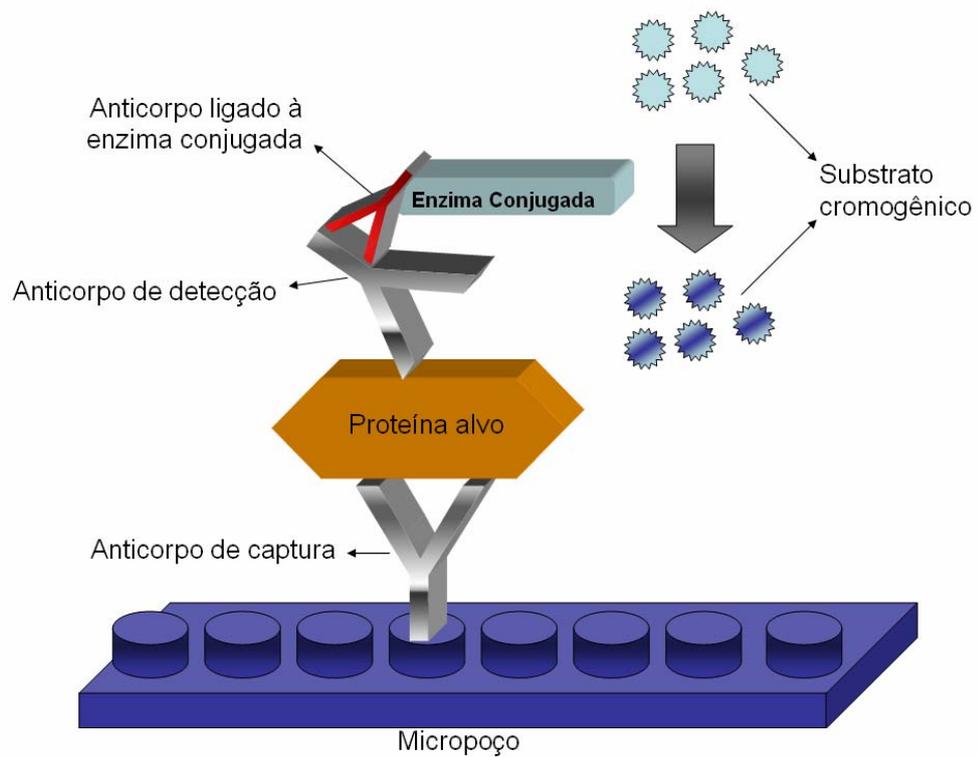


Figura 4 - Etapas do processo de incubação da técnica de ELISA Sanduíche

8 REFERÊNCIAS

1. Buffolo E, Andrade JCS, Branco JNR, Teles CA, Aguiar LF, Gomes WJ. Coronary artery bypass grafting without cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg.* 1966;61:63-6.
2. Buffolo E, Summo H, Aguiar LF, Teles CA, Branco JN. Myocardial revascularization in patients 70 years of age and older without the use of extracorporeal circulation. *Am J Geriatr Cardiol.* 1997;61:7-15.
3. Dallan LA, Lisboa LA, Platania F, Oliveira SA, Stolf NA. Single-lung ventilation with contralateral lung deflation: a simplified method for multivessel off-pump coronary artery bypass grafting. *Tex Heart Inst J.* 2007;34(2):175-7.
4. Benetti FJ, Naselli G, Wood M, Geffner L. Direct myocardial revascularization without extracorporeal circulation. *Chest.* 1991;100:312-15.

5. Puskas JD, Williams WH, Duke PG, Staples JR, Glas KE, Marshall JJ, Leimbach M, Huber P, Garas S, Sammons BH, McCall SA, Petersen RJ, Bailey DE, Chu H, Mahoney EM, Weintraub WS, Guyton RA. Off-pump coronary artery bypass grafting provides complete revascularization with reduced myocardial injury, transfusion requirements, and length of stay: a prospective randomized comparison of two hundred unselected patients undergoing off-pump versus conventional coronary artery bypass grafting. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2003;125:797-808.
6. Ascione R, Williams S, Lloyd CT, Sundaramoorthi T, Pitsis AA, Angelini GD. Reduced postoperative blood loss and transfusion requirement after beating heart coronary operations: a prospective randomized study. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2001;121:689-96.
7. De Oliveira SA, Lisboa LA, Dallan LA, Puig LB, Succi GM, Abreu Filho CA. Limited left thoracotomy for reoperative coronary artery bypass grafting without cardiopulmonary bypass for circumflex grafting in patients with patent internal thoracic artery graft. *Heart Surg Forum.* 2004 Jan 1;7(1):22-26.
8. Benetti F, Dillum MK, Stamou SC, Corso PJ. A xiphoid approach for minimally invasive coronary artery bypass surgery. *J Card Surg.* 2000 Jul-Aug;15(4):244-50.

9. Benetti FJ. Direct coronary surgery with saphenous vein bypass without either cardiopulmonary bypass or cardiac arrest. *J Cardiovasc Surg (Torino)*. 1985 May-Jun;26(3):217-22.
10. Boonstra PW, Grandjean JG, Mariani MA. Improved method for direct coronary grafting without CPB via anterolateral small thoracotomy. *Ann Thorac Surg*. 1997 Feb;63(2):567-9.
11. Wijeyesundera DN, Beattie WS, Djaiani G, Rao V, Borger MA, Karkouti K, Cusimano RJ. Off-pump coronary artery surgery for reducing mortality and morbidity: meta-analysis of randomized and observational studies. *J Am Coll Cardiol*. 2005 Sep 6;46(5):872-82.
12. Sabik JF, Gillinov AM, Blackstone EH, Vacha C, Houghtaling PL, Navia J, Smedira NG, McCarthy PM, Cosgrove DM, Lytle BW. Does off-pump coronary surgery reduce morbidity and mortality? *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2002;124:698-707.
13. Wijeyesundera DN, Beattie WS, Djaiani G, Rao V, Borger MA, Karkouti K, Cusimano RJ. Off-pump coronary artery surgery for reducing mortality and morbidity: meta-analysis of randomized and observational studies. *J Am Coll Cardiol*. 2005 Sep 6;46(5):872-82.

14. Edmunds LH Jr. Why cardiopulmonary bypass makes patients sick: strategies to control the blood-synthetic surface interface. *Adv Card Surg.* 1995;6:131-67.
15. King RC, Reece TB, Hurst JL, Shockey KS, Tribble CG, Spotnitz WD, Kron IL. Minimally invasive coronary artery bypass grafting decreases hospital stay and cost. *Ann Surg.* 1997 Jun;225(6):805-9.
16. Brown PP, Kugelmass AD, Cohen DJ, Reynolds MR, Culler SD, Dee AD, Simon AW. The frequency and cost of complications associated with coronary artery bypass grafting surgery: results from the United States Medicare program. *Ann Thorac Surg.* 2008 Jun;85(6):1980-6.
17. Herwaldt LA, Swartzendruber SK, Zimmerman MB, Scholz DA, Franklin JA, Caldarone CA. Hemorrhage after coronary artery bypass graft procedures. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2003; 24(1):44-50.
18. Mariani MA, Gu YJ, Boonstra PW, Grandjean JG, van Oeveren W, Ebels T. Procoagulant activity after off-pump coronary operation: is the current anticoagulation adequate? *Ann Thorac Surg.* 1999; 67(5):1370-5.

19. Djukic Filimonovic J, Tulic C, Dzamic Z, Krivic B, Milkovic B, Markovic B, Hadzi Djokic J. Elevated plasma D-dimer as a predictor of postoperative complications after radical cystectomy. *Acta Chir Iugosl.* 2007; 54(4):93-6.
20. Modrau II, Iversen LL, Thorlacius-Ussing OO. Hemostatic alterations in patients with benign and malignant colorectal disease during major abdominal surgery. *Thromb Res.* 2001; 104(5):309-15.
21. Dahl OE. Cardiorespiratory and vascular dysfunction related to major reconstructive orthopedic surgery. *Acta Orthop Scand.* 1997; 68(6):607-14.
22. Mack MJ, Osborn JA, Shennib H. Arterial graft patency in coronary artery bypass grafting: what do we really know? *Ann Thorac Surg.* 1998; 66:1055-1059.
23. Khan NE, DeSouza A, Mister R, Flather M, Clague J, Davies S, Collins P, Wang D, Sigwart U, Pepper J. A randomized comparison of off-pump and on-pump multivessel coronary-artery bypass surgery. *N Engl J Med.* 2004; 350:21-28.
24. Izzat MB, Yim AP. Trouble-shooting in minimally invasive direct coronary artery bypass. *Lancet.* 1997;30;350(9078):665-6.

25. Paparella D, Yau TM, Young E. Cardiopulmonary bypass induced inflammation: pathophysiology and treatment. An update. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2002; 21(2):232-44.
26. Paparella D, Brister SJ, Buchanan MR. Coagulation disorders of cardiopulmonary bypass: a review. *Intensive Care Med*. 2004;30(10): 1873-81.
27. Hsu Li-Chien. Biocompatibility in cardiopulmonary bypass. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 1997; 11:376–82.
28. Butler J, Rocker GM, Westaby S. Inflammatory response to cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg*. 1993; 55:552-9.
29. Asimakopoulos G, Smith PLC, Ratnatunga CP, Taylor KM. Lung injury and acute respiratory distress syndrome after cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg*. 1999; 68:1107-15.
30. Colman RW, Clowes AW, Goldhaber SZ, Marder VJ, George JN, eds. *Hemostasis and thrombosis: Basic principles and clinical practice*. 5th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2001.
31. Lee AJ, Fowkes GR, Lowe GD, Rumley A. Determinants of fibrin D-dimer in the Edinburgh Artery Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995; 15(8):1094-7.

32. Lee AJ, Fowkes FG, Lowe GD, Rumley A. Fibrin D-dimer, haemostatic factors and peripheral arterial disease. *Thromb Haemost.* 1995; 74(3):828-32.
33. Connaghan DG, Francis CW, Lane DA, Marder VJ. Specific identification of fibrin polymers, fibrinogen degradation products, and crosslinked fibrin degradation products in plasma and serum with a new sensitive technique. *Blood.* 1985; 65(3):589-97.
34. Righini M, Perrier A, De Moerloose P, Bounameaux H. D-Dimer for venous thromboembolism diagnosis: 20 years later. *J Thromb Haemost.* 2008; 6(7):1059-71.
35. Bounameaux H, Cirafici P, de Moerloose P, Schneider PA, Slosman D, Reber G, Unger PF. Measurement of D-dimer in plasma as diagnostic aid in suspected pulmonary embolism. *Lancet.* 1991; 26;337(8735):196-200.
36. Lippi G, Filippozzi L, Montagnana M, Salvagno GL, Guidi GC. Diagnostic value of D-dimer measurement in patients referred to the emergency department with suspected myocardial ischemia. *J Thromb Thrombolysis.* 2008; 25(3):247-50.

37. Whitaker AN, Rowe EA, Masci PP, Gaffney PJ. Identification of D dimer-E complex in disseminated intravascular coagulation. *Thromb Res.* 1980; 18(3-4):453-9.
38. Lippi G, Franchini M, Targher G, Favalaro EJ. Help me, Doctor! My D-dimer is raised. *Ann Med.* 2008; 3:1-12.
39. Kang J, Kambayashi J, Sakon M, Tsujinaka T, Mori T. Postoperative changes in hemostasis analyzed by the serial determination of fibrinopeptides and D-dimer. *Jpn J Surg.* 1989; 19(3):262-8.
40. Brenner B. Haemostatic changes in pregnancy. *Thromb Res.* 2004; 114(5-6):409-14.
41. Huber K. Plasminogen activator inhibitor type-1 (Part One): Basic mechanisms, regulation, and role for thromboembolic disease. *J Thromb Thrombolysis.* 2001; 11(3):183-93 (review).
42. Huber K. Plasminogen activator inhibitor type-1 (Part Two): Role for failure of thrombolytic therapy. PAI-1 Resistance as a potential benefit for new fibrinolytic agents. *J Thromb Thrombolysis.* 2001; 11(3):195-202 (review).
43. Huber K, Christ G, Wojta J, Gulba D. Plasminogen activator inhibitor type-1 in cardiovascular disease. *Thromb Res.* 2001; 103(1):S7-S19.

44. Tietz NW, ed. *Clinical Guide to Laboratory Tests*. N.W. Tietz, 3rd ed. Philadelphia, PA: W.B. Saunders Company; 1995.
45. Dixon JS, Bird HA, Sittton NG, Pickup ME, Wright V. C-reactive protein in the serial assessment of disease activity in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheum*. 1984; 13:39-44.
46. Dowling P, Cook S. *Immune events in demyelinating disease*. In Wolfgang F, Ellison GW, Stevens JG, Andrew JM, eds.: Multiple sclerosis. New York: Academic Press Inc., 1972. p.269-277.
47. Kindmark CO. The concentration of C-reactive protein in sera from healthy individuals. *Scand J Clin Lab Invest*. 1972; 29:407-411.
48. Kushner I. C-reactive protein in rheumatology. *Arthritis Rheum*. 1991; 34:1065-1068.
49. Macy EM, Hayes TE, Tracy RP. Variability in the measurement of C-reactive protein in healthy subjects: implications for reference interval and epidemiological applications. *Clin Chem*. 1997; 43:52-58.
50. Morley JJ, Kushner I. Serum C-reactive protein levels. *Ann N Y Acad Sci*. 1982; 389:406-417.

51. Ridker PM, Glynn RJ, Hennekens CH. C-reactive protein adds to the predictive value of total and HDL cholesterol in determining risk of first myocardial infarction. *Circulation*. 1998; 97:2007-2011.
52. Roberts WL, Sedrick R, Moulton L, Spencer A, Rifai N. Evaluation of four automated high-sensitivity C-reactive protein methods: Implications for clinical and epidemiological applications. *Clin Chem*. 2000; 46:461-468.
53. Schultz DR, Arnold PI. Properties of four acute phase proteins: C-reactive protein, serum amyloid A protein, glycoprotein, and fibrinogen. *Semin Arthritis and Rheum*. 1990; 20:129-147.
54. Shine B, de Beer FC, Pepys MB. Solid phase radiomunoassay for human C-reactive protein. *J Lab Clinica Chimica Acta*. 1981; 117:13-23.
55. Taubes G. Does inflammation cut to the heart of the matter? *Science*. 2002; 296:242-245.
56. Tracy RP, Lemaitre RN, Psaty BM, Ives DG, Evans RW, Cushman M, Meilahn EN, Kuller LH. Relationship of C-reactive protein to risk of cardiovascular disease in the elderly: results for the Cardiovascular Health Study and the Rural Health Promotion Project. *Arter Thromb Vasc Biol*. 1997; 17:1121-1127.

-
57. USA Center for Disease Control/National Institute of Health Manual. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 1984.
 58. Van Leeuwen M, Van Rijswijk MH. Acute phase proteins in monitoring inflammatory disorders. *Baillieres Clin Rheumatol*. 1994; 8:531-552.
 59. Pickart L. Fat metabolism, the fibrinogen/fibrinolytic system and blood flow: new potentials for the pharmacological treatment of coronary heart disease. *Pharmacology*. 1981; 23(5):271-80.
 60. Mosesson MW. Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost*. 2005; 3(8):1894-904.
 61. Feinbloom D, Bauer KA. Assessment of hemostatic risk factors in predicting arterial thrombotic events. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005; 25(10):2043-53.
 62. Lopes NH, Paulitsch Fda S, Gois AF, Pereira AC, Stolf NA, Dallan LO, Ramires JA, Hueb WA. Impact of number of vessels disease on outcome of patients with stable coronary artery disease: 5-year follow-up of the Medical, Angioplasty, and bypass Surgery study (MASS). *Eur J Cardiothorac Surg*. 2008; 33(3):349-54.

63. Hueb W, Lopes NH, Gersh BJ, Soares P, Machado LA, Jatene FB, Oliveira SA, Ramires JA. Five-year follow-up of the Medicine, Angioplasty, or Surgery Study (MASS II): a randomized controlled clinical trial of 3 therapeutic strategies for multivessel coronary artery disease. *Circulation*. 2007; 115(9):1082-9.
64. Hueb WA, Bellotti G, de Oliveira SA, Arie S, de Albuquerque CP, Jatene AD, Pileggi F. The Medicine, Angioplasty or Surgery Study (MASS): a prospective, randomized trial of medical therapy, balloon angioplasty or bypass surgery for single proximal left anterior descending artery stenoses. *J Am Coll Cardiol*. 1995; 26(7):1600-5.
65. Riffenburgh RH, ed. *Statistics in Medicine*. 1st ed, San Diego, CA: Academic Press; 1999.
66. Wan S, Arifi AA, Wan IY, Ng CS, Lee TW, Yim AP. Cytokine responses to myocardial revascularization on cardiopulmonary bypass: intermittent crossclamping versus blood cardioplegic arrest. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*. 2002; 8(1):12-7.
67. Wan IY, Arifi AA, Wan S, Yip JH, Sihoe AD, Thung KH, Wong EM, Yim AP. Beating heart revascularization with or without cardiopulmonary bypass: evaluation of inflammatory response in a prospective randomized study. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2004; 127(6):1624-31.

-
68. Gaudino M, Nasso G, Zamparelli R, Andreotti F, Burzotta F, Iacoviello L, Santarelli F, Lapenna E, Bruno P, Di Pietrantonio F, Schiavello R, Maseri A, Possati G. Inflammatory and fibrinolytic activation after coronary artery bypass with extracorporeal circulation. *Ital Heart J Suppl.* 2002; 3(6):646-51.
69. Fransen E, Maessen J, Dentener M, Senden N, Geskes G, Buurman W. Systemic inflammation present in patients undergoing CABG without extracorporeal circulation. *Chest.* 1998; 113(5):1290-5.
70. Kilger E, Pichler B, Goetz AE, Rank N, Welte M, Morstedt K, Vetter HO, Godje O, Schmitz C, Lamm P, Engelschalk E, Muehlbeyer D, Frey L. Procalcitonin as a marker of systemic inflammation after conventional or minimally invasive coronary artery bypass grafting. *Thorac Cardiovasc Surg.* 1998; 46(3):130-3.
71. Wan IY, Arifi AA, Wan S, Yip JH, Sihoe AD, Thung KH, Wong EM, Yim AP. Beating heart revascularization with or without cardiopulmonary bypass: evaluation of inflammatory response in a prospective randomized study. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2004; 127(6):1624-31.
72. Biglioli P, Cannata A, Alamanni F, Naliato M, Porqueddu M, Zanobini M, Tremoli E, Parolari A. Biological effects of off-pump vs. on-pump coronary artery surgery: focus on inflammation, hemostasis and oxidative stress. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2003; 24(2):260-9.

73. Schulze C, Conrad N, Schutz A, Egi K, Reichenspurner H, Reichart B, Wildhirt SM. Reduced expression of systemic proinflammatory cytokines after off-pump versus conventional coronary artery bypass grafting. *Thorac Cardiovasc Surg.* 2000; 48(6):364-9.
74. Lo B, Fijnheer R, Castigliengo D, Borst C, Kalkman CJ, Nierich AP. Activation of hemostasis after coronary artery bypass grafting with or without cardiopulmonary bypass. *Anesth Analg.* 2004; 99:634-40.
75. Vanek T, Jares M, Snircova J, Maly M. Fibrinolysis in coronary artery surgery: detection by thromboelastography. *Interact CardioVasc Thorac Surg.* 2007; 6:700-704.
76. Paparella D, Galeone A, Venneri MT, Coviello M, Scrascia G, Marraudino N, Quaranta M, Schinosa LLT, Brister SJ. Activation of the coagulation system during coronary artery bypass grafting: comparison between on-pump and off-pump techniques. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2006; 131:290-7.
77. Wippermann J, Albes JM, Hartrumpf M, Kaluza M, Vollandt R, Bruhin R, Wahlers T. Comparison of minimally invasive closed circuit extracorporeal circulation with conventional cardiopulmonary bypass and with off-pump technique in CABG patients: selected parameters of coagulation and inflammatory system. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2005; 28(1):127-32.

78. Casati V, Gerli C, Franco A, Della Valle P, Benussi S, Alfieri O, Torri G, D'Angelo A. Activation of coagulation and fibrinolysis during coronary surgery: on-pump versus off-pump techniques. *Anesthesiology*. 2001; 95(5):1103-9.
79. Hunt BJ, Parratt RN, Segal HC, Sheikh S, Kallis P, Yacoub M. Activation of coagulation and fibrinolysis during cardiothoracic operations. *Ann Thorac Surg*. 1998; 65(3):712-8.
80. Morgan EN, Pohlman TH, Vocelka C, Farr A, Lindley G, Chandler W, Griscavage-Ennis JM, Verrier ED. Nuclear factor kappaB mediates a procoagulant response in monocytes during extracorporeal circulation. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2003; 125(1):165-71.
81. Englberger L, Immer FF, Eckstein FS, Berdat PA, Haeberli A, Carrel TP. Off pump coronary bypass operation does not increase procoagulant and fibrinolytic activity: preliminary results. *Ann Thorac Surg*. 2004; 77:1560-6.
82. Casati V, Della Valle P, Benussi S, Franco A, Gerli C, Baili P, Alfieri O, D'Angelo A. Effects of tranexamic acid on postoperative bleeding and related hematochemical variables in coronary surgery: Comparison between on-pump and off-pump techniques. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2004; 128(1):83-91.

83. Voller A, Bartlett A, Bidwell DE. Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. *J Clin Pathol.* 1978; 31:507-520.