

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS**

**EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO E AVALIAÇÃO DE MARCADORES DE  
PERFUSÃO TECIDUAL E ESCORE DE RISCO EUROSCORE COMO PREDITORES DE  
MORBIMORTALIDADE EM PACIENTES COM FUNÇÃO VENTRICULAR NORMAL SUBMETIDOS A  
CIRURGIA DE REVASCULARIZAÇÃO DO MIOCÁRDIO COM CIRCULAÇÃO EXTRACORPÓREA.**

**MARCOS ANTONIO CANTERO**

**Dourados – MS  
2016**

**MARCOS ANTONIO CANTERO**

**EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO E AVALIAÇÃO DE MARCADORES DE  
PERFUSÃO TECIDUAL COMO PREDITORES DE MORBIMORTALIDADE EM PACIENTES  
SUBMETIDOS A CIRURGIA DE REVASCULARIZAÇÃO DO MIOCÁRDIO COM CIRCULAÇÃO  
EXTRA-CORPORÊA**

Dissertação apresentada à Universidade  
Federal da Grande Dourados – Faculdade  
de Ciências da Saúde, para obtenção do  
Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Pablo Christiano  
Barboza Lollo.

Co-Orientador: Prof. Dr. Marcio Eduardo  
de Barros.

**Dourados – MS  
2016**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).**

C229p Cantero, Marcos Antonio.  
Proteínas chaperonas como preditoras de morbimortalidade em pacientes submetidos a cirurgia de revascularização do miocárdio com circulação extracorpórea. / Marcos AntonioCantero. – Dourados, MS : UFGD, 2016.  
60f.

Orientador: Prof. Dr. Pablo Christiano Barboza Lollo.  
Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) –  
Universidade Federal da Grande Dourados.

1. HeatShockProteins. 2. Revascularização miocárdica. 3.  
Circulação extracorpórea.I. Título.

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.**

**©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.**



**UFGD**

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO

MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

---

ATA DA DEFESA DE **DISSERTAÇÃO DE MESTRADO** APRESENTADA PELO CANDIDATO **MARCOS ANTONIO CANTERO**, ALUNO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS DA SAÚDE ÁREA DE CONCENTRAÇÃO “FARMACOLOGIA”, REALIZADA NO DIA 14 DE SETEMBRO DE 2016.

Ao décimo quarto dia do mês de setembro do ano de dois mil e dezesseis (14/09/2016), às 9h30min, em sessão pública, realizou-se, no Auditório da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Grande Dourados, a Defesa de Dissertação de Mestrado intitulada “**Expressão de proteínas de choque térmico e avaliação de marcadores de perfusão tecidual como preditores de morbimortalidade em pacientes submetidos a cirurgia de revascularização do miocárdio com circulação extra-corpórea**” apresentada pelo mestrando **MARCOS ANTONIO CANTERO**, do Programa de Pós-Graduação Mestrado em Ciências da Saúde, à Banca Examinadora constituída pelos professores **Dr. Pablo Christiano Barboza Lollo** (Presidente/orientador), **Dra. Priscila Neder Morato** (membro titular/Externo), **Dr. Fábio Juliano Negrão** (membro titular/Programa) e **Dr. Mário Sérgio Vaz da Silva** (membro titular/Programa). Iniciada sessão, a presidência deu a conhecer ao candidato e aos integrantes da Banca as normas a serem observadas na apresentação da Dissertação. Após o candidato ter apresentado a sua Dissertação, os componentes da Banca Examinadora fizeram suas arguições, que foram intercaladas pela defesa do candidato. Terminadas as arguições, a Banca Examinadora, em sessão secreta, passou aos trabalhos de julgamento, tendo sido o candidato considerado **APROVADO**, fazendo *jus* ao título de **MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Dourados, 14 de setembro de 2016.



## AGRADECIMENTOS

Ao Deus da misericórdia por demonstrar Seu amor em todas as circunstâncias.

Ao Professor Doutor Pablo Christiano Lollo, meu orientador, pelo conhecimento e sabedoria que permitiu lidar com precário aluno.

Ao Professor Doutor Marcio Eduardo de Barros, meu orientador e líder nato, que me introduziu a investigação científica.

Ao minha companheira de vida, Giselle Galego Ramos, por estar ao meu lado e apoiar-me em todos os momentos.

À Mariana, Ana Clara e Murilo, por ser meu legado ao mundo.

Aos meus pais Maria Rosa e Valdemar Cantero e este vivo em memória e eternizado em nossos sentimentos.

Ao meu irmão Elder Vinicius, pelo seu apoio sempre incondicional.

À minha família de trabalho Roberto, Luís e João, que proporcionaram o tempo para que me dedicasse a este trabalho.

Aos colegas do Hospital Evangélico Sr. E Sra. Goldsby King de Dourados, por me permitir doar-me à Medicina e aos pacientes.

Aos alunos e colegas da UFGD razão maior de nosso empenho em pesquisar.

## DEDICATÓRIA

*A todos os pacientes que pudemos de algum modo estar em suas vidas.*

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	14
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	14
2.1. A doença coronariana.....	14
2.2. Revascularização do miocárdio com circulação extracorpórea.....	15
2.3. O Sistema Europeu para Avaliação do Risco em Cirurgia Cardíaca (EuroSCORE).....	12
2.4. Métodos de Avaliação da perfusão tecidual .....	16
2.4.1. Exame físico .....	16
2.4.2. Medidas hemodinâmicas – Macrohemodinâmica .....	16
2.4.3. Marcadores metabólicos celulares – Microhemodinâmica .....	17
2.4.3.1. Lactato.....	17
2.4.3.2. Excesso de bases (BE) .....	17
2.5. Reação inflamatória e CEC.....	18
2.6. HSP ( <i>Heat Shock Proteins</i> ).....	19
2.7. Potencial biomarcador das HSP para doença cardíaca .....	19
2.8. Circulação extracorpórea e HPS.....	20
3. OBJETIVO.....	22
4. REFERÊNCIAS.....	22
5. ANEXO 1: Artigo .....	28
6. ANEXO 2: Sistema Europeu de Avaliação de Risco em Cirurgia Cardíaca (EuroSCORE): fatores de risco e pontuação atribuída .....	44
7. ANEXO 3: As categorias do EuroSCORE e a classificação de risco do paciente .....	45
8. ANEXO 4: Normas de publicação na Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular (BJCVS -- Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery) .....	46
9. ANEXO 5: Parecer favorável à realização da pesquisa com seres humanos .....	51
10. ANEXO 6: Íntegra do Termo de Consentimento Livre e Consentido .....	52



## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

**Figure 1** Receiver-operating characteristic curves to predict complications. (A), ROC curves of EuroSCORE for diagnosing complication.

**Figure 2** Receiver-operating characteristic curves to predict complications. (A), ROC curves of LACTATO for diagnosing complication.

**Figure 3** Receiver-operating characteristic curves to predict complications. ROC curves of HSP 25 for diagnosing complication.

**Figure 4** Receiver-operating characteristic curves to predict complications. ROC curves of HSP 60 for diagnosing complication.

**Figure 5** Receiver-operating characteristic curves to predict complications. ROC curves of HSP 70 for diagnosing complication.

**Figure 6** Receiver-operating characteristic curves to predict complications. ROC curves of HSP 70 soro for diagnosing complication.

**Figure 7** The receiver operating characteristic (ROC) curve of the study group to compare the tradeoffs between the true-positive rate and the false-positive rate of increase of all HSPs levels to identify all the diagnostic discrimination limits for each markers (HSP 25, HSP 60, HSP70, HSP 70 SORO, HSP 90).

**Tabela 1** Comparação dos dados do pós-operatório de pacientes submetidos à RM com CEC com evolução não complicada e complicada.

**Tabela 2** Análise estatística dos marcadores estudados

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ALT – Alanina aminotransferase

ASC – Área de superfície corporal

AST – Aspartato transaminase

ATP – Adenosina Trifosfato

BE – Excesso de base

BIA – Balão Intra-aórtico

CABG – *Coronary artery bypass grafting*

CEC – circulação extra corpórea

CO<sub>2</sub> – Dióxido de carbono

CRM – Cirurgia de revascularização do miocárdio

DC – débito cardíaco

DDT – dithiothreitol

ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

EuroScore – *European System for Cardiac Operative Risk Evaluation*

FCS-UFGD – Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde da Universidade Federal da Grande Dourados

FEVE – Fração de Ejeção do Ventrículo Esquerdo

FiO<sub>2</sub> – Fração inspirada de oxigênio

γGT – Gama glutamil transpeptidase

H<sup>+</sup> – íon hidrogênio

HSPs – *Heat Shock Proteins*

HT – Hematócrito

kDa – Quilodalton

PCO<sub>2</sub> – Pressão Parcial de Dióxido de Carbono

PMSF – *Phenyl-methyl-sulfonyl fluoride* (inibidor de protease)

RISO – Resposta Inflamatória Sistêmica Orgânica

SIRS – *Systemic Inflammatory Response Syndrome*

UFGD – Universidade Federal da Grande Dourados

UNICAMP – Universidade de Campinas

TCA – Tempo de Coagulação Ativada

TRL2 – *Toll-like Receptor 2*

UTI – Unidade de Terapia Intensiva

## RESUMO

A cirurgia de revascularização do miocárdio com circulação extracorpórea (CRM) tem permitido, durante as últimas décadas, aumento da sobrevida, melhora dos sintomas e da qualidade de vida dos portadores de doença coronariana, atualmente considerada uma das principais causas de mortalidade em países desenvolvidos. Ao uso desse método cirúrgico, contudo, é atribuída uma complexa resposta inflamatória sistêmica orgânica, que muito contribui para vários efeitos adversos no pós-operatório. Com o propósito de avaliar a expressão das *heat shock proteins* (HSPs) associada à de marcadores de hipoperfusão tecidual, como lactato arterial, e ao escore de risco EuroSCORE como preditores de morbimortalidade nos pacientes com função ventricular preservada submetidos a essa cirurgia, foi realizado um estudo prospectivo e observacional entre maio e julho de 2016 com amostra de 46 pacientes sem disfunção ventricular submetidos a revascularização miocárdica com circulação extracorpórea, divididos em dois grupos: complicados e não complicados. Foram avaliados o EuroSCORE, a dosagem de lactato no sangue arterial periférico e a expressão das HSPs 25,60,70,90 no músculo miocárdico e HSP 70 no sangue venoso periférico, bem como suas correlações com os pacientes complicados. A análise estatística mostrou que o grupo com evolução complicada apresentou valores maiores no EuroSCORE; o lactato arterial embora significativamente maior no grupo com evolução complicada, não se revelou preditor independente para essa categoria de pacientes. As proteínas HSPs 25,60,70 apresentaram-se expressivamente aumentadas no grupo de pacientes não complicados, e valores modestos no outro grupo, sendo a mesma a expressão da HSP 70 no sangue periférico. A HSP 25, com excelente poder de discriminação de complicações, se revelou um preditor independente de proteção. A HSP 90 não se provou fator de proteção para os pacientes não complicados.

Nesse estudo, portanto, as proteínas da família chaperone (HSPs 25,60,70) puderam ser consideradas preditores independentes de evolução complicada em pacientes sem disfunção ventricular submetidos a revascularização do miocárdio com CEC.

Palavras chave: Heat Shock Proteins, revascularização miocárdica, circulação extra corpórea.

## ABSTRACT

Coronary artery bypass grafting with cardiopulmonary bypass (CABG) has allowed over the last decades, increased survival, improvement in symptoms and quality of life of patients with coronary disease, currently considered one of the leading causes of mortality in developed countries. The use of this surgical method, however, is assigned a complex organic systemic inflammatory response, which greatly contributes to various adverse effects in the postoperative period. In order to evaluate the expression of heat shock proteins (HSPs), associated with the tissue hypo perfusion markers, such as blood lactate, and risk score EuroSCORE as mortality predictors in patients with preserved ventricular function undergoing this surgery, there was a prospective observational study between May and July 2016 with a sample of 46 patients without ventricular dysfunction undergoing coronary artery bypass grafting with cardiopulmonary bypass, divided into two groups: complicated and uncomplicated. EuroSCORE were evaluated lactate levels in the peripheral arterial blood and the expression of HSPs 25,60,70,90 in the myocardial muscle and HSP 70 in the peripheral venous blood, and their correlations with complicated patients. Statistical analysis showed that the group with complicated evolution showed higher values in the EuroSCORE; the blood lactate although significantly higher in patients with complicated evolution, has not proved an independent predictor for this category of patients. HSPs 25, 60, 70 proteins showed up significantly increased in the group of patients uncomplicated and modest values in the other group, being the same HSP 70 expression in peripheral blood. HSP 25, with great power of discrimination complications, proved an independent predictor of protection. HSP 90 was not proven protecting factor for uncomplicated patients.

**Keywords:** Heat Shock Proteins, coronary artery bypass, extracorporeal circulation body, predictors.

## **1. INTRODUÇÃO**

A cirurgia de revascularização do miocárdio (CRM) tem permitido, durante as últimas décadas, que os pacientes com doença aterosclerótica coronariana melhorem a sobrevida, seus sintomas e sua qualidade de vida [1]. A partir da metade da década de 1990, os esforços se concentraram nas formas de reduzir as complicações e tornar a CRM menos invasiva. A circulação extracorpórea (CEC) induz a resposta inflamatória sistêmica por meio da ativação do sistema complemento, principalmente pela via alternativa induzida pelo contato do sangue com a superfície do circuito de extracorpórea, desencadeando a liberação de mediadores inflamatórios como a interleucina 1, interleucina 6, fator de necrose tumoral responsáveis pela resposta inflamatória sistêmica.

A identificação de marcadores que possam prever a morbimortalidade pós-operatória por meio da detecção precoce de diminuição de perfusão tecidual pode prever complicações e trazer a oportunidade de estabelecer o tratamento precoce aprimorando os resultados cirúrgicos e minimizando suas complicações. Contudo, marcadores clássicos de perfusão tecidual como saturação venosa mista, excesso de bases e lactato arterial podem sofrer influências de fatores relacionados à CEC e à hipotermia e não serem preditores seguros de evolução desfavorável na cirurgia cardiovascular.

Estresse induzido pelos procedimentos de uma cirurgia cardíaca induz em resposta um aumento das proteínas do choque HSPs [2]. Deste modo, a avaliação da expressão das HSPs e a sua correlação com outros marcadores clássicos de perfusão tecidual poderia auxiliar a prever a morbimortalidade nos pacientes submetidos à cirurgia cardíaca e antever informações significantes para o manejo Peri operatório.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 A Doença Coronariana**

As doenças cardiovasculares são as principais causas de mortalidade no mundo. Como um estágio final das doenças cardiovasculares, insuficiência cardíaca torna-se mais prevalente ano a ano, por isso é muito importante o diagnóstico precoce e tratamento da insuficiência cardíaca [3].

Apesar dos imensos esforços desenvolvidos na prevenção da doença coronária aterosclerótica, esta tem constituído, durante as últimas décadas e nos países industrializados, a principal doença cardíaca do adulto. Além da sua alta prevalência, a importância da doença resulta igualmente do impacto social e econômico originado pela gravidade das suas consequências clínicas, pelo recurso frequente a sofisticados métodos auxiliares de diagnóstico e a terapêuticas paliativas, farmacológicas ou de revascularização, frequentemente requerendo o internamento hospitalar. Para, além disso, a doença coronária constitui ainda uma das principais causas de mortalidade nos países mais desenvolvidos. Segundo dados recentemente publicados [4], as doenças do sistema cardiovascular são a

principal causa de morte no Brasil e, dentro destas, a doença cardíaca isquêmica representa a segunda causa, apenas ultrapassada pelo acidente vascular encefálico.

Na tentativa de reduzir este impacto negativo nas populações, as quatro últimas décadas foram testemunhas de um enorme esforço e progresso no tratamento cirúrgico da doença isquêmica cardíaca. A cirurgia de revascularização coronária é, ainda, e apesar do decréscimo provocado pela intervenção cardiológica percutânea, a principal intervenção realizada pelos centros de cirurgia cardíaca em todo o mundo desenvolvido.

## **2.2 Revascularização do miocárdio com circulação extracorpórea:**

A cirurgia de revascularização do miocárdio (CRM) tem permitido, durante as últimas décadas, que os pacientes com doença aterosclerótica coronariana melhorem a sobrevida, seus sintomas e sua qualidade de vida [5]. A partir da metade da década de 1990, os esforços se concentraram nas formas de reduzir as complicações e tornar a CRM menos invasiva. A circulação extracorpórea (CEC) induz a resposta inflamatória sistêmica por meio da ativação do sistema complemento, principalmente pela via alternativa induzida pelo contato do sangue com a superfície do circuito de extracorpórea, desencadeando a liberação de mediadores inflamatórios como a interleucina 1, interleucina 6, fator de necrose tumoral responsáveis pela resposta inflamatória sistêmica.

A revascularização miocárdica com CEC apresenta limitações importantes conhecidas dessa técnica. Revascularização miocárdica com CEC há duas décadas, apesar de um drástico aumento nos fatores de risco dos doentes, a morbidade e as complicações no pós-operatório têm diminuído significativamente. Essas melhorias são atribuídas aos avanços sistemáticos nas técnicas cirúrgicas, nas técnicas anestésicas e nas estratégias de proteção miocárdica [6,7]. Entretanto, as complicações neurológicas continuam a ser um risco para doentes submetidos à CEC. Contemporaneamente, o uso desse método ainda é reconhecido como principal causa de uma complexa resposta inflamatória sistêmica orgânica (RISO), que contribui bastante para vários efeitos adversos no pós-operatório, a saber, complicações renais, pulmonares ou neurológicas, hemorragias, entre outras [8].

## **2.3 O Sistema Europeu para Avaliação do Risco em Cirurgia Cardíaca (EuroSCORE)**

Para aferir a morbimortalidade na cirurgia cardíaca, diversos modelos de estratificação de risco têm sido idealizados [8, 9]. O Sistema Europeu para Avaliação de Risco em Cirurgia Cardíaca (EuroSCORE) foi idealizado em 1995, onde foram avaliados fatores de risco e mortalidade foram coletados de, submetidos consecutivamente à cirurgia cardíaca em 128 centros de oito países europeus[9]. Analisados 68 fatores de risco pré-operatórios e 29 operatórios que interferem na mortalidade hospitalar. Os diversos fatores de risco e suas relações foram avaliadas estatisticamente por análise univariada e de regressão logística. Foram identificados 17 fatores de risco reais e, para cada um deles, foi atribuído um escore (ANEXO 2) esta classificação de risco divide os pacientes em três grupos de risco: de baixo risco, de médio risco e de alto risco (ANEXO 3) [10, 11]. O EuroSCORE constitui um instrumento

simples e objetivo eficaz e seguro quando aplicado a populações não europeias[12]. No nosso meio sua aplicação como preditor de morbimortalidade pós-operatória foi reproduzível [13, 14]. Entretanto, devido à complexidade e à multiplicidade dos fatores envolvidos no período intra-operatório e pós-operatório, para melhor aquilatar o prognóstico, há necessidade de avaliação da perfusão tecidual por métodos simples e acessíveis podem oferecer informações complementares ao EuroSCORE.

## **2.4 Métodos de avaliação da perfusão tecidual**

### **2.4.1 Exame físico**

O exame físico constitui o método mais antigo e mais acessível para aferição da perfusão tecidual. Através da avaliação do nível de consciência, da inspeção da pele (pálida, fria e sudoreica nos quadros de baixo débito cardíaco ou quente e rubra nos estados vasodilatação como inflamatórios) e da quantificação da diurese, que podem inferir indiretamente a perfusão tecidual.

Qualquer método de aferição da perfusão tecidual busca a detecção precoce da diferença entre oferta e demanda de oxigênio, como principal fator preditor de sobrevida e incremento a estratificação de risco, com especial importância na estimativa do prognóstico.

Entretanto há limitação na aplicação destes métodos no período peri operatório da cirurgia cardíaca. Devido a anestesia e seus efeitos residuais a avaliação do nível de consciência pode estar obnubilada, que resulta em diminuição cognitiva mesmo no período pós-operatório pelos. A hipotermia gerada pelo estado pós-operatório de cirurgia cardiovascular dificulta a avaliação da perfusão da pele [15]. Como faz parte do protocolo o uso de manitol no período de circulação extracorpórea a quantificação da diurese fica prejudicada na avaliação da perfusão renal também pode não ser um método adequado para avaliar a perfusão renal. Portanto, outros métodos complementares de avaliação da perfusão tissular devem ser empregados no período peri operatório da cirurgia cardíaca.

### **2.4.2 Medidas hemodinâmicas - macrohemodinâmica**

A aferição da macrohemodinâmica através da aferição da frequência cardíaca e a pressão arterial é um dos métodos mais utilizados na avaliação da perfusão tecidual. Entretanto as alterações destas variáveis só se fazem presentes após a exaustão dos mecanismos compensatórios do organismo que se mostraram ineficazes na detecção precoce de alterações precoces da perfusão tecidual. A avaliação do débito cardíaco através da hipotensão arterial é pouco confiável [16] e a normalização da hipotensão não constitui a meta da ressuscitação dos estados de choque[17].



A hipoperfusão tecidual na cirurgia cardíaca pode ser concomitante a valores normais de frequência cardíaca e pressão arterial [18,19]. Não existe correlação direta entre o prognóstico dos pacientes e as variáveis hemodinâmicas [20,21].

A avaliação da perfusão tecidual através da aferição do débito cardíaco (DC) por meio do cateter de artéria pulmonar (CAP) também pode fornecer dados importantes quanto à perfusão tecidual. Entretanto as medidas dependem da qualificação dos profissionais e a interpretação correta dos dados obtidos [21]. Sendo indicado seu uso apenas nos casos complicados.

### **2.4.3 Marcadores Metabólicos Celulares - Microhemodinâmica**

#### **2.4.3.1 Lactato**

Quando o metabolismo aeróbico não pode ser efetuado por deficiência de alguns dos seus substratos ou do maquinário celular o organismo usa via do metabolismo anaeróbio e o seu produto final é o lactato produzido principalmente pela musculatura esquelética, intestino, cérebro e eritrócitos circulantes. Nas condições normais a produção aumentada de lactato está associada a um desequilíbrio entre a oferta e a demanda de oxigênio celular outros fatores como a inativação da piruvato desidrogenase impede a entrada do piruvato no Ciclo de Krebs e aumenta os níveis séricos de piruvato que leva ao aumento da produção de lactato. A gliconeogênese hepática transforma o lactato em glicose ou faz sua utilização como substrato energético primário [22]. O aumento das catecolaminas endógenas ou através da sua administração exógena aumenta o piruvato sérico que, por sua vez, aumenta o lactato. O seu aumento sérico pode ser resultado de diminuição na sua excreção ocasionadas por disfunção hepática e renal. A intoxicação por medicamentos como as biguanidas e o etanol, bem como defeitos congênitos, como a deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase e podem também levar à hiperlactatemia [23]. Devido aos fatores presentes citados acima inerentes a realização da cirurgia cardíaca como o uso de CEC, uso de drogas vasopressoras, fluxo contínuo sanguíneo a presença da hiperlactatemia é um achado comum no peri operatório.

Sendo assim a dosagem sérica do lactato constitui um dos melhores indicadores sistêmicos disponíveis para avaliação do metabolismo apesar de avaliar a gravidade do quadro clínico não possui especificidade na sua etiologia. A sua interpretação clínica deve ser criteriosa e a dosagem isolada não oferece benefício de avaliação prognóstica, porém a medida seriada e comparação dos seus valores fornecem uma sujeição importante da gravidade do caso [24,25].

Já foi demonstrado que, nas cirurgias cardiovasculares, quanto maior o aumento e menor o *clearance* dos níveis séricos de lactato, pior o prognóstico e maior a mortalidade imediata [26].

#### **2.4.3.2 Excesso de bases (BE)**

A gasometria arterial confere diversos valores como medidas do pH, da pressão parcial de dióxido de carbono ( $\text{PCO}_2$ ) e associado ao valor da hemoglobina pode ser cálculo de BE também é muito utilizado para a avaliação da perfusão tecidual. Há aumento de bases na alcalose metabólica ou a diminuição das mesmas na acidose metabólica. O intervalo de normalidade para a diferença de bases é de 2 mEq/L ou, em outras palavras: a diferença de bases oscila entre um déficit de -2,0 mEq/L e um excesso de +2,0 mEq/L. A diferença de bases calculada representa o número de miliequivalentes de bases que faltam ou que excedem para que o pH do sangue seja normal [27].

A hipoperfusão tecidual pode gerar déficit de base quando o metabolismo anaeróbico gera acidose. A interpretação destes valores, porém, deve ser meticulosa, uma vez que valores baixos de BE podem estar relacionado a infusão de soluções ricas em cloreto onde a acidose advém do excesso do íon cloro e não das bases produzidas pelo metabolismo anaeróbico secundário a hipoperfusão tecidual. Há evidências que correlacionam os valores de BE com a gravidade e o prognóstico em pacientes ressuscitados de trauma [28-30].

As medidas do BE em cirurgia cardíaca não são um consenso para prever o prognóstico. Existem estudos que correlacionam os valores baixos de BE com desfecho e aumento do tempo de permanência na UTI [31] e outros contradizem estes achados e afirmam que o BE em cirurgia cardíaca não se relacionam com pior prognóstico e a incidência maior de complicações [32].

## **2.5 Reação inflamatória e CEC:**

Ainda assim, apesar das significativas mudanças e melhorias dos sistemas de CEC, persistem complicações relacionadas a danos teciduais que afetam a morbimortalidade pós-cirúrgica [42]. O uso de CEC expõe o organismo a uma série de situações não fisiológicas, levando a alterações complexas da fisiologia normal do sistema circulatório. O contato do sangue com a superfície artificial do circuito, o fenômeno da isquemia-reperfusão, a hipoperfusão tecidual e a hemólise podem iniciar e agravar a resposta inflamatória. A CEC induz tanto o constituinte celular quanto o humoral do sistema imune, levando a alterações que, em um primeiro momento, se manifestam por uma resposta inflamatória exacerbada, mas que, depois, levam a um quadro de imunodeficiência temporária.

O desenvolvimento de estratégias para o controle do dano causado pela CEC no organismo é, portanto, essencial na tentativa de reduzir essas complicações e tem sido foco de diversas pesquisas experimentais e estudos clínicos. Assim sendo, durante a CEC, há aumento do número de neutrófilos, como também ativação dos mesmos que, de forma descontrolada, migram da circulação para os tecidos, promovendo diversos eventos regionais e sistêmicos. De forma análoga, estímulos derivados de moléculas de adesão celular promovem a migração e o deslocamento de plaquetas da circulação em direção a diversos tecidos [43,44].

Nas últimas décadas, alguns autores têm avaliado as repercussões bioquímicas e hormonais relacionadas com a CEC. No tocante aos eventos bioquímicos, considerável enfoque tem sido dado à concentração sérica de proteínas

totais, sobretudo albumina, uma vez que estas são essenciais na manutenção do equilíbrio coloidosmótico e na regulação da permeabilidade vascular de áreas nobres como a barreira hematoencefálica.

Portanto os fatores que podem ser provocados pela CEC como sangramento, hemodiluição, baixo débito cardíaco são relacionados hipóxia tissular e disfunções orgânica [45-47].

### **2.6 HSP (*Heat Shock Proteins*):**

Originalmente demonstrada em *Drosophilas*, a indução de proteínas de choque térmico (HSPs) em resposta a uma temperatura elevada é observada em muitos organismos, incluindo humanos. As HSPs constituem aproximadamente de 1-2% das proteínas de células não estressadas e de 4-6% de proteínas em células sob de situação de estresse. As de alto peso molecular (famílias HSP 100, 90, 70 e 60) são ATP-dependentes, enquanto que as de baixo peso molecular (15-30 kDa) agem independente de ATP [48].

Essas proteínas (HSPs) pertencem a uma família altamente conservada e presente em todas as células do organismo. Trata-se de um mecanismo natural de defesa endógena que é capaz de proteger e reparar danos causados. As condições de estresse podem exacerbar problemas na conformação de proteínas, perdendo a sua estrutura original e conseqüentemente sua função. As HSPs conseguem realizar o correto enovelamento e renovelamento de muitas proteínas que por algum motivo não foi realizada de maneira eficiente e correta, ou que perderam a sua estrutura. Mantêm os polipeptídeos em conformação adequada para sua translocação através das membranas nas organelas, modula interações proteína-proteína além de prevenir a agregação oriunda de interações intra e intermoleculares, ações essas conhecida como “*molecular chaperonas*”. São capazes de reparar proteínas danificadas, ou auxiliar em sua degradação caso o dano causado seja irreversível. Confere à célula uma maior tolerância e resistência contra uma variedade de agentes agressores, mantendo a integridade e estrutura celular, capaz de promover a sobrevivência de células durante períodos de estresse [49-51].

Durante os últimos anos, mais e mais informações se tornaram disponíveis sobre o papel específico das proteínas de choque térmico na proteção do coração. No início de 1988, Currie et al. pela primeira vez, informaram que o choque térmico do corpo inteiro em ratos está associada à melhora da recuperação funcional cardíaca após uma injúria isquêmica aplicada 24 horas mais tarde [52]. Sob a hipertrofia cardíaca fisiológica, o choque térmico melhora a tolerância isquêmica do coração de rato hipertrofiado devido a proteção da HSP [52,53].

### **2.7 Potencial biomarcador das HSPs para doenças cardíacas**

Devido À sua característica de responder a diversos estresses, inclusive cardiopatias, foi investigada a potencialidade das HSPs como um marcador de diagnóstico e prognóstico de doenças cardíacas [54-56].

Existe uma relação da expressão de HSP60 e seu potencial para detecção de doenças cardíacas [57,58]. Outros estudos mostram que níveis de HSP60 podem aumentar o risco de doenças cardíacas, podendo ser

considerado como um novo fator de risco familiar para estas patologias. Em estudo realizado com chineses, o polimorfismo do gene HSP60 foi significativamente associado com maior risco de doença arterial coronariana [59]. Elevadas concentrações de HSP60 foram associadas com a doença arterial coronariana e a sua gravidade [60] também possui correlação com insuficiência cardíaca e com eventos cardíacos adversos [61,62]. Entretanto outros estudos não conseguiram encontrar uma correlação entre o potencial papel da HSP60 no diagnóstico de doenças cardíacas[63] e em pacientes com doença coronária sua expressão se mostrou semelhantes aos pacientes não doentes[64].

Existe um papel da HSP70 e sua associação como biomarcador para patologias cardíacas. Foram associados níveis desta proteína significativamente maiores nos grupos com insuficiência cardíaca e esta expressão está relacionada com a gravidade da doença[65,66]. Observa-se que o aumento da expressão de HSP70 é algo comum na insuficiência cardíaca[67]. Outro fato que suporta sua utilização como diagnóstico/prognóstico de doenças cardíacas é a correlação entre HSP70 e marcadores de lesão como AST, ALT,  $\gamma$ GT e bilirrubina em pacientes com insuficiência cardíaca grave [68].

Outras HSPs também possuem correlação com insuficiência cardíaca. HSP27 pode ser utilizada como marcador de insuficiência cardíaca. Foi verificado que HSP20 e 27 estão envolvidas na insuficiência cardíaca congestiva, pois apresentam aumentos significativos na sua forma fosforilada na patologia [69]. Há aumento de HSP27 correlacionado com a progressão de insuficiência cardíaca em animais [70]. Em humanos, HSP27 mostrou-se significativamente mais alta em pacientes com doença cardíaca valvular podendo ser utilizado como marcador da patologia[71].

## **2.8 Circulação extra-corpórea e HPS:**

A cirurgia cardíaca com circulação extracorpórea provoca uma série de fatores de estresse ao miocárdio – incluindo isquemia, isquemia-reperfusão, resposta inflamatória, estresse oxidativo, que pode ser responsável pela morte celular[72,73]. A exposição do sangue a uma superfície não endotelizada da membrana de extracorpórea ativa o sistema complemento, a cascata da coagulação e a resposta imune humoral.

A circulação extracorpórea produz no organismo uma agressão e desencadeia uma série de reações e mudanças no equilíbrio fisiológico e, entre todas as reações existentes, a resposta inflamatória sistêmica do organismo (SIRS) é a mais complexa e nociva [74]. O contato do sangue com superfícies não endoteliais é o fator principal que desencadeia esta resposta. Existem ainda outros elementos de importantes como o período de isquemia e reperfusão tissular, hipotermia e as alterações no sistema de coagulação. Ela pode ocorrer sem envolver infecção e manifestar-se desde uma forma muito leve até uma forma exacerbada caracterizada por um quadro clínico que envolve discrasias sanguíneas, retenção de líquido no espaço intersticial, vasoconstrição, grande sensibilidade à infecções e insuficiência múltipla de órgãos, podendo levar à morte

Há um grande interesse em entender qual o papel das HSPs na resposta inflamatória que ocorre durante a cirurgia cardíaca com circulação extracorpórea [75].

Há múltiplos estudos que demonstram o aumento da produção de citocinas anti e pró-inflamatórias pós CEC [76-78].

Entre as HSPs a HSP 70 (com peso molecular de 70KDa) é a maior molécula chaperone intracelular, muitos esforços tem sido direcionados para avaliar sua capacidade de citoproteção do tecido cardíaco e cerebral submetido ao pré-condicionamento isquêmico [79].

Proteínas de citoproteção como as HSP 72 tem demonstrado funções de pré condicionamento isquêmico que diminuí a área de infarto [80]

Resultados experimentais sugerem que o efeito da hipotermia moderada durante a CEC envolve a regulação da família proteica das HSPs 70 com inibição da necrose mas não da apoptose [81-83].

Os níveis de HSP70 são relacionados com os danos teciduais e isquemia após cirurgia cardíaca, e que a mensuração pode se tornar uma vantagem de diagnóstico e prognóstico nestes casos [84].

A melhor compreensão do papel das HSPs na inflamação ocasionada pela circulação extracorpórea pode predizer a possibilidade e auxiliar a prevenir um evento adverso no pós-operatório imediato de cirurgia cardíaca.

### 3. OBJETIVO

Avaliar a expressão das *heat shock proteins* (HSPs) associada ao escore de risco EuroSCORE e marcadores de hipoperfusão tecidual clássicos como a pressão arterial, frequência cardíaca, lactato arterial, excesso de bases e saturação venosa mista de oxigênio como preditores de morbimortalidade nos pacientes com função ventricular preservada submetidos à revascularização do miocárdio com circulação extracorpórea.

### 4. REFERÊNCIAS

1. Yusuf S, Zucker D, Peduzzi P, Fisher LD, Takaro T, Kennedy JW, et al. Effect of coronary artery bypass graft surgery on survival: overview of 10-year results from randomized trials by the Coronary Artery Bypass Graft Surgery Trialist Collaboration. *Lancet*. 1994;344(8922):563-70.
2. Schmitt, JP et al. Kinetics of heat shock protein 70 synthesis in the human heart after cold cardioplegic arrest. *Eur J Cardiothorac Surg*, v. 22, n. 3, p. 415-20, Sep 2002. ISSN 1010-7940 (Print) 1010-7940.
3. Li, Z. et al. Heat shock protein 70 acts as a potential biomarker for early diagnosis of heart failure. *PloS one* [S.I.], v. 8, n. 7, p. e67964, 2013.
4. Organization for Economic Co-operation and Development - Health Data 2015: Statistics and indicators for 30 countries., Version 06/26/2015. <http://oecd.org/health/healthdata>.
5. Yusuf S, Zucker D, Peduzzi P, Fisher LD, Takaro T, Kennedy JW, et al. Effect of coronary artery bypass graft surgery on survival: overview of 10-year results from randomised trials by the Coronary Artery Bypass Graft Surgery Trialist Collaboration. *Lancet*. 1994;344(8922):563-70.
6. Bergsland J, Fosse E, Svennevig JL. Coronary artery bypass grafting with or without cardiopulmonary bypass. *Cardiac Surgery Today*. 2008;4:10-7.
7. Nimesh D, Desai ND, Pelletier MP, Mallidi HR, Christakis GT, Cohen GN, Fremes SE, et al. Why is off-pump coronary surgery uncommon in Canada? Results of a population-based survey of Canadian heart surgeons. *Circulation*. 2004;110(11 Suppl. 1):II7-12.
8. Berman M, Stamler A, Sahar G, Georghiou GP, Sharoni E, Brauner R, et al. Validation of the 2000 Bernstein-Parsonnet score versus the EuroSCORE as a prognostic tool in cardiac surgery. *Ann Thorac Surg*. 2006; 81(2):537-40.
9. Roques F, Nashef SA, Michel P, Gauducheau E, de Vincentiis C, Baudet E, et al. Risk factors and outcome in European cardiac surgery: analysis of the EuroSCORE multinational database of 19030 patients. *Eur J Cardiothorac Surg*. 1999; 15(6):816-22
10. Nashef SA, Roques F, Michel P, Gauducheau E, Lemeshow S, Salamon R. European system for cardiac operative risk evaluation (EuroSCORE). *Eur J Cardiothorac Surg*. 1999; 16(1):9-13.
11. Nilsson J, Algotsson L, Høglund P, Luhrs C, Brandt J. EuroSCORE predicts intensive care unit stay and costs of open heart surgery. *Ann Thorac Surg*. 2004; 78(5):1528-34.

12. Messaoudi N, De Cocker J, Stockman BA, Bossaert LL, Rodrigus IE. Is EuroSCORE useful in the prediction of extended intensive care unit stay after cardiac surgery? *Eur J Cardiothorac Surg.* 2009; 36(1):35-9.
13. Campagnucci VP, Pinto ESAM, Pereira WL, Chamlian EG, Gandra SM, Rivetti LA. EuroSCORE and the patients undergoing coronary bypass surgery at Santa Casa de Sao Paulo. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2008; 23(2):262-7.
14. Moraes F, Duarte C, Cardoso E, Tenório E, Pereira V, Lampreia D, et al. Avaliação do EuroSCORE como preditor de mortalidade em cirurgia de revascularização miocárdica no Instituto do Coração de Pernambuco. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2006; 21(1):29-34.
15. Doufas AG. Consequences of inadvertent perioperative hypothermia. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol.* 2003; 17(4):535-49.
16. Wo CC, Shoemaker WC, Appel PL, Bishop MH, Kram HB, Hardin E. Unreliability of blood pressure and heart rate to evaluate cardiac output in emergency resuscitation and critical illness. *Crit Care Med.* 1993; 21(2):218-23.
17. Vincent JL. End-points of resuscitation: arterial blood pressure, oxygen delivery, blood lactate, or...? *Intensive Care Med.* 1996; 22(1):3-5.
18. Kavarana MN, Frumento RJ, Hirsch AL, Oz MC, Lee DC, Bennett-Guerrero E. Gastric hypercarbia and adverse outcome after cardiac surgery. *Intensive Care Med.* 2003; 29(5):742-8.
19. Meregalli A, Oliveira RP, Friedman G. Occult hypoperfusion is associated with increased mortality in hemodynamically stable, high-risk, surgical patients. *Crit Care.* 2004; 8(2):R60-5.
20. Blow O, Magliore L, Claridge JA, Butler K, Young JS. The golden hour and the silver day: detection and correction of occult hypoperfusion within 24 hours improves outcome from major trauma. *J Trauma.* 1999; 47(5):964-9.
21. Dias FS, Rezende E, Mendes CL, Réa-Neto A, David CM, Schettino G, et al. Parte II: monitorização hemodinâmica básica e cateter de artéria pulmonar. *Rev Bras Ter Intensiva.* 2006; 18(1):63-77.
22. Akamine N, Silva CCLO, Silva E. Interpretação dos níveis de lactato. In: Knobel E, editor. *Terapia intensiva: hemodinâmica.* São Paulo: Atheneu; 2005. p. 137-42.
23. Pittard AJ. Does blood lactate measurement have a role in the management of the critically ill patient? *Ann Clin Biochem.* 1999; 36 ( Pt 4):401-7.
24. Bakker J, Gris P, Coffernils M, Kahn RJ, Vincent JL. Serial blood lactate levels can predict the development of multiple organ failure following septic shock. *Am J Surg.* 1996; 171(2):221-6.
25. Manikis P, Jankowski S, Zhang H, Kahn RJ, Vincent JL. Correlation of serial blood lactate levels to organ failure and mortality after trauma. *Am J Emerg Med.* 1995; 13(6):619-22.

26. Maillet JM, Le Besnerais P, Cantoni M, Nataf P, Ruffenach A, Lessana A, et al. Frequency, risk factors, and outcome of hyperlactatemia after cardiac surgery. *Chest*. 2003; 123(5):1361-6.
27. Brill SA, Stewart TR, Brundage SI, Schreiber MA. Base deficit does not predict mortality when secondary to hyperchloremic acidosis. *Shock*. 2002; 17(6):459-62.
28. Davis JW, Shackford SR, Mackersie RC, Hoyt DB. Base deficit as a guide to volume resuscitation. *J Trauma*. 1988; 28(10):1464-7.
29. Davis JW, Parks SN, Kaups KL, Gladen HE, O'Donnell-Nicol S. Admission base deficit predicts transfusion requirements and risk of complications. *J Trauma*. 1996; 41(5):769-74.
30. Kroezen F, Bijlsma TS, Liem MS, Meeuwis JD, Leenen LP. Base deficit based predictive modeling of outcome in trauma patients admitted to intensive care units in Dutch trauma centers. *J Trauma*. 2007; 63(4):908-13.
31. Hugot P, Sicsic JC, Schaffuser A, Sellin M, Corbineau H, Chaperon J, et al. Base deficit in immediate postoperative period of coronary surgery with cardiopulmonary bypass and length of stay in intensive care unit. *Intensive Care Med*. 2003; 29(2):257-61.
32. Bennett-Guerrero E, Panah MH, Bodian CA, Methikalam BJ, Alfarone JR, DePerio M, et al. Automated detection of gastric luminal partial pressure of carbon dioxide during cardiovascular surgery using the Tonocap. *Anesthesiology*. 2000; 92(1):38-45
33. Adroque HJ, Rashad MN, Gorin AB, Yacoub J, Madias NE. Arteriovenous acid-base disparity in circulatory failure: studies on mechanism. *Am J Physiol*. 1989; 257(6 Pt 2):F1087-93.
34. Lamia B, Monnet X, Teboul JL. Meaning of arterio-venous PCO<sub>2</sub> difference in circulatory shock. *Minerva Anesthesiol*. 2006; 72(6):597-604.
35. Weil MH, Rackow EC, Trevino R, Grundler W, Falk JL, Griffel MI. Difference in acid-base state between venous and arterial blood during cardiopulmonary resuscitation. *N Engl J Med*. 1986; 315(3):153-6.
36. Adroque HJ, Rashad MN, Gorin AB, Yacoub J, Madias NE. Assessing acidbase status in circulatory failure. Differences between arterial and central venous blood. *N Engl J Med*. 1989; 320(20):1312-6.
37. Zhang H, Vincent JL. Arteriovenous differences in PCO<sub>2</sub> and pH are good indicators of critical hypoperfusion. *Am Rev Respir Dis*. 1993; 148(4 Pt 1):867-71.
38. Mekontso-Dessap A, Castelain V, Anguel N, Bahloul M, Schauvliege F, Richard C, et al. Combination of venoarterial PCO<sub>2</sub> difference with arteriovenous O<sub>2</sub> content difference to detect anaerobic metabolism in patients. *Intensive Care Med*. 2002; 28(3):272-7.
39. Cavaliere F, Martinelli L, Guarneri S, Varano C, Rossi M, Schiavello R. Arterial-venous PCO<sub>2</sub> gradient in early postoperative hours following myocardial revascularization. *J Cardiovasc Surg (Torino)*. 1996; 37(5):499-503.
40. Marik PE, Bankov A. Sublingual capnometry versus traditional markers of tissue oxygenation in critically ill patients. *Crit Care Med*. 2003; 31(3):818-22.



42. Moura HV, Pomerantzeff PMA, Gomes WJ. Síndrome da resposta inflamatória sistêmica na circulação extracorpórea: papel das interleucinas. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2001;16(4):376-87.]
43. Chen YF, Tsai WC, Lin CC, Tsai LY, Lee CS, Huang CH, et al. Effect of leukocyte depletion on endothelial cell activation and transendothelial migration of leukocytes during cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg.* 2004;78(2):634-42.
44. Gu YJ, de Vries AJ, Boonstra PW, van Oeveren W. Leukocyte depletion results in improved lung function and reduced inflammatory response after cardiac surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1996;112(2):494-500.
45. Chiolero RL, Revelly JP, Leverve X, Gersbach P, Cayeux MC, Berger MM, et al. Effects of cardiogenic shock on lactate and glucose metabolism after heart surgery. *Crit Care Med.* 2000; 28(12):3784-91.
46. Ranucci M, De Toffol B, Isgro G, Romitti F, Conti D, Vicentini M. Hyperlactatemia during cardiopulmonary bypass: determinants and impact on postoperative outcome. *Crit Care.* 2006; 10(6):R167.
47. Mathew JP, Mackensen GB, Phillips-Bute B, Stafford-Smith M, Podgoreanu MV, Grocott HP, et al. Effects of extreme hemodilution during cardiac surgery on cognitive function in the elderly. *Anesthesiology.* 2007; 107(4):577-84.
48. Craig, E. A. The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nature*, v. 11, p. 579 – 592, 2010.
49. Diller, K. R. Stress protein expression kinetics. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, v. 8, p. 403 – 424, 2006.
50. Wischmeyer, PE. Glutamine and Heat Shock Protein Expression. *Nutrition*, v. 18, p. 225 – 228, 2002.
51. Santoro, MG. Heat Shock Factors and the control of the stress response. *Biochemical Pharmacology*, v. 59, p. 55 – 63, 2000.
52. Benjamin, IJ.; Mcmillan, DR. Stress (Heat Shock) Proteins : Molecular Chaperones in Cardiovascular Biology and Disease. *American Heart Association*, v. 83, p.117-132, 1998.
53. Nakai, A. et al. HSF4, a new member of the human heat shock factor family which lacks properties of a transcriptional activator. *Molecular and cellular Biology*, v. 17, n. 1, p. 469 – 481, 1997.
54. Currie, RW.; Karmazyn, M. Improved post-ischemic ventricular recovery in the absence of changes in energy metabolism in working rat hearts following heat-shock. *Journal of molecular and cellular cardiology [S.I.]*, v. 22, n. 6, p. 631-6, Jun 1990.
55. LI, Z. et al. Heat shock protein 70 acts as a potential biomarker for early diagnosis of heart failure. *PLoS One*, v. 8, n. 7, p. e67964, 2013. ISSN 1932-6203.
56. BONANAD, C. et al. Serum heat shock protein 60 in acute heart failure: a new biomarker? *Congest Heart Fail*, v. 19, n. 1, p. 6-10, Jan-Feb 2013. ISSN 1527-5299.
57. RAHSEPAR, A. A. et al. Anti-heat shock protein 27 titers and oxidative stress levels are elevated in patients with valvular heart disease. *Angiology*, v. 63, n. 8, p. 609-16, Nov 2012. ISSN 0003-3197.

58. ERES, A. et al. Complement activating antibodies against the human 60 kDa heat shock protein as a new independent family risk factor of coronary heart disease. *Eur J Clin Invest*, v. 32, n. 6, p. 405-10, Jun 2002. ISSN 0014-2972 (Print) 0014-2972.
59. ZHANG, X. et al. Elevated heat shock protein 60 levels are associated with higher risk of coronary heart disease in Chinese. *Circulation*, v. 118, n. 25, p. 2687-93, Dec 16 2008. ISSN 0009-7322.
60. HE, M. A. et al. Genetic variation in heat shock protein 60 gene and coronary heart disease in China: tagging-SNP haplotype analysis in a case-control study. *Cell Stress Chaperones*, v. 13, n. 2, p. 231-8, Summer 2008. ISSN 1355-8145.
61. JAFARZADEH, A.; ESMAEELI-NADIMI, A.; SHARIATI, M. High sensitivity C-reactive protein and immunoglobulin G against *Chlamydia pneumoniae* and chlamydial heat shock protein-60 in ischemic heart disease. *Iran J Immunol*, v. 5, n. 1, p. 51-6, Mar 2008. ISSN 1735-1383 (Print) 1735-1383.
62. NIIZEKI, T. et al. Relation of serum heat shock protein 60 level to severity and prognosis in chronic heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol*, v. 102, n. 5, p. 606-10, Sep 1 2008. ISSN 0002-9149 (Print)
63. BONANAD, C. et al. Serum heat shock protein 60 in acute heart failure: a new biomarker? *Congest Heart Fail*, v. 19, n. 1, p. 6-10, Jan-Feb 2013. ISSN 1527-5299.
64. LENZI, C. et al. *H pylori* infection and systemic antibodies to CagA and heat shock protein 60 in patients with coronary heart disease. *World J Gastroenterol*, v. 12, n. 48, p. 7815-20, Dec 28 2006. ISSN 1007-9327 (Print) 1007-9327.
65. ROTHENBACHER, D. et al. *Helicobacter pylori* heat shock protein 60 and risk of coronary heart disease: a case control study with focus on markers of systemic inflammation and lipids. *Atherosclerosis*, v. 156, n. 1, p. 193-9, May 2001. ISSN 0021-9150 (Print) 0021-9150.
66. GENTH-ZOTZ, S. et al. Heat shock protein 70 in patients with chronic heart failure: relation to disease severity and survival. *Int J Cardiol*, v. 96, n. 3, p. 397-401, Sep 2004. ISSN 0167-5273 (Print) 0167-5273.
67. GOMBOS, T. et al. Interaction of serum 70-kDa heat shock protein levels and HspA1B (+1267) gene polymorphism with disease severity in patients with chronic heart failure. *Cell Stress Chaperones*, v. 13, n. 2, p. 199-206, Summer 2008. ISSN 1355-8145.
68. WEI, Y. J. et al. Proteomic analysis reveals significant elevation of heat shock protein 70 in patients with chronic heart failure due to arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Mol Cell Biochem*, v. 332, n. 1-2, p. 103-11, Dec 2009. ISSN 0300-8177
69. DOHKE, T. et al. Proteomic analysis reveals significant alternations of cardiac small heat shock protein expression in congestive heart failure. *J Card Fail*, v. 12, n. 1, p. 77-84, Feb 2006. ISSN 1071-9164.

70. LAU, S. et al. Simultaneous overexpression of two stress proteins in rat cardiomyocytes and myogenic cells confers protection against ischemia-induced injury. *Circulation*, v. 96, n. 7, p. 2287-94, Oct 7 1997. ISSN 0009-7322 (Print)
71. RAHSEPAR, A. A. et al. Anti-heat shock protein 27 titers and oxidative stress levels are elevated in patients with valvular heart disease. *Angiology*, v. 63, n. 8, p. 609-16, Nov 2012. ISSN 0003-3197.
72. Parolari A, Alamanni F, Cannata A, Naliato M, Bonati L, Rubini P, et al. Off-pump versus on-pump coronary artery bypass: meta-analysis of currently available randomized trials. *Ann Thorac Surg*. 2003;76(1):37-40
73. Kaiser, Kron IL, Spray TL. *Mastery of cardiothoracic surgery*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. 14. Parolari A, Alamanni F, Cannata A, Naliato M, Bonati L, Rubini P, et al. Off-pump versus on-pump coronary artery bypass: meta-analysis of currently available randomized trials. *Ann Thorac Surg*. 2003;76(1):37-40.
74. Paparella D, Yau TM, Young E: Cardiopulmonary bypass induces inflammation: pathophysiology and treatment. An update. *Eur J Cardiothorac Surg* 2002; 21: 232 – 244.
75. Lin CY, Yang TL, Hong GJ, et al (2010) Enhanced intracellular heat shock protein 70 expression of leukocytes and serum interleukins release: comparison of on-pump and off-pump coronary artery surgery. *World J Surg*. doi:10.1007/s00268-010-0419-2
76. Bennett-Guerrero E - Systemic inflammation. In: *Cardiac Anesthesia*. Kaplan J A, ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1999: 297-318.
77. Souza MHL & Elias D O - Resposta inflamatória sistêmica à circulação extracorpórea. *Perfusion on line* www.perflin.com, 1999.
78. Silva SL - Síndrome de resposta inflamatória sistêmica pós circulação extracorpórea. In: *Temas atuais em circulação extracorpórea*. Teixeira Filho G F et al., eds. Sociedade Brasileira de Circulação Extra-corpórea, 1997: 90-7.
89. Wang S, Diller KR, Aggarwal SJ: Kinetics study of endogenous heat shock protein 70 expression. *J Biomech Eng* 2003; 125: 794 – 797.
80. Yellon DM, Latchman DS, Marber MS (1993) Stress proteins: an endogenous route to myocardial protection—fact or fiction? *Cardiovasc Res* 27:158–161
81. Donnelly TJ, Sievers RE, Vissern FL, et al: Heat shock protein induction in rat hearts. A role for improved myocardial salvage after ischemia and reperfusion? *Circulation* 1992; 85: 769 – 778.
82. Qing M, Vazquez-Jimenez JF, Schumacher K, ET al: Moderate hypothermia during cardiopulmonary bypass increases intramyocardial synthesis of heat shock protein 72. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002; 124: 724 – 731.
83. Vazquez-Jimenez JF, Qing M, Hermanns B, et al: Moderate hypothermia during cardiopulmonary bypass reduces myocardial cell damage and myocardial cell death related to cardiac surgery. *J Am Coll Cardiol* 2001; 38: 1216 – 1223
84. DYBDAHL, B. et al. Inflammatory response after open heart surgery: release of heat-shock protein 70 and signaling through toll-like receptor-4. *Circulation*, v. 105, n. 6, p. 685-90, Feb 12 2002. ISSN 0009-7322.

## 5. ANEXO 1 – ARTIGO

### INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares são as principais causas de mortalidade no mundo. Segundo dados recentemente publicados, a doença coronária constitui ainda uma das principais causas de mortalidade nos países mais desenvolvidos[1]. A cirurgia de revascularização do miocárdio com circulação extracorpórea (CRM) tem permitido, durante as últimas décadas, aumento da sobrevida, melhora dos sintomas e da qualidade de vida dos seus portadores[2]. O uso desse método cirúrgico, contudo, é considerado a principal causa de uma complexa resposta inflamatória sistêmica orgânica (RISO), que muito contribui para vários efeitos adversos no pós-operatório, a saber: hemorragias, complicações renais, pulmonares ou neurológicas, entre outras [3]. Ainda assim, apesar das significativas mudanças e melhorias dos sistemas de circulação extracorpórea (CEC), persistem complicações relacionadas ao danos teciduais, que afetam a morbimortalidade pós-cirúrgica [4]. Os distúrbios que podem ser provocados pela CEC, como sangramento, hemodiluição e baixo débito cardíaco são relacionados hipóxia tissular e disfunções orgânicas [5-7].

Para aferir a morbimortalidade na cirurgia cardíaca, diversos modelos de estratificação de risco tem sido idealizados [3, 8, 9, 10]. O EuroSCORE constitui um instrumento simples e objetivo, eficaz e seguro, quando aplicado a populações não europeias [11]. Em nosso meio, sua aplicação como preditor de morbimortalidade pós-operatória foi reproduzível [12, 13]. Entretanto, por serem múltiplos e complexos os fatores envolvidos nos períodos intra- e pós-operatório, para que o prognóstico seja mais seguramente aquilatado, é necessário avaliar a perfusão tecidual por métodos, idealmente simples e acessíveis, que possam oferecer informações complementares ao EuroSCORE.

O **lactato** constitui um dos melhores indicadores sistêmicos disponíveis para avaliação do metabolismo. A sua interpretação clínica, entretanto, deve ser criteriosa, pois, apesar de avaliar a gravidade do quadro clínico, é inespecífico e a dosagem isolada não oferece benefício de avaliação prognóstica. A medida seriada, contudo, e a comparação dos seus valores fornecem uma sujeição importante da gravidade do caso [14,15].

As *Heat Shock Proteins* (HSP) pertencem a uma família protéica denominada *chaperonas*, presentes em todas as células do organismo. Correspondem a aproximadamente 1-2% das proteínas constituintes de células não estressadas e em torno de 4-6% de proteínas em células sob de situação de estresse. As de alto peso molecular (famílias HSP 100, 90, 70 e 60) são ATP-dependentes, enquanto as de baixo peso molecular (HSP 20, 25 e 27) são independente de ATP [16]. Conferem à célula uma maior tolerância e resistência contra uma

variedade de agentes agressores, mantendo a integridade e estrutura celular, e são capazes de promover a sobrevivência de células durante períodos de estresse [17,18].

Por serem responsivas a diversos tipos de estresses, inclusive as cardiopatias, o potencial das HSPs como marcadores diagnóstico e prognóstico em doenças cardíacas já foi investigado [19-21]. Existe uma relação das expressões de HSPs 27 e 60 e seus potenciais para detecção de doenças cardíacas [22,23]. Elevadas concentrações de HSP 60 foram associadas com a doença arterial coronariana e à sua gravidade [22]. A HSP 27 mostrou-se significativamente mais alta em pacientes com doença cardíaca valvular podendo ser utilizado como marcador da patologia [22].

Há um grande interesse em se compreender qual o papel das HSPs na resposta inflamatória que ocorre durante a cirurgia cardíaca com circulação extra-corpórea [24]. Há múltiplos estudos que demonstram o aumento da produção de citocinas anti- e pró-inflamatórias pós CEC [25-27].

Dentre as HSPs, a HSP 70 é a maior molécula *chaperone* intracelular. Muitos esforços tem sido direcionados para avaliar sua capacidade de citoproteção do tecido cardíaco e cerebral submetido ao pré-condicionamento isquêmico [28]. Resultados experimentais sugerem que o efeito da hipotermia moderada durante a CEC envolve a regulação da família protéica da HSP 70 com inibição da necrose, mas não da apoptose [24, 29, 30]. Os níveis de HSP 70 são relacionados com os danos teciduais e isquemia após cirurgia cardíaca, e a sua mensuração pode se tornar uma vantagem de diagnóstico e prognóstico nestes casos [31].

A melhor compreensão do papel das HSPs na inflamação ocasionada pela circulação extracorpórea pode prever a possibilidade e auxiliar a prevenir um evento adverso no pós-operatório imediato de cirurgia cardíaca.

Nosso estudo tem por objetivo avaliar a expressão das HSP associada à de marcadores de hipoperfusão tecidual, como lactato arterial, e escore de risco EuroSCORE, como preditores de morbimortalidade nos pacientes com função ventricular preservada submetidos à revascularização do miocárdio com circulação extracorpórea.

## MÉTODOS

**Delineamento do estudo:** Foi realizado estudo prospectivo e observacional, entre maio de 2016 e julho de 2016, no Hospital Evangélico Dr. E Sra. Goldsbyking (Dourados-MS, Brasil). Os dados do intra-operatório foram coletados no centro cirúrgico e os do pós-operatório na unidade de terapia intensiva cirúrgica da mesma instituição. Os possíveis candidatos foram incluídos no estudo, mediante preenchimento do termo de consentimento livre e esclarecido, após serem oral e detalhadamente comunicados, pelo pesquisador, sobre a realização da pesquisa, seu caráter investigativo, seus objetivos, seus resultados e riscos.

Após a cirurgia, os pacientes foram acompanhados até a alta hospitalar e as complicações pós-operatórias durante o período de internação foram registradas. Os pacientes foram então, distribuídos de acordo com a evolução pós-operatória em dois grupos: (1) com evolução complicada e (2) com evolução não complicada. Evolução complicada foi definida como: óbito durante a internação ou nos primeiros trinta dias após a cirurgia e/ou presença de uma ou mais complicações pós-operatórias que resultaram em internação prolongada na UTI (tempo de internação superior a 4 dias). Todos os demais casos foram considerados como de evolução não complicada.

Os seguintes dados clínicos pré-operatórios foram registrados: EuroSCORE, idade, gênero, peso, área de superfície corporal (ASC), fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE), uso de balão intra-aórtico (BIA), uso de fármacos inotrópicos e/ou vasopressores, uso de nitroglicerina pré-operatória e história de cirurgias cardíacas pregressas.

O protocolo do estudo foi apreciado e aprovado pela Comissão de Ensino e Pesquisa da Pós-Graduação do FCS-UFGD e pelo Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa em seres humanos UFGD e UNICAMP devidamente registrado na plataforma Brasil (CAAE50344015.8.3001.5404).

Durante o período de estudo foram selecionados 93 pacientes que seriam submetidos à revascularização miocárdica com circulação extracorpórea. Após avaliação dos critérios de exclusão, 58 pacientes foram considerados elegíveis para o estudo. Dois pacientes não assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido e 4 pacientes foram excluídos por perda de dados. Assim, foram estudados 46 pacientes que preencheram os critérios abaixo citados.

**Critérios de inclusão:** Foram incluídos no estudo pacientes adultos, sem disfunção ventricular esquerda, programados para serem submetidos à cirurgia de revascularização miocárdica isolada com circulação extracorpórea. Foram excluídos pacientes portadores de insuficiência renal crônica ou aguda (creatinina sérica  $\geq 1,4$  g/dL), insuficiência hepática, diabetes mellitus descompensado, doenças pulmonares (doença pulmonar obstrutiva crônica ou cirurgias pulmonares prévias), doenças neurológicas (acidente vascular encefálico, portadores de demências ou psicoses) e pacientes com história de febre ou infecção recente (até uma semana anterior à cirurgia), presença de choque cardiogênico ou complicações mecânicas de infarto, fração de ejeção alterada ( $< 55\%$ ) e não aceitação do método pelo paciente.

**Complicações pós-operatórias:** As complicações pós-operatórias avaliadas foram: tempo de internação hospitalar prolongado (definido como alta hospitalar após o décimo dia de pós-operatório); tempo de internação na UTI prolongado (definido como alta da UTI após o quarto dia de pós-operatório); tempo de intubação traqueal prolongado (definido como ventilação mecânica por mais de 6 horas após a admissão na UTI ou necessidade de reintubação traqueal); complicações neurológicas (déficit neurológico focal ou global documentado em 48 horas após a cirurgia ou *delirium*); complicações infecciosas (infecção de ferida

operatória, mediastinite, pneumonia, infecção de trato urinário e/ou sepse de foco indefinido, de acordo com normas estabelecidas pela comissão de controle de infecção hospitalar); baixo débito cardíaco (definido como índice cardíaco menor que 2,2 L/min/m<sup>2</sup> ou dificuldade para desmame de medicações inotrópicas após 24 horas de pós-operatório ou necessidade de uso de balão intra-aórtico); arritmias (presença de arritmia com necessidade de uso de antiarrítmicos e/ou necessidade de desfibrilação ou cardioversão elétrica); insuficiência renal aguda (definida como aumento da creatinina sérica maior que 50% do valor pré-operatório ou necessidade de hemodiálise).

**Técnica anestésica:** na sala de cirurgia, todos os pacientes foram monitorizados com cardioscópio contínuo de cinco derivações, oximetria de pulso, sonda vesical de demora, termômetro esofágico, pressão arterial invasiva em artéria radial e medida de pressão venosa central por cateter inserido pela veia subclávia.

A medicação pré-anestésica padronizada foi alprazolam 1mg, por via oral, 8 horas antes da cirurgia. Não foi administrada medicação nos pacientes em condições de instabilidade hemodinâmica.

A técnica anestésica escolhida foi a anestesia geral balanceada. Após desnitrogenação com oxigênio a 100%, a indução anestésica foi efetuada com etomidato (2 mg/kg), midazolam (0,05 mg/kg), sufentanil (0,5 µg/kg) ou fentanil (5 µg/kg) e bloqueio neuromuscular com pancurônio (0,1 mg/kg). O paciente foi, a seguir, intubado e mantido em assistência ventilatória mecânica com fração inspirada de oxigênio (FiO<sub>2</sub>) de 60% em sistema circulatório valvular com absorvedor de CO<sub>2</sub>, modalidade de ventilação controlada a volume e limitada a pressão (25 mmHg), volume corrente em torno de 6 a 8 mL/kg, frequência respiratória de 12 ciclos por minuto, pressão positiva no final da expiração de 5 mmHg, fluxo de gases 1,0 L/min. A manutenção da anestesia foi realizada com concentrações variáveis de isoflurano (0,5 a 1%) e doses intermitentes de sufentanil ou fentanil e pancurônio. Antes da circulação extracorpórea foi administrada nova alíquota de midazolam e bloqueador neuromuscular.

A hidratação intra-operatória foi realizada com soro de soro fisiológico, tendo como parâmetros as pressões de enchimento, a diurese e o débito cardíaco. O limiar para transfusão de concentrado de hemácias foi estabelecido como hematócrito (Ht) < 25% sem instabilidade hemodinâmica e Ht < 28% com instabilidade hemodinâmica.

Plasma fresco congelado, plaquetas e crioprecipitados foram transfundidos de acordo com evidências laboratoriais e clínicas de coagulopatia, após a reversão dos efeitos da heparina.

**Técnica cirúrgica e circulação extracorpórea:** todas as cirurgias foram realizadas com circulação extracorpórea. Antes do início da CEC, os pacientes foram anticoagulados com heparina (Liquemine<sup>®</sup>) na dose de 300 UI/kg para manutenção do tempo de coagulação ativado (TCA) superior a 480 segundos, suplementada com doses de 5.000 a 10.000 UI quando foi necessário (TCA < 480 segundos). Ao final da CEC, a anticoagulação foi revertida com sulfato de protamina na proporção de 1:1 em relação à dose de heparina. Oxigenadores de membrana foram utilizados em todos os pacientes durante a CEC. A temperatura foi mantida

entre 32 e 34 °C e a técnica de proteção miocárdica utilizada foi a cardioplegia sanguínea hipotérmica anterógrada intermitente. O manejo do equilíbrio ácido-básico durante a CEC foi realizado com o método *alfa-stat*. A perfusão foi mantida com fluxo não-pulsátil, em torno de 2,2 a 2,4 L/min/m a fim de se sustentar a pressão arterial média em torno de 60 mmHg. Os pacientes foram submetidos a esternotomia mediana, a CEC instituída com canulação de aorta ascendente e átrio direito e canulação de veia pulmonar superior direita com introdução de cateter para aspiração e descompressão do ventrículo esquerdo. Para a saída da CEC, fármacos vasoativos e inotrópicos foram utilizados conforme a necessidade do paciente, a critério do anestesiológico.

**Biópsia:** as biópsias foram realizadas na parede livre do átrio direito. A amostra foi obtida imediatamente após a abertura pericárdica, antes da administração de heparina e de qualquer manipulação cirúrgica do coração. As amostras foram conservadas em azoto líquido e armazenadas a -70 °C até serem analisadas. As amostras congeladas foram homogeneizadas em 20 volumes de cloreto de sódio, 600 mmol/L, e Tris (hidroximetilaminometano) 15 mmol/L; pH 7,5; concentrações de proteína foram determinadas através da técnica descrita por *Lowry* e colaboradores, sendo albumina de soro de bovino utilizada como padrão.

**Medida de HSP 70 no plasma:** Em cada paciente selecionado para o estudo, foi coletada amostra (1 mL) de plasma para avaliação de HSP70 circulante. Foi adicionado 1µL de cada inibidor de protease (PMSF, Aprotinina, Leupeptina) a cada alíquota de plasma antes do congelamento em freezer -80 °C.

As concentrações de HSP70 nos meios de cultura foram determinadas com o uso de Kit específico ultrasensível (HSP70 ELISA Kit, ENZO *LifeSciences/StressgenBiotechnologies*, EKS-715) e o resultado foi normalizado pela quantidade de células em cada poço e pelo período de incubação, sendo expresso em ng/h/108 células.

**Western blotting:** The atrial muscle (200 mg) was homogenized in 5 volumes of buffer (200 mM EDTA (Sigma 03685), pH 7.0, 1M Tris Base (Bio-Rad #161-0719), pH 7.5, 10 mM orthovanadate (Sigma S6508), 2 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (Sigma P7626), 10 mM sodium pyrophosphate (Sigma 221368), 0.1 mg/mL aprotinin (Sigma 10820), 100 mM sodium fluoride (Sigma 71519), Triton 10% (Sigma #019K0151), ultrapure water) using Polytron (Pro Scientific model Pro 200) and centrifuged (Sigma, model 2K15, number serial 57707, Germany) at 14,000 g for 40 minutes at 4°C and the supernatant was collected. The total protein content was determined in the supernatant using the Lowry method [32]. The samples were treated with Laemmli buffer containing dithiothreitol (DTT) (Bio-Rad #161-0611). After heating samples at 95°C for 5 min, the proteins were subjected to SDS-PAGE (8%) and transferred using a semi-dry system (Bio-Rad, CA, USA) to a nitrocellulose membrane of 0.22 µM (Bio-Rad, cat. 162-0112). A molecular weight standard was used and run concurrently on each gel for accurate determination of the proper molecular weight for each antibody (Thermo Scientific, #26634). The nitrocellulose membranes were treated with blocking



buffer (3% nonfat dried milk or albumin, 10 mmol/L Tris Base (Bio-Rad #161-0719), 150 mmol/L NaCl (Sigma 71379), and 0.02% Tween 20 (Sigma P1379).

The membranes were incubated with the appropriate primary antibodies overnight to assess the protein level of: HSP70 (Stressgen, Victoria, BC, Canada; Ref. ADI-SPA 3854 diluted 1:1000, MW90 kDa) HSP90 (Stressgen, Victoria, BC, Canada; Ref. ADI-SPA 831 diluted 1:3000, MW90 kDa), HSP60 (Stressgen, Victoria, BC, Canada; Ref. ADI-SPA 806 diluted 1:2000, MW60 kDa), HSP25 (Stressgen, Victoria, BC, Canada; Ref. ADI-SPA 801 diluted 1:2000, MW25 kDa), Aha1 (Abcam, Cambridge, Ref. ab83036 diluted 1:2000, MW38 kDa), SOD (Abcam, Cambridge, Ref. ab51254 diluted 1:10.000, MW18 kDa), Catalase (Santa Cruz, CA, USA, Ref. sc271803 diluted 1:1000, MW55 kDa), GPx (Abcam, Cambridge, Ref. ab22604 diluted 1:2000 MW22 kDa), p-HSF1 phosphorylated in serine 230 (Santa Cruz, CA, USA, Ref. sc30443 diluted 1:1000, MW90 kDa), HSF (Stressgen, Victoria, BC, Canda; Ref. SPA 950 diluted 1:500), GFAT (Santa Cruz, CA, USA, Ref. sc134894 diluted 1:1000, MW77 kDa), OGT (Abcam, Cambridge, Ref. ab59135 diluted 1:1000, MW110 kDa), GAPDH (Stressgen, Victoria, BC, Canada, Ref. ADI 905734 diluted 1:1000), VEGF (Abcam, Cambridge, Ref. ab46154 diluted 1:2000, MW43 kDa), BCKDH (Abcam, Cambridge, Ref. ab59747 diluted 1:2000, MW46 kDa), p-AKT phosphorylated in serine 473 (Santa Cruz, CA, USA, Ref. sc7985-R diluted 1:1000, MW56 kDa), AKT (Santa Cruz, CA, USA, Ref. sc8312 diluted 1:1000, MW56 kDa), PI 3-Kinase (p85), N-SH2 domain (catalog number #06-496, Upstate Biotechnology NY, USA diluted 1:1000) and PGC (Abcam, Cambridge, Ref. ab72230 diluted 1:1000, MW110 kDa). The appropriate secondary antibodies were used for detection. The bands were visualized using a UVITEC Cambridge instrument (model Alliance LD2). The blots were quantified using the digital program UVITEC.

**Concentração do Lactato:** o lactato sérico foi analisado por meio da amostra de gasometria arterial pelo método potenciométrico, tendo como valores de referência de 5,7 a 2,0 mg/dL ou 0,63 a 2,44 mmol/L. O equipamento utilizado para as medições foi o gasômetro ABL 700, da Radiometer®.

**Análise estatística:** As variáveis contínuas foram apresentadas em média  $\pm$  desvio padrão ou mediana e intervalo interquartil quando não obedeceram à distribuição gaussiana. As variáveis categóricas foram apresentadas em proporções.

As variáveis contínuas foram analisadas utilizando-se o teste t de Student ou o teste não-paramétrico de Mann-Whitney quando apropriado. As variáveis categóricas foram analisadas utilizando-se o teste exato de Fisher ou o teste do Qui-quadrado quando apropriado. Para a comparação dos parâmetros hemodinâmicos e metabólicos entre os dois grupos ao longo do tempo foi utilizada a análise de variância (ANOVA). Devido à sua distribuição não-gaussiana alguns parâmetros foram transformados em logaritmo para a análise estatística.

Os parâmetros que apresentaram diferença entre os grupos com  $P < 0,05$  na análise univariada foram incluídos na análise multivariada que foi realizada pelo modelo de regressão logística (Backward Wald) para a identificação de marcadores independentes de evolução complicada. Os resultados da regressão logística foram descritos pela razão de chances (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC 95%).

Curvas ROC (curva de características operacionais) dos parâmetros identificados como preditores de evolução complicada foram construídas a fim de encontrar os melhores valores de corte associados à evolução complicada. O valor de corte foi determinado como o valor associado a maior soma da sensibilidade e especificidade. As áreas sob a curva ROC foram determinadas e comparadas.

A análise foi feita com o auxílio do software SPSS 17.0 (Statistical Package for Social Sciences). O valor de  $P < 0,05$  foi considerado como estatisticamente significativo.

## RESULTADOS

Foram estudados no total 46 pacientes, sendo 26 do sexo masculino (56%) e 20 do sexo feminino (44%). A idade dos pacientes variou entre 35 e 83 anos. Durante o acompanhamento pós-operatório, 31 pacientes foram classificados como tendo evolução não complicada (67,3%) e 15 pacientes como tendo evolução complicada (32,6%), 3 dos quais evoluíram para óbito no período de trinta dias após a cirurgia. Os pacientes que apresentaram evolução complicada eram mais idosos quando comparados aos pacientes com evolução não complicada. Não houve diferença estatisticamente significativa quanto à superfície corpórea da proporção do sexo feminino entre os grupos. O grupo com evolução complicada apresentou valores maiores de EuroSCORE (mediana 5, intervalo interquartil 3-5) quando comparados ao grupo com evolução não complicada (mediana 3, IQ 3-5). Não foram observadas diferenças entre os grupos quanto à duração da cirurgia, da anestesia, tempo de clampeamento e de circulação extracorpórea (Tabela 1).

Os dados da Tabela 1 demonstram que os pacientes que apresentaram evolução complicada apresentaram maior tempo de internação na UTI e maior tempo de internação hospitalar. As complicações foram significativamente maiores no grupo com evolução complicada.

**Tabela 1:** Comparação dos dados do pós-operatório de pacientes submetidos à RM com CEC com evolução não complicada e complicada.

Variável	Evolução não complicada (n = 31)	Evolução complicada (n = 15)	P
Tempo de internação na UTI (dias)	2 (2-4)	8 (7-21)	< 0,001
Tempo de internação hospitalar (dias)	7 (6-13)	21 (14-28)	< 0,001
Intubação prolongada	18 (41%)	11 (75%)	< 0,001
Complicações renais	1 (3%)	8 (51%)	< 0,001
Complicações neurológicas	0 (0%)	4 (26%)	< 0,001
Complicações infecciosas	9 (29%)	11 (73%)	< 0,001
Baixo débito cardíaco	3 (9,6%)	13 (86,6%)	< 0,001
Arritmias	2 (6,4%)	9 (60%)	< 0,001

### EuroSCORE:

A chance de uma pessoa apresentar complicação aumenta em 2,09 vezes quando com cada unidade adicional do EuroSCORE. O mesmo constitui um forte preditor independente de risco e prognóstico como demonstrado na figura 1.

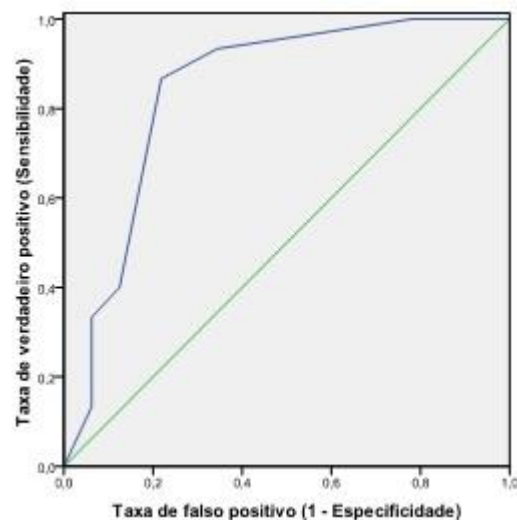


Figure 1. Receiver-operating characteristic curves to predict complications. (A), ROC curves of EuroSCORE for diagnosing complication.

### Lactato:

O lactato arterial foi significativamente maior no grupo com evolução complicada. Apesar de ser aumentado no grupo complicado, o delta de lactato não mostrou diferença significativa nos níveis de lactato entre os grupos. Os resultados demonstram que houve aumento significativo dos níveis de lactato arterial durante a cirurgia nos dois grupos, porém não constitui um preditor independente para os pacientes complicados, como demonstrado na figura 2.

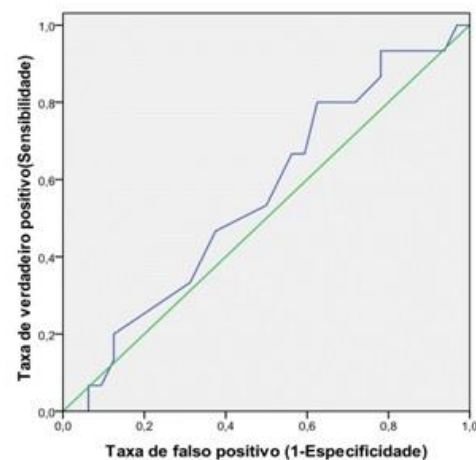
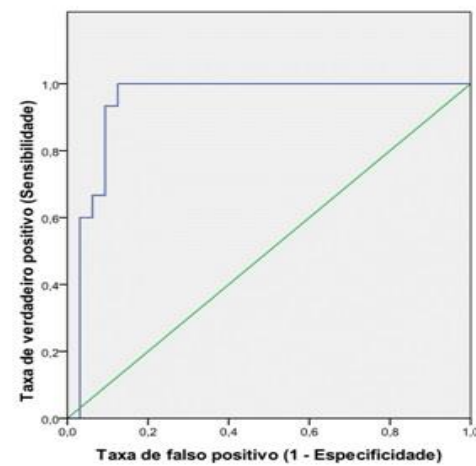


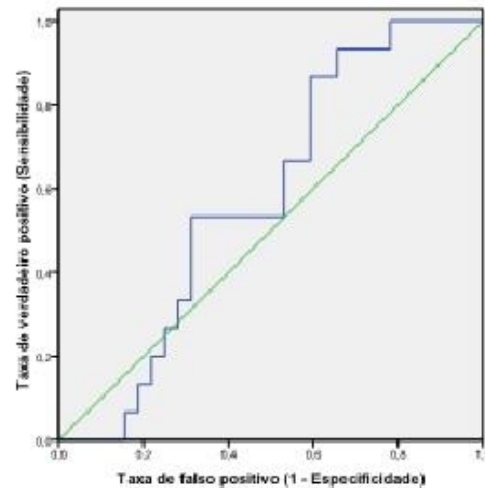
Figure 2: Receiver-operating characteristic curves to predict complications. (A), ROC curves of LACTATO for diagnosing complication.

Houve aumento significativo na expressão da HSP 25 no grupo de pacientes não complicados (teste de homogeneidade de variância  $p < 0,001$ ). A HSP 25 apresentou excelente poder de discriminação, demonstrado na figura 3.

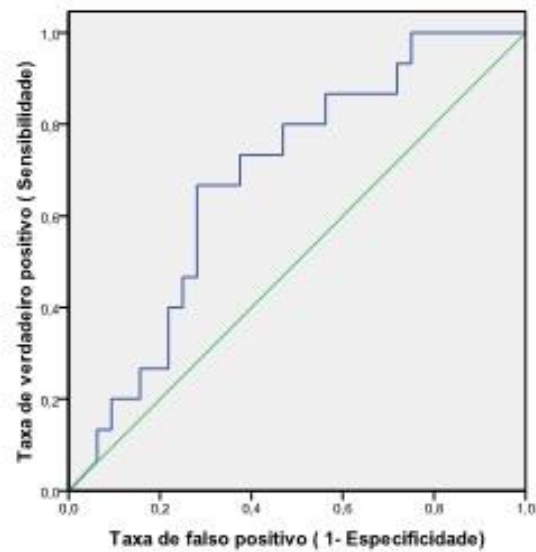
Ratificando os achados o grupo de família das proteínas *chaperonas* as HSP 60 e HSP 70 mostraram um aumento significativo na expressão no grupo de pacientes não complicados, e menores valores nos pacientes complicados, sendo que a HSP 70 apresenta a mesma expressão no sangue periférico, com uma sensibilidade significativa como se observa nas figuras 4, 5 e 6, respectivamente.



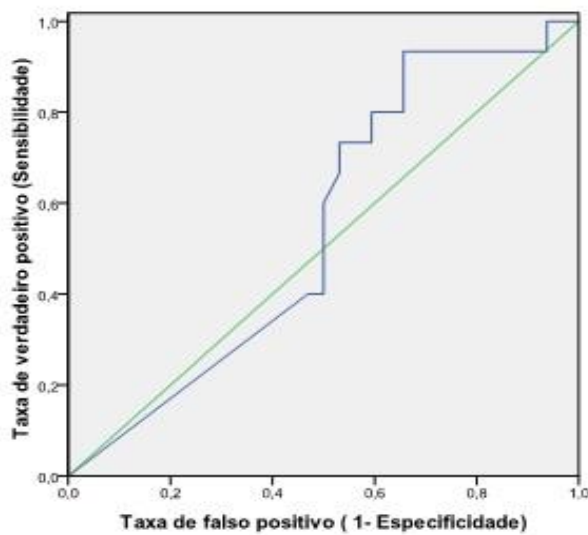
**Figure 3.** Receiver-operating characteristic curves to predict complications. ROC curves of HSP 25 for diagnosing complication.



**Figure 4.** Receiver-operating characteristic curves to predict complications. ROC curves of HSP 60 for diagnosing complication.



**Figure 5.** Receiver-operating characteristic curves to predict complications. ROC curves of HSP 70 for diagnosing complication.



**Figure 6.** Receiver-operating characteristic curves to predict complications. ROC curves of HSP 70 soro for diagnosing complication.

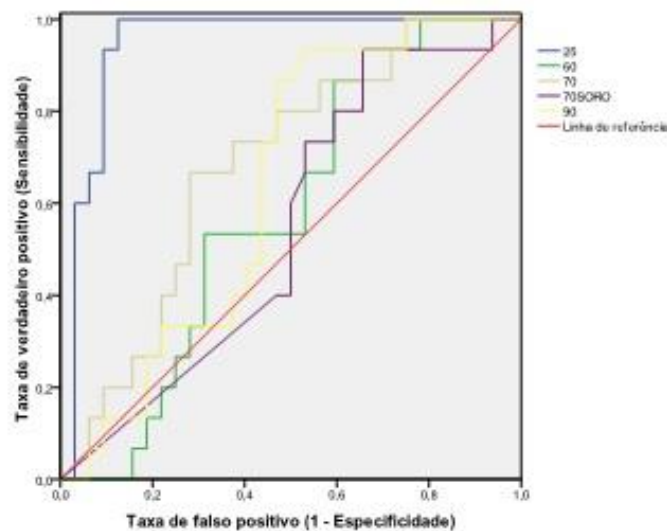
A partir do intervalo de confiança univariado, pode-se verificar que as variáveis lactato e HSPs 90 não são fatores de risco para os pacientes com complicação. Os valores de área sob a curva ROC demonstram que as variáveis EuroSCORE, HSPs 25, HSPs 60 e HSPs 70 são fatores de proteção para a ocorrência de complicação. Ou seja, para as variáveis Euroscore e 25 apresentaram excelente poder de discriminação como visto na Tabela 2.

**Tabela 2:** Análise estatística dos marcadores estudados

Variável	Regressão logística univariada				Regressão logística multivariada			
	CI 95 %			P-valor	CI 95 %			P-valor
	OR	LI	LS		OR	LI	LS	
EuroSCORE	2,097	1,326	3,316	<b>0,002</b>	1,99	1,259	3,147	<b>0,003</b>
Lactato	1,573	0,978	2,529	0,062	1,449	0,744	2,82	0,276
HSPs 25	0,631	0,488	0,815	<b>0</b>	0,262	0,102	0,671	<b>0,005</b>
HSPs 60	0,744	0,592	0,934	<b>0,011</b>	1,359	0,735	2,514	0,328
HSPs 70	0,787	0,666	0,929	<b>0,005</b>	1,146	0,71	1,85	0,577
HSPs 70 SORO	0,71	0,501	1,004	0,053	1,25	0,704	2,219	0,446
HSPs 90	0,724	0,478	1,097	0,128	1,303	0,696	2,44	0,408

Negrito indica relevância estatística. OR: odds ratio, LI: limite inferior e LS: limite superior; CI: intervalo de confiança.

Ao comparar as HSPs 25, 60, 70, 70 SORO e 90 pode-se verificar um maior grau de discriminação para o 25, em relação ao 60, 70 miocárdica, 70 sérica e 90. (área sob a Curva ROC de 0,944 vs 0,683;0,547 e 0,634) como demonstrado pela figura 7.



**Figure 7.** The receiver operating characteristic (ROC) curve of the study group to compare the tradeoffs between the true-positive rate and the false-positive rate of increase of all HSPs levels to identify all the diagnostic discrimination limits for each markers (HSP 25, HSP 60, HSP70, HSP 70 SORO, HSP 90).

## DISCUSSÃO

A cirurgia de revascularização do miocárdio com circulação extracorpórea é um tratamento altamente eficaz para insuficiência coronariana, porém com um potencial de complicação não desprezível. A identificação de marcadores destas complicações pode minimizá-las ou mesmo evitá-las. Nosso objetivo foi associar o

marcador de perfusão tecidual lactato e o escore EuroSCORE com a expressão das HSPs no miocárdio e sangue periférico.

Os principais resultados deste estudo sugerem que as HSPs (70,60 e 25), bem como o EuroSCORE, são preditores independentes de evolução complicada após revascularização do miocárdio em pacientes com função ventricular esquerda normal.

O EuroSCORE, um modelo de estratificação de risco desenvolvido inicialmente para predição de mortalidade hospitalar em cirurgia cardíaca [8, 9], foi um preditor independente de evolução complicada nesta amostra. Vários estudos demonstram a validade do seu emprego como preditor de morbidade pós-operatória em cirurgia cardíaca [10, 11, 33, 34] e os resultados deste ensaio estão de acordo com os apontados pela literatura. Observou-se que a área sob a curva ROC do EuroSCORE foi de 2,09 para predição de evolução complicada, indicando que valores de EuroSCORE iguais a ou maiores que 5 foram preditores de evolução complicada nos pacientes submetidos a revascularização do miocárdio com função ventricular normal.

Níveis baixos de HSP 25 foram encontrados nos pacientes complicados. Há poucos estudos que correlacionam a expressão de HSP 25 e alterações miocárdicas. O aumento da expressão de HSP 25 pode prevenir a sinalização de apoptose, antagonizando a ativação de TLR2 mediante estresse sistêmico, como causado por tratamentos tóxicos ou acúmulo de proteína desnaturizada [35]. A provável proteção da HSP 25 deve estar relacionada a proteção contra apoptose celular. Nesse estudo, os pacientes complicados apresentaram níveis muito baixos quando comparados à sua contraparte.

HSP 60 mostrou-se significativamente aumentada nos pacientes não complicados em relação aos complicados. É conhecida uma relação da expressão de HSP 60 e seu potencial para detecção de doenças cardíacas [22,23]. Outros estudos mostram que níveis de HSP 60 podem aumentar o risco de doenças cardíacas, podendo ser considerada um novo fator de risco familiar para estas doenças. Em estudo realizado com chineses, o polimorfismo do gene HSP60 foi significativamente associado a risco aumentado de doença arterial coronariana [30]. Elevadas concentrações de HSP 60 foram associadas à doença arterial coronariana e a sua gravidade [22]. Entretanto outros estudos não conseguiram encontrar uma correlação entre o potencial papel da HSP60 no diagnóstico de doenças cardíacas [19] e em pacientes com doença coronariana sua expressão se mostrou semelhantes aos pacientes não doentes [36]. Nossos resultados demonstram que sua concentração é menor nos pacientes complicados, possibilitando considerá-la um fator de proteção, e não marcador de gravidade

.As HSPs 70 miocárdica e no sangue periférico mostraram-se em menor concentração nos pacientes complicados. Parte desse resultado explica-se pelo efeito da HSP 70 em oferecer proteção cardíaca mediante o dano isquêmico. Okubo et al., ao induzir superexpressão de HSP 70, comprovou redução significativa na área

do infarto [37]. O coração infartado parece ter menor capacidade de produzir HSP 70, o que poderia estar intimamente relacionado à sua deterioração funcional e capacidade de tolerar novos danos [38]. Resultados experimentais sugerem que o efeito da hipotermia moderada durante a CEC envolve a regulação da família proteicas HSPs 70 com inibição da necrose, mas não da apoptose [25]. Os níveis de HSP70 já foram relacionados com os danos teciduais e isquemia após cirurgia cardíaca, e que a mensuração pode se tornar uma vantagem de diagnóstico e prognóstico nestes casos [32]. Nossos achados estão de acordo com a literatura, seus prováveis mecanismos fisiopatológicos e reforçam a ideia de que a HSP 70, tanto miocárdica quanto sérica (esta mais viável e factível), pode ser um biomarcador relevante.

Observou-se que a concentração arterial de lactato tendeu a ser mais elevada no grupo de pacientes complicados em relação ao outro grupo, embora nenhuma diferença estatisticamente relevante tenha sido demonstrada. Cerca de 10 a 20% das cirurgias cardíacas com CEC apresentam altas concentrações de lactato, e neste grupo há maior morbidade e mortalidade pós-operatória [6]. A maior proporção desse achado se deve à hipóxia tecidual, embora a hiperlactatemia possa ocorrer em pacientes sem hipóxia tissular após a CEC [6]. Nossos dados não diferem dos achados da literatura; verificou-se um aumento do lactato sérico no grupo de pacientes complicados, mas sem consistência para considerá-lo um preditor independente de prognóstico. A irrelevância estatística possivelmente se explica pela limitação da análise, restrita ao período intraoperatório, demasiadamente curto para permitir o clareamento do lactato arterial.

Acredita-se que a identificação de pacientes de alto risco para cirurgia cardíaca através de escores de riscos e marcadores já conhecidos associados a outros com forte poder preditivo pode permitir a adoção de medidas precoces que visem à obtenção de melhor perfusão tecidual, resultando em menor tempo de internação na UTI e melhor prognóstico dos pacientes submetidos à revascularização do miocárdio.

## CONCLUSÃO

Os achados aqui apresentados demonstram que preditores já validados pela literatura como, EuroSCORE, se mostram como preditores independentes de complicações. Adicionalmente, A dosagem das proteínas da família *chaperona*, HSPs 25, 60, 70, podem ser considerados preditores independentes de evolução complicada em pacientes sem disfunção ventricular submetidos à revascularização do miocárdio com CEC, fornecendo informações complementares quanto ao prognóstico destes pacientes.



## REFERÊNCIAS

1. Organization for Economic Co-operation and Development, Version 06/26/2015. Health Data 2015: Statistics and indicators for 30 countries. . Available from: <http://oecd.org/health/healthdata>.
2. Yusuf S, Zucker D, Peduzzi P, Fisher LD, Takaro T, Kennedy JW, et al. Effect of coronary artery bypass graft surgery on survival: overview of 10-year results from randomized trials by the Coronary Artery Bypass Graft Surgery Trialist Collaboration. *Lancet*. 1994; 344(8922):563-70.
3. Berman M, Stamler A, Sahar G, Georghiou GP, Sharoni E, Brauner R, et al. Validation of the 2000 Bernstein-Parsonnet score versus the EuroSCORE as a prognostic tool in cardiac surgery. *Ann ThoracSurg*. 2006; 81(2):537-40.
4. Moura HV, Pomerantzeff PMA, Gomes WJ. Síndrome da resposta inflamatória sistêmica na circulação extracorpórea: papel das interleucinas. *RevBrasCirCardiovasc*. 2001;16(4):376-87.
5. Chiolero RL, Revely JP, Leverve X, Gersbach P, Cayeux MC, Berger MM, et al. Effects of cardiogenic shock on lactate and glucose metabolism after heart surgery. *CritCare Med*. 2000; 28(12):3784-91.
6. Ranucci M, De Toffol B, Isgro G, Romitti F, Conti D, Vicentini M. Hyperlactatemia during cardiopulmonary bypass: determinants and impact on postoperative outcome. *CritCare*. 2006; 10(6):R167.
7. Mathew JP, Mackensen GB, Phillips-Bute B, Stafford-Smith M, Podgoreanu MV, Grocott HP, et al. Effects of extreme hemodilution during cardiac surgery on cognitive function in the elderly. *Anesthesiology*. 2007; 107(4):577-84.
8. Roques F, Nashef SA, Michel P, Gauducheau E, de Vincentiis C, Baudet E, et al. Risk factors and outcome in European cardiac surgery: analysis of the EuroSCORE multinational database of 19030 patients. *Eur J CardiothoracSurg*. 1999; 15(6):816-22
9. Nashef SA, Roques F, Michel P, Gauducheau E, Lemeshow S, Salamon R. European system for cardiac operative risk evaluation (EuroSCORE). *Eur J CardiothoracSurg*. 1999; 16(1):9-13.
10. Nilsson J, Algotsson L, Hoglund P, Luhrs C, Brandt J. EuroSCORE predicts intensive care unit stay and costs of open heartsurgery. *Ann ThoracSurg*. 2004; 78(5):1528-34.
11. Messaoudi N, De Cocker J, Stockman BA, Bossaert LL, Rodrigus IE. Is EuroSCORE useful in the prediction of extended intensive care unit stay after cardiac surgery? *Eur J CardiothoracSurg*. 2009; 36(1):35-9.
12. Campagnucci VP, Pinto ESAM, Pereira WL, Chamlian EG, Gandra SM, Rivetti LA. EuroSCORE and the patients undergoing coronary bypass surgery at Santa Casa de Sao Paulo. *RevBrasCirCardiovasc*. 2008; 23(2):262-7.
13. Moraes F, Duarte C, Cardoso E, Tenório E, Pereira V, Lampreia D, et al. Avaliação do EuroSCORE como preditor de mortalidade em cirurgia de revascularização miocárdica no Instituto do Coração de Pernambuco. *RevBrasCirCardiovasc*. 2006; 21(1):29-34.
14. Bakker J, Gris P, Coffernils M, Kahn RJ, Vincent JL. Serial blood lactate levels can predict the development of multiple organ failure following septic shock. *Am J Surg*. 1996; 171(2):221-6.

15. Manikis P, Jankowski S, Zhang H, Kahn RJ, Vincent JL. Correlation of serial blood lactate levels to organ failure and mortality after trauma. *Am J Emerg Med.* 1995; 13(6):619-22.
16. Craig, E. A. The HSP70 chaperonemachinery: J proteins as drivers off unctional specificity. *Nature*, 2010 v. 11, p. 579 – 592.
17. Diller, K. R. Stress protein expression kinetics. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* , 2006 v. 8, p. 403 – 424.
18. Santoro, MG. Heat Shock Factors and the control of the stress response. *Biochemical Pharmacology*, 2000. v. 59, p. 55 – 63.
19. Currie, RW. Karmazyn, M. Improved post-ischemic ventricular recovery in the absence of changes in energy metabolism in working rathe arts following heat-shock. *Journal of molecular and cellular cardiology [S.I.]* 1990, v. 22, n. 6, p. 631-6.
20. Li Z, Song Y, Xing R, Yu H, Zhang Y, Li Z, Gao W. Heat shock protein 70 acts as a potential biomarker for early diagnosis of heart failure. *PLoSOne*, 2013, v. 8, n. 7, p. e67964. ISSN 1932-6203.
21. Bonanad C, Núñez J, Sanchis J, Bodi V, Chaustre F, Chillet M et al. Serum heat shock protein 60 in acute heart failure: a new biomarker? *Congest Heart Fail*, 2013, v. 19, n. 1, p. 6-10. ISSN 1527-5299.
22. Rahsepar AA, Mirzaee A, Moodi F, Moohebaty M, Tavallaie S, Eshraghi A et al. Anti-heat shock protein 27 titers and oxidative stress levels are elevated in patients with valvular heart disease. *Angiology*, 2012, v. 63, n. 8, p. 609-16. ISSN 0003-3197.
23. Veres A, Szamosi T, Ablonczy M, Szamosi Jr T, Singh M, Karádi I et al. Complement activating antibodies against the human 60 kDa heat shock protein as a new independent family risk factor of coronary heart disease. *Eur J ClinInvest*, 2002, v. 32, n. 6, p. 405-10. ISSN 0014-2972 (Print)0014-2972.
24. Donnelly TJ, Sievers RE, Vissern FL, et al: Heat shock protein induction in rathearts. A role for improved myocardial salvage after ischemia and reperfusion *Circulation*, 1992; 85: 769 – 778.
25. Bennett-Guerrero E - Systemic inflammation. In: *Cardiac Anesthesia*. Kaplan J A, ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1999: 297-318.
26. Souza MHL, Elias DO - Resposta inflamatória sistêmica à circulação extracorpórea. 1999. Available at: [Perfusion online www.perflines.com](http://www.perflines.com),
27. Silva SL - Síndrome de resposta inflamatória sistêmica pós circulação extracorpórea. In: *Temas atuais em circulação extracorpórea*. Teixeira Filho G F et al., eds. Sociedade Brasileira de Circulação Extra-corpórea, 1997: 90-7.
28. Wang S, Diller KR, Aggarwal SJ: Kinetics study of endogenous heat shock protein 70 expression. *J BiomechEng* 2003; 125: 794 – 797.
29. Yellon DM, Latchman DS, Marber MS Stress proteins: anendogenousroutetomyocardialprotection—factorfiction? *Cardiovasc Res*, 1993. 27:158–161

30. Qing M, Vazquez-Jimenez JF, Schumacher K, Bhardwaj RS, Klosterhalfen B, Minkenberg R, et al: Moderate hypothermia during cardiopulmonary bypass increases intramyocardial synthesis of heat shock protein 72. *J ThoracCardiovascSurg*, 2002; 124: 724 – 731.
31. Dybdahl B, Wahba A, Lien E, Flo TH, Waage A, Qureshi Net al. Inflammatory response after open heart surgery: release of heat-shock protein 70 and signaling through toll-like receptor-4. *Circulation*, 2002, v. 105, n. 6, p. 685-90. ISSN 0009-7322.
32. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ Protein measurement with the Folinphenol reagent. *J BiolChem*, 1951, 193 265–275.
33. Toumpoulis IK, Anagnostopoulos CE, Swistel DG, DeRose JJ, Jr. Does EuroSCORE predict length of stay and specific postoperative complications after cardiac surgery? *Eur J CardiothoracSurg*. 2005; 27(1):128-33.
34. Hirose H, Inaba H, Noguchi C, Tambara K, Yamamoto T, Yamasaki M, et al. EuroSCORE predicts postoperative mortality, certain morbidities, and recovery time. *Interact CardiovascThoracSurg*. 2009; 9(4):613.
36. Krishnamurthy K1, Kanagasabai R, Druhan LJ, Ilangovan G.. Heat shock protein 25-enriched plasma transfusion preconditions the heart against doxorubicin-induced dilated cardiomyopathy in mice. *J PharmacolExpTher*, 2012, v. 341, n. 3, p. 829-39. ISSN 0022-3565.
37. Lenzi C, Palazzuoli A, Giordano N, Alegente G, Gonnelli C, Maria Stella Campagna MSet al. H pylori infection and systemic antibodies to CagA and heat shock protein 60 in patients with coronary heart disease. *World J Gastroenterol*, 2006, v. 12, n. 48, p. 7815-20. ISSN 1007-9327 (Print) 1007-9327.
38. Okubo S, Wildner O, Shah MR, Chelliah JC, Hess ML, Kukreja RC. DGene transfer of heat-shock protein 70 reduces infarct size in vivo after ischemia/reperfusion in the rabbit heart. *Circulation*, 2001, v. 103, n. 6, p. 877-81. ISSN 0009-7322
39. Tanonaka K, Furuham KI, Yoshida H, Kakuta K, Miyamoto Y, Toga W, et al. Protective effect of heat shock protein 72 on contractile function of perfused failing heart. *Am J Physiol Heart CircPhysiol*, 2001, v. 281, n. 1, p. H215-22ISSN 0363-6135 (Print) 0363-6135.

6. ANEXO 2: Sistema Europeu de Avaliação de Risco em Cirurgia Cardíaca (EuroSCORE) : fatores de risco e pontuação atribuída

Fatores relacionados aos pacientes		Escore
Idade	(cada 5 anos ou fração acima de 60 anos)	1
Sexo	Feminino	1
Doença pulmonar crônica	Uso prolongado de broncodilatadores ou corticosteróides por doença pulmonar	1
Arteriopatia extracardíaca	Qualquer um dos seguintes: claudicação, oclusão carotídea ou estenose > 50%, intervenção prévia ou planejada na aorta abdominal, artérias periféricas ou carótidas	2
Cirurgia cardíaca prévia	Requerendo abertura do pericárdio	3
Disfunção neurológica	Doença que afeta a deambulação ou as atividades diárias	2
Creatinina sérica	> 2,27 mg/dL no pré-operatório	2
Endocardite ativa	Vigência de uso de antibióticos no dia da cirurgia	3
Estado pré-operatório crítico	Qualquer um dos seguintes: taquicardia ventricular ou fibrilação ou morte súbita abortada, massagem cardíaca pré-operatória, ventilação pré-operatória antes da chegada na sala de cirurgia, suporte inotrópico pré-operatório, balão intra-aórtico ou insuficiência renal aguda pré-operatória (anúria ou oligúria < 10mL/h)	3
Fatores relacionados ao coração		
Angina instável	Angina no repouso necessitando do uso de nitrato intravenoso até a chegada na sala de cirurgia	2
Disfunção do ventrículo esquerdo	Moderada ou FE	1
	30-50% Grave ou FE < 30%	3
Infarto do miocárdio recente	< 90 dias	2
Hipertensão pulmonar	Pressão sistólica AP > 60 mmHg	2
Fatores relacionados à cirurgia		
Emergência	Realizada antes da escala do próximo dia	2
Outra cirurgia além da revascularização do miocárdio	Outra cirurgia cardíaca ou em adição à revascularização do miocárdio	2
Cirurgia na aorta torácica	Aorta ascendente, arco aórtico ou aorta descendente	3
CIV pós-infarto		4

FE: fração de ejeção, AP: artéria pulmonar.

7. ANEXO 3: As categorias do EuroSCORE e a classificação de risco do paciente.

<b>Grupo</b>	<b>Escore</b>
Baixo risco	0 a 2
Médio risco	3 a 5
Alto risco	> 6

## 8. ANEXO 4: Normas de publicação na Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular (BJCVS -- Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery)

Editor: Prof. Dr. Domingo M. Braile

Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery

Av. Juscelino Kubitschek de Oliveira, 1.505 – Jardim Tarraf I

15091-450 – São José do Rio Preto – SP - Brasil

e-mail: [bjcvs@sbccv.org.br](mailto:bjcvs@sbccv.org.br)

**We ask strongly the authors to consult the website below before submitting a manuscript for BJCVS**

D.Braile

EDITOR

BJCVS Emphatically ask that authors consult the website below before submitting a manuscript for BJCVS General rules for publications are summarized in the "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication": <http://www.icmje.org/>. Special hints there are given for randomized controlled trials, studies of diagnostic accuracy, systematic reviews and meta-analyses, observational studies in epidemiology, and meta-analyses of observational studies in epidemiology.

### INFORMATION FOR AUTHORS

The Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery (BJCVS) is the official journal of the Brazilian Society of Cardiovascular Surgery (BSCVS). It is a bimonthly publication, with regular circulation since 1986. BJCVS is indexed in the Thomson Scientific (ISI), Medline/PubMed, SCOPUS, SciELO, LILACS, Scirus and SCImago database.

BJCVS aims to record the scientific production in cardiovascular surgery, encouraging the study, improving and updating the professional specialty. Studies submitted for publication in BJCVS must deal with themes related to cardiovascular surgery and related fields. The journal publishes the following types of articles: original article, editorial, review article, special article, case report, how to do it, short communications, preliminary notes, clinical-surgical correlation, experimental study, multimedia and letter to editor.

Acceptance will be based on originality, significance and scientific contribution. Articles with merely propaganda or commercial purposes will not be accepted.

The authors are responsible for the content and information contained in their manuscripts.

**BJCVS vehemently rejects plagiarism and self-plagiarism. On submission of manuscripts, the authors sign a statement declaring they are aware of the consequences of violation.**

The journal will be published in full on the journal's website ([www.bjcvs.org](http://www.bjcvs.org)) and SciELO ([www.scielo.br/rbccv](http://www.scielo.br/rbccv)), with specific links in the BJCVS site ([www.sbccv.org.br](http://www.sbccv.org.br)) and CTSnet ([www.ctsnet.org](http://www.ctsnet.org)).

### EDITORIAL POLICY

#### Standard

BJCVS adopts the Standards of Vancouver - Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals, organized by the International Committee of Medical Journal Editors, available at: [www.icmje.org](http://www.icmje.org)

#### Submission and Publication Policy

Only manuscripts whose data is not being assessed by other journals and/or have not been previously published will be considered for review.

Manuscripts accepted may only be reproduced in whole or in part, without the express consent of the editor of BJCVS.

#### Electronic Submission

Manuscripts should be compulsorily submitted electronically on site <http://www.bjcvs.org/sgp/>. When entering this link, the system will ask for the username and password if the user have already registered. Otherwise, click on "I want to register" and register. Or, if the user have forgotten his password, the mechanism to remember the password can be used, which will generate an email containing such password.

The submission system is self-explanatory and includes eight steps:

- Step 1: Classification of the article
- Step 2: Adding title and keywords
- Step 3: Registering for authors
- Step 4: Inclusion of summary and Abstract
- Step 5: Inclusion of the manuscript itself with references
- Step 6: Sending images
- Step 7: Generation of copyright declarations, conflict of interest and copy of the Opinion of the Research Ethics Committee of the Institution
- 8th Step: Author's approval / finalization of submission

The texts must be edited in word format and figures and tables should be in separate files.

Keep your records updated because communication with authors is exclusively by e-mail.

When finishing the submission of the study, it will generate an e-mail stating that the submission was made correctly, another email will be generated after checking if it is within the standards.

If the article is “Out of Standard”, the author will be notified by email and can fix it into the SGP / BJCVS in [www.bjevs.org/sgp](http://www.bjevs.org/sgp).

Authors may follow the course of their study at any time by SGP/BJCVS through the flow code automatically generated by GSP, or even by the title of his study.

#### **Peer review**

All scientific contributions are reviewed by the Editor, Associate Editors, Editorial Board Members and/or Guests Reviewers. The reviewers answer a questionnaire in which they rated the manuscript, their rigorous examination on all items that compose a scientific study by assigning a score for each of the questionnaire items. At the end, general comments about the study and suggestion if it should be published, corrected according to the recommendations or definitively rejected are made. With these data, the Editor will make a decision. In case of discrepancies between the reviewers, a new opinion can be requested in order to provide a best judgment.

When modifications are suggested, they will be forwarded to the author and then the reviewers to verify that these requirements have been met. The authors have 30 days to make the changes requested by reviewers and resubmit the article. In response to the comments/suggestions of the reviewers, authors should highlight the changes made in the text. The non-observance of this period will involve the removal of the article from the review process.

Once the article is approved, authors will be notified by e-mail registered on the site and shall forward an abstract of up to 60 words in Portuguese and English, of the article. They are inserted into the electronic mailing and sent to all members when the BJCVS is available online.

Once accepted for publication, a proof of the edited article (PDF format) will be sent to the corresponding author for assessment and final approval.

#### **Language**

Articles should be written in English, using easily and accurately language and avoiding informality of colloquial language. For those studies whose standard the English language is deemed inappropriate by the Editorial Board, the journal will provide correction. and costs should be assumed by the authors.

Research on human subjects must be submitted to the Ethics Committee of the institution, fulfilling the Declaration of Helsinki 1975, revised in 2008 (World Medical Association, available at: <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/17c.pdf>) and Resolution 196/96 of the National Health Council (available at: [http://conselho.saude.gov.br/resolucoes/reso\\_96.htm](http://conselho.saude.gov.br/resolucoes/reso_96.htm)).

In experimental study involving animals the guidelines established in the Guide for Care and Use of Laboratory Animals should be respected (Institute of Laboratory Animal Resources, National Academy of Sciences, Washington, DC, United States), 1996, and Ethical Principles Animal Experimentation (Brazilian College of Animal Experimentation - COBEA, available at: [www.cobea.org.br](http://www.cobea.org.br)), 1991.

Randomized studies should follow the CONSORT guidelines (available at: [www.consort-statement.org/consort-statement](http://www.consort-statement.org/consort-statement)).

BJCVS supports policies for the registration of clinical trials of the World Health Organization (WHO) and the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), recognizing the importance of these initiatives for the registration and international open access dissemination of information on clinical trials. Thus, only be accepted for publication, the clinical research articles that have received an identification number in one of the Clinical Trial Registers validated by the criteria established by WHO and ICMJE, whose addresses are available at the ICMJE website (<http://www.icmje.org/>). The number should be recorded at the end of the abstract.

The statement of approval of the study by the Ethics and/or Scientific Institutional Committee must be sent at the time of submission of the manuscript.

### **Copyright Transfer and Declaration of Conflict of Interest**

The authors should submit manuscripts at the time of submission, the copyright declaration signed by all authors.

**All published manuscripts become the permanent property of the Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery and can not be published without the written consent of the editor.**

Likewise, for confirmation of the submission of the manuscript a statement of conflict of interest, signed by all authors should be sent.

Both documents, statement of copyright transfer and declaration of conflicts of interest, are standardized and generated by the SGP at the time of submission of the manuscript.

### **Authoring Criteria & Individual Contribution to Research**

We suggest the author to adopt the criteria for authorship of the articles according to the recommendations of the International Committee of Medical Journal Editors. **Thus, only those people who contributed directly to the intellectual content of the study should be listed as authors.**

Authors should meet all the following criteria in order to be able to take public responsibility for the content of the study:

1. have conceived and planned the activities that led to the study or interpreted the data it presents, or both;
2. have written the study or revised successive versions and took part in the review process;
3. have approved the final version.

**People who do not meet the above requirements and who had purely technical or of general support participation, should be mentioned in the acknowledgments section.**

On submission, the kind of contribution of each author when performing the study and manuscript preparation in the following areas should be made explicit:

1. Study Design
2. Collection, analysis and interpretation of data
3. Drafting of the manuscript

### **Abbreviations and Terminology**

The use of abbreviations should be minimal. When extensive expressions need to be repeated, it is recommended that their initial capital letters replace them after the first mention. It should be followed by the letters in parentheses. All abbreviations in tables and figures should be defined in the respective legends.

The use of abbreviations in the Summary and Abstract Should be avoided.

Only the generic name of the drug used should be cited in the study, and we discourage the use of trade names.

BJCVS adopts Universal Official Anatomical Terminology, approved by the International Federation of Anatomists Associations (FIAA).

## **PREPARATION OF MANUSCRIPT**

### **Manuscript Sections**

**Title and Authors.** The study title, in Portuguese and English, should be concise and informative. The full names of authors, titles and their institutional affiliation should be provided.

**Summary and Abstract.** The abstract should be structured in four sections: Objective, Methods, Results and Conclusion. The Abstract (literal version, in English, of Abstract in Portuguese) should follow the same structure of the summary into four sections: Objective, Methods, Results and Conclusion. Abbreviations should be avoided. The maximum number of words should follow the recommendations in the table. In the Articles Case Reports and How-I-Do, the abstract should not be structured (informative or free). The Clinical and Surgical Correlations and sections Multimedia exempt summary and abstract.

**Descriptors:** From three to five descriptors (keywords) should also be included as well as their translation. The descriptors can be found at the website <http://decs.bvs.br/>, which contains terms in Portuguese, Spanish and English or [www.nlm.nih.gov/mesh](http://www.nlm.nih.gov/mesh) for terms in English only, or in the respective links available at the submission system of the journal.

National Library of Medicine created a tool for suggesting the potencial descriptors to use based on the abstract. It is available on <https://www.nlm.nih.gov/mesh/MeSHonDemand.html>

**Body of the manuscript.** Original Articles and Experimental Study should be divided into the following sections: Introduction, Methods, Results, Discussion, Conclusion and Acknowledgements (optional). The Case Reports should be structured in sections: Introduction, Case Report and Discussion,



and Clinical-surgical Correlations in Clinical Data, Electrocardiography, Radiogram, Echocardiogram, Diagnosis and Operation. The section Multimedia should have the following sections: Patient Characterization and Description of the Technique. The Review Articles and Special Articles can be structured into sections according to the author's criteria.

**Letters to the Editor**, in principle, should comment, discuss or criticize articles published in BJCVS, but it can also be about other topics of general interest. It is recommended a maximum size of 1000 words, including references - that should not exceed five, and they may or may not include title. Whenever possible and appropriate, a response from the authors of the article in question will be published with the letter.

#### **References**

The references of the print and electronic records must be standardized according to the Vancouver standard, prepared by the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE, available at: <http://www.icmje.org>).

References should be identified in the text with Arabic numerals in square brackets, following the order of citation in the text, overwritten. The accuracy of references is the responsibility of the author. If more than two references were cited in sequence, only the first and last must be typed, separated by a dash (Example: [6-9]). In case of alternate citation, all references should be typed, separated by commas (Example: [6,7,9]).

Publications with up to six authors, all authors should be cited; publications with more than six authors, the first 6 followed by the Latin phrase "et al." should be cited.

Titles of journals should be abbreviated according to the List of Journals Indexed for MEDLINE (available at: <http://www.nlm.gov/tsd/serials/lji.html>).

#### **References Models**

##### **Journal Article**

Issa M, Avezum A, Dantas DC, Almeida AFS, Souza LCB, Sousa AGMR. Fatores de risco pré, intra e pós-operatórios para mortalidade hospitalar em pacientes submetidos à cirurgia de aorta. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2013;28(1):10-21.

##### **Organization as Author**

Diabetes Prevention Program Research Group. Hypertension, insulin, and proinsulin in participants with impaired glucose tolerance. *Hypertension*. 2002;40(5):679-86.

##### **No indication of authorship**

21st century heart solution may have a sting in the tail. *BMJ*. 2002;325(7357):184.

##### **Article electronically published before the print version ("ahead of print")**

Atluri P, Goldstone AB, Fairman AS, Macarthur JW, Shudo Y, Cohen JE, et al. Predicting right ventricular failure in the modern, continuous flow left ventricular assist device era. *Ann Thorac Surg*. 2013 Jun 21. [Epub ahead of print]

##### **Online Journal Article**

Machado MN, Nakazone MA, Murad-Junior JA, Maia LN. Surgical treatment for infective endocarditis and hospital mortality in a Brazilian single-center. *Rev Bras Cir Cardiovasc* [online]. 2013[cited 2013 Jun 25];28(1):29-35. Available from: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-76382013000100006&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-76382013000100006&lng=en&nrm=iso)>

##### **Book Chapter**

Chai PJ. Intraoperative myocardial protection. In: Mavroudis C, Backer C, eds. *Pediatric cardiac surgery*. 4th ed. Chichester: Wiley-Blackwell; 2013. p.214-24.

##### **Book**

Cohn LH. *Cardiac surgery in the adult*. 4th ed. New York: McGraw-Hill;2012. p.1472.

**Thesis**

Dalva M. Estudo do remodelamento ventricular e dos anéis valvares na cardiomiopatia dilatada: avaliação anátomo-patológica [Tese de doutorado]. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2011. 101p.

**Legislation**

Conselho Nacional de Saúde. Resolução n. 196, de 10 de outubro de 1996. Dispõe sobre diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. *Bioética*. 1996;4(2 Supl):15-25.

Other examples of references can be found at:

[http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

**Tables and Figures**

Tables and Figures should be numbered according to the order of appearance in the text, with a title and be in separate files. Tables should not contain redundant data already cited in the text. They should be open on the sides and a totally white background.

The abbreviations used in the tables should be listed alphabetically at the bottom, with their forms in full. Likewise, the abbreviations employed in the figures should be explained in the legends.

The figures will be published in color only if the author agrees to bear the cost of printing color pages.

We will only accept images in TIFF or JPEG format with a minimum resolution according to the type of image, both for black and white and for color images.

BJCVS prompts the authors to archive their possession the original images, as if the images submitted online present any impediment to print, we will contact the author to send us these originals.

**Limits by Type of Article**

Aiming at streamlining the space of the journal and allow a higher number of articles per issue, the criteria below outlined should be met according the type of publication. The electronic counting of words should include the home page, abstract, text, references, and figure legends. The titles have a maximum of 100 characters (counting spaces) for Original Articles, Review and Update Articles and Experimental Study and 80 characters (counting spaces) for the other categories.

9. ANEXO 5: Parecer favorável à realização da pesquisa com seres humanos

**DETALHAR PROJETO DE PESQUISA**

---

**- DADOS DA VERSÃO DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: : HEAT SHOCK PROTEIN COMO PONTENCIAL BIOMARCADOR DE PROGNÓSTICO EM PACIENTES SUBMETIDOS A CIRURGIA DE REVASCULARIZAÇÃO DO MIOCÁRDIO COM CIRCULAÇÃO EXTRA-CORPORÉA.  
 Pesquisador Responsável: marcos antonio cantero  
 Área Temática:  
 Versão: 2  
 CAAE: 50344015.8.0000.5160  
 Submetido em: 29/12/2015  
 Instituição Proponente: Faculdade de Ciências da Saúde  
 Situação da Versão do Projeto: Aprovado  
 Localização atual da Versão do Projeto: Pesquisador Responsável  
 Patrocinador Principal: Faculdade de Ciências da Saúde



Comprovante de Recepção:  PB\_COMPROVANTE\_RECEPCAO\_479285

---

**+ DOCUMENTOS DO PROJETO DE PESQUISA**

---

**- LISTA DE CENTROS PARTICIPANTES E COPARTICIPANTES**

Apreciação ↕	CAAE ↕	Pesquisador Responsável ↕	Comitê de Ética ↕	Instituição ↕	Situação ↕	Tipo ↕	R.C ↕
P0c	50344015.8.3001.5404	marcos antonio cantero	5404 - Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp - Campus Campinas	Faculdade de Engenharia de Alimentos	Parecer Consubstanciado Emitido(Aprovado)	Pc	<input checked="" type="checkbox"/>

**GERIR PESQUISA**

---

Para cadastrar um novo projeto, clique aqui: [Nova Submissão](#) Para cadastrar projetos aprovados anteriores à Plataforma Brasil, clique aqui: [Projeto anterior](#)

---

**BUSCAR PROJETO DE PESQUISA:**

Título do Projeto de Pesquisa:  CAAE:

Pesquisador Responsável:  Última Modificação:  Tipo de Projeto:

Palavra-chave:



---

**« SITUAÇÃO DA PESQUISA**

<input checked="" type="checkbox"/> Marcar Todas <input checked="" type="checkbox"/> Aprovado <input checked="" type="checkbox"/> Em Apreciação Ética <input checked="" type="checkbox"/> Em Edição <input checked="" type="checkbox"/> Em Recepção e Validação Documental <input checked="" type="checkbox"/> Não Aprovado - Não Cabe Recurso <input checked="" type="checkbox"/> Não Aprovado na CONEP	<input checked="" type="checkbox"/> Não Aprovado no CEP <input checked="" type="checkbox"/> Pendência Documental Emitida pela CONEP <input checked="" type="checkbox"/> Pendência Documental Emitida pelo CEP <input checked="" type="checkbox"/> Pendência Emitida pela CONEP <input checked="" type="checkbox"/> Pendência Emitida pelo CEP	<input checked="" type="checkbox"/> Recurso Submetido ao CEP <input checked="" type="checkbox"/> Recurso Submetido à CONEP <input checked="" type="checkbox"/> Recurso não Aprovado no CEP <input checked="" type="checkbox"/> Retirado <input checked="" type="checkbox"/> Retirado pelo Centro Coordenador
--	---	--

---

**LISTA DE PROJETOS DE PESQUISA:**

Tipo ↕	CAAE ↕	Versão ↕	Pesquisador Responsável ↕	Comitê de Ética ↕	Instituição ↕	Origem ↕	Última Apreciação ↕	Situação ↕	Ação
Pc	50344015.8.3001.5404	1	marcos antonio cantero	5404 - Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp - Campus Campinas	Faculdade de Engenharia de Alimentos	PO	P0c	Aprovado	
P	50344015.8.0000.5160	2	marcos antonio cantero	5160 - Fundação Universidade Federal da Grande Dourados/UFGD-MS	Faculdade de Ciências da Saúde	PO	PO	Aprovado	

## 10. ANEXO 6: Íntegra do Termo de Consentimento Livre e Consentido

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Em atendimento a RESOLUÇÃO Nº 196/96 Ministério da Saúde

:

O Senhor está sendo convidado a participar do projeto de pesquisa intitulado: **HEAT SHOCK PROTEIN COMO PONTENCIAL BIOMARCADOR DE PROGNÓSTICO EM PACIENTES SUBMETIDOS A CIRURGIA DE REVASCULARIZAÇÃO DO MIOCÁRDIO COM CIRCULAÇÃO EXTRA-CORPORÊA** Sou mestrando do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal da Grande Dourados e pretendo realizar uma pesquisa sobre proteínas produzidas pelo coração durante a cirurgia cardíaca para efeitos de minha Dissertação de Mestrado

A pesquisa estudará a associação de proteínas produzidas durante a cirurgia cardíaca, tentando facilitar o diagnóstico e tratamento de complicações da doença. Sua participação nessa pesquisa consiste no fornecimento dos dados do seu prontuário médico que estão arquivados no Hospital evangélico Sr e Sra. Goldsby King, seus dados pessoais constantes no prontuário e na pesquisa não serão divulgados em nenhum momento o que garante a privacidade e sigilo para o mesmo. Serão realizadas coletas de duas biopsias durante a cirurgia. A biopsia miocárdica no átrio direito não trás prejuízo para seu coração pois não muda a forma nem a maneira dele trabalhar, também não altera do resultado de sua cirurgia. Caso haja alguma complicação advinda do procedimento o senhor(a) será indenizado por todos os danos e custos, bem como, toda a assistência multiprofissional necessária.

Após o levantamento destes dados, será feita uma análise matemática com os mesmos através de programas de computador para identificar se existe relação entre a dosagem desta proteína e os resultados da cirurgia.

Informo que a os benefícios esperados da pesquisa são de facilitar o diagnóstico e tratamento de pacientes submetidos a revascularização do miocárdio. Os riscos na coleta desses dados serão o desconforto de reviver o momento que o senhor recebeu a notícia da necessidade da cirurgia, em qualquer momento que o senhor sentir necessidade pode solicitar apoio para o pesquisador responsável, que ira encaminha-lo para o atendimento especializado (psicológico ou psiquiátrico). A equipe médica é composta por outros cirurgiões que caso haja preferência e vontade de troca pode ser feito a qualquer momento sem prejuízo para seu tratamento.

Um possível risco de constrangimento ou desconforto com o acesso do pesquisador os dados contidos no prontuário será resolvido com a não divulgação dos seus dados pessoais em nenhum momento, mantendo assim o sigilo e sua privacidade. O sigilo será mantido também no momento da divulgação dos resultados da pesquisa. As informações que você der poderão ser divulgadas em relatório ou publicação, sem que seu nome seja citado, garantindo-se o sigilo. Em vez de citar seu nome, usarei um código. O senhor continuará sendo atendido e operado no Hospital Evangélico Sr. e Sra. Goldsby King de Dourados pelo Dr. Marcos Antonio Cantero e/ou membros da equipe caso decida ou não participar da pesquisa. A sua participação neste estudo é voluntária, você tem a liberdade de recusar-se, ou, se vier a participar, desistir quando quiser. A participação no estudo não acarretará custos para você e não será disponível nenhuma compensação financeira adicional. No caso você sofrer algum dano decorrente dessa pesquisa você será indenizado por todos os danos e custos.

A importância da sua participação está na possibilidade fornecer informações sobre a cirurgia cardíaca e suas complicações no período peri-operatório, para entender melhor às alterações que a cirurgia provoca nos pacientes e a maneira de as tratar e diminuí-las.

Este convite contém duas vias, ficando uma com o senhor e outra com o pesquisador.

O senhor poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa para tirar suas dúvidas ou para obter esclarecimentos sobre a pesquisa, através do telefone (67) 3410-2328, ou no endereço Rodovia Dourados-Itaum, km 12, Cidade Universitária ou com o pesquisador responsável através do telefone (67) 81115111, no ambulatório de cirurgia cardíaca do Hospital Evangélico Sr. E Sra. Goldsby King de Dourados no endereço Rua Hilda Bergo Duarte No. 81, telefone (67) 34117825.

---

Declaro que fui esclarecido e livremente aceito o convite para participar da pesquisa fornecendo os dados de meu prontuário:

Nome completo: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

RG: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

Marcos Antonio Cantero: \_\_\_\_\_ (Pesquisador responsável)

R. Firmino Vieira de Matos nº 1309 – CEP 79825050/Dourados – MS/Telefones (067) 81755005/34216641

Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UFGD - Rodovia Dourados - Itaum, km 12, Dourados/MS - CEP: 79.804-970