

MARCELO GENTIL ALMEIDA GUEDES

**Avaliação do processo inflamatório induzido pela
circulação extracorpórea em fetos de ovinos
submetidos ao pré-condicionamento isquêmico remoto**

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

Programa de Cirurgia Torácica e Cardiovascular
Orientador: Prof. Dr. Renato Samy Assad

São Paulo

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Guedes, Marcelo Gentil Almeida

Avaliação do processo inflamatório induzido pela
circulação extracorpórea em fetos de ovinos
submetidos ao pré-condicionamento isquêmico remoto
/ Marcelo Gentil Almeida Guedes. -- São Paulo, 2019.

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

Programa de Cirurgia Torácica e Cardiovascular.
Orientador: Renato Samy Assad.

Descritores: 1.Cirurgia cardíaca 2.Cardiolgia
fetal 3.Circulação extracorpórea 4.Feto
5.Precondicionamento isquêmico 6.Isquemia
7.Reperfusão 8.Placenta 9.Inflamação 10.Ovinos

USP/FM/DBD-028/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese aos pacientes que confiaram a mim suas vidas e que depositaram suas esperanças nas minhas mãos e no meu caráter.

Dedico, também, aos pequenos seres humanos portadores de cardiopatias congênitas complexas, com a esperança de que esta tese contribua para o aprimoramento dos caminhos do tratamento intrauterino.

AGRADECIMENTOS

Gratidão pela vida.

Agradeço a todos com quem convivo e convivi nestas mais que cinco décadas de vida, pelos exemplos de resiliência, compreensão frente às minhas limitações, erros e defeitos. Muitos me perdoaram, me ensinaram e me têm afeto;

Ao Professor Gentil Garcia Guedes, meu pai. O senhor nunca morrerá de fato enquanto eu carregar comigo seus genes e alguns dos seus dons. Sei que, de onde esteve, acompanhou os passos deste seu filho, sempre;

A minha mãe, Maria da Glória Almeida Guedes. Não há palavras a altura do seu sacrifício por seus filhos. Não há amor que suplante o de mãe. Sem o seu exemplo, eu nunca seria quem sou. Onde estiver, sei que está orgulhosa;

A minha segunda mãe, Profa. Dra. Maria Luíza Dória Almeida. Você foi minha mestra e minha amiga. Uma luz para a minha formação profissional, intelectual, moral e espiritual;

A Profa. Dra. Kildane Maria Almeida Guedes, minha única irmã. Pelo apoio, carinho e amizade;

A Karoline Guedes Mesquita Salviano, sobrinha e afilhada. Terceira geração de Médicos da família. Pela atenção e carinho.

A família que formei.

Minha esposa Cleide Campoy. Sem dúvida foi o apoio mais direto e constante para que eu fizesse este doutorado;

Meu filho Caio Marcelo Campoy Guedes. Pelo homem de bom coração, mente e espírito serenos. Aprendi, também, a pesquisar com meu cientista da computação;

A Vítor Henrique Campoy Guedes, meu segundo filho. Orgulho de ver a evolução do meu sucessor no exercício da medicina.

Gratidão pela oportunidade.

Prof. Dr. **Renato Samy Assad**, meu Orientador. O senhor me deu a oportunidade de compartilhar a evolução de uma das suas linhas de pesquisa. Foi uma tarefa grande, difícil e exaustiva. Obrigado pela confiança, paciência e pelos muitos ensinamentos.

Prof. Dr. **Luíz Felípe Pinho Moreira**. Sou admirador do vosso senso crítico, do raciocínio lúcido e objetivo. Obrigado pela honestidade e pelos inúmeros ensinamentos;

Profa. Dra. **Paulína Sannomiya**. Trabalhamos juntos no início desta trajetória para montar o projeto desta tese. Aparou arestas, harmonizou pessoas e fomentou oportunidades. Foi uma verdadeira madrinha neste doutorado;

Profa. Dra. **Vera Demarchi Aiello**. Vossa orientação lúcida e concisa nos permitiu focar no possível, diante das inúmeras possibilidades. Foram decisões difíceis, posto o ineditismo da pesquisa;

Dr. **Fernando Luíz Zanoni**. Exemplo de pesquisador. Exímio Médico Veterinário ao lidar com nossas ovelhas. Sem vossa perícia e organização, certamente não conseguiríamos concluir as cirurgias deste projeto;

Dra. **Ana Crística Breithaupt Faloppa**. Pela busca de meios e modos para estudar a inflamação em ovinos. Pela orientação durante o processamento e análise das nossas amostras;

Aos colegas **Ana Crística Alíman Arashiro e Petronio Generoso Thomaz**. Companheiros dos procedimentos cirúrgicos, estivemos juntos desde os primeiros estudos pilotos. Sem vossas presenças, muitos experimentos não seriam exequíveis. Gratidão imensa pelos incentivos e solidariedade;

Ao Bolsista FAPESP de iniciação científica e Acadêmico de Medicina, Marcelo Vaidotas Pinto. Vossa ampla participação nesta pesquisa foi fundamental para que metas difíceis fossem alcançadas;

A Raphael dos Santos Coutinho e Silva, pesquisador do Laboratório de Investigação Médica da Faculdade de Medicina da USP. Pela competência no cuidado com as amostras fetais e na participação direta nas coletas de dados;

Aos competentes perfusionistas Ana Paula Noronha da Silva e Giuliano Gentile Padilha da Silva. Pela colaboração no desenvolvimento do mini circuito para circulação extracorpórea fetal;

A Banca avaliadora da Qualificação, Profs. Alfredo Inácio Fiorelli, Marcelo Bísceglí Jatene e Luiz Felipe Pinho Moreira, pela assertividade das sugestões pertinentes e estímulo para a lapidação desta Tese;

Aos colegas pesquisadores do Laboratório de Investigação Médica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, aos funcionários da Cirurgia Experimental do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas – InCor e as minhas incentivadoras e apoiadoras da secretaria da Pós-Graduação. Sem vosso empenho e apoio, não teria conseguido cumprir esta caminhada;

A Diretoria da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e do Instituto do Coração. Sem a fortaleza destas instituições nada seria possível. Tenho orgulho de ter sido acolhido nestas casas;

A Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo, por financiar este projeto. Sem a força motriz deste Estado de São Paulo, eu não existiria como especialista e como pesquisador. Meu amor por esta Terra.

“Cuidado com gente que não tem dúvida.

Gente que não tem dúvida não é capaz de inovar, de reinventar, não é capaz de fazer de outro modo.

Gente que não tem dúvida só é capaz de repetir.”

“Quem sabe, divide.

Quem não sabe, pergunta.”

Mário Sérgio Cortella

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A.L.Freddi, Maria F.Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

Lista de figuras**Lista de tabelas****Resumo****Summary**

1	INTRODUÇÃO.....	01
1.1	Patogênese das cardiopatias congênitas.....	05
1.2	Benefício Terapêutico.....	07
1.3	Circulação Extracorpórea Fetal e Síndrome da Resposta Inflamatória.....	08
1.4	Síndrome da Resposta Inflamatória e Pré-Condicionamento Isquêmico.....	16
2	OBJETIVOS.....	24
2.1	Objetivo primário.....	25
2.2	Objetivo secundário.....	25
3	MÉTODO.....	26
3.1	Grupo Controle negativo.....	27
3.2	Grupo Controle positivo.....	28
3.3	Grupo Pré-condicionado (PCIR).....	29
3.4	Anestesia.....	30
3.5	Procedimento.....	32
3.6	Instalação da CEC fetal.....	33
3.7	Coleta de Amostras Sanguíneas.....	36
3.8	Avaliação do Processo Inflamatório.....	36
3.8.1	Avaliação Histológica.....	36
3.8.1.1	Avaliação Histológica dos Pulmões.....	37

3.8.1.2	Avaliação Histológica da Placenta.....	39
3.8.2	Avaliação Imuno-Histoquímica.....	39
3.8.3	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA).....	40
3.9	Análise estatística.....	41
4	RESULTADOS.....	42
4.1	Avaliação hemodinâmica.....	43
4.2	Avaliação Metabólica.....	46
4.3	Avaliação do processo inflamatório.....	51
4.3.1	Avaliação Histológica.....	51
4.3.2	Imuno-histoquímica da Placenta – Interstício.....	55
4.3.3	Imuno-histoquímica da Vasculatura Placentária.....	58
4.3.4	Imuno-histoquímica dos Pulmões Fetais.....	61
4.3.5	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA).....	64
5	DISCUSSÃO.....	71
5.1	Pré-condicionamento isquêmico remoto.....	73
5.2	Mini Circuito da CEC.....	74
5.3	Hemodinâmica Fetal.....	77
5.4	Metabolismo Fetal.....	79
5.5	Processo Inflamatório Fetal.....	80
5.6	Limitações do Estudo.....	83
5.7	Implicações Clínicas.....	85
5.8	Perspectivas de futuro.....	86
6	CONCLUSÕES.....	89

7	ANEXOS.....	91
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	130

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Tromboxane e prostaglandina E2.....	11
Figura 2	Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica.....	13
Figura 3	Mecanismos dependentes do endotélio.....	17
Figura 4	Mecanismos de amplificação de resposta inflamatória local.....	18
Figura 5	Fluxograma do pré-condicionamento isquêmico remoto.....	20
Figura 6	Mecanismos neuronal e humoral de proteção remota.....	21
Figura 7	Mecanismo humoral de proteção remota do miocárdio.....	22
Figura 8	Cronograma do grupo Controle negativo.....	28
Figura 9	Cronograma do grupo Controle positivo.....	29
Figura 10	Cronograma do grupo Pré-condicionado.....	30
Figura 11	Anestesia peridural da ovelha.....	31
Figura 12	Cateterismo dos vasos axilares fetais.....	32
Figura 13	Exposição do coração fetal por toracotomia mediana.....	33
Figura 14	Bomba Rotaflow da circulação extracorpórea fetal.....	35
Figura 15	Mini-circuito da circulação extracorpórea fetal.....	35
Figura 16	Fotomicrografia do pulmão fetal.....	38
Figura 17	Frequência Cardíaca dos fetos.....	43
Figura 18	Pressão arterial média dos fetos.....	44
Figura 19	Fluxo sanguíneo da circulação extracorpórea.....	45
Figura 20	pH dos fetos.....	46
Figura 21	Pressão de oxigênio arterial dos fetos.....	47
Figura 22	Pressão de dióxido de carbono arterial dos fetos.....	48
Figura 23	Saturação de oxigênio arterial dos fetos.....	49

Figura 24	Bicarbonato de Sódio arterial dos fetos.....	50
Figura 25	Lactato arterial dos fetos.....	51
Figura 26	Percentual da espessura das arteríolas bronquiolares fetais....	52
Figura 27	Percentual da área dos septos interlobulares dos pulmões fetais.....	53
Figura 28	Fração da área dos núcleos das células placentárias.....	54
Figura 29	Fração da área dos vasos placentários.....	55
Figura 30	Valores percentuais ICAM-1(interstício placenta).....	56
Figura 31	Valores percentuais VCAM-1(interstício placenta).....	57
Figura 32	Valores percentuais receptor TLR (interstício placenta).....	58
Figura 33	Valores percentuais ICAM-1 (vasculatura placentária).....	59
Figura 34	Valores percentuais VCAM-1 (vasculatura placentária).....	60
Figura 35	Valores percentuais receptor TLR (vasculatura placentária).....	61
Figura 36	Valores percentuais ICAM-1 (Pulmões).....	62
Figura 37	Valores percentuais VCAM-1 (Pulmões).....	63
Figura 38	Valores percentuais receptor TLR (Pulmões).....	64
Figura 39	Valores séricos de Tromboxana fetal.....	65
Figura 40	Valores séricos de Prostaglandina E2 fetal.....	66
Figura 41	Valores séricos de TNF- α fetal.....	67
Figura 42	Valores séricos de Interleucina-1 fetal.....	68
Figura 43	Valores séricos de Interleucina-6 fetal.....	69
Figura 44	Valores séricos de Interleucina-10 fetal.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Cardiopatias congênitas passíveis de tratamento pré-natal.....	04
Tabela 2	Peso dos animais.....	27
Tabela 3	Coleta de amostras para avaliar gases sanguíneos fetais	36

LISTA DE ABREVIATURAS

C: Complemento

C3a: Complemento 3 ativado

C5a: Complemento 5 ativado

CEC: Circulação extracorpórea

COBEA: Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

COX: Ciclooxygenase

ELISA: Ensaio de Imunoadsorção Enzimática

HE: Hematoxilina-Eosina

ICAM: Molécula de Adesão Intercelular (ou CD54)

IL-1 β : Interleucina 1-Beta

IL-6: Interleucina 6

IL-10: Interleucina 10

I/R: Isquemia/Reperusão

LTB4: Leucotrieno B4

LPS: Lipopolissacárides

NF-K β : Fator nuclear Kappa B

NO: Óxido Nítrico

PaCO₂: Pressão parcial de dióxido de carbono arterial

PAF: Fator de ativação plaquetária

PaO₂: Pressão parcial de oxigênio arterial

PCIR: Pré-condicionamento isquêmico remoto

PECAM: Molécula de adesão celular endotelial plaquetária

PGE: Prostaglandina

pH: Potencial de íons hidrogênio

SRIS: Síndrome da resposta inflamatória sistêmica

SIV: Septo Interventricular

TBX: Tromboxana

TLR: Receptor Toll-Like

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa

VCAM: Molécula de Adesão Vascular

Guedes MGA. *Avaliação do processo inflamatório induzido pela circulação extracorpórea em fetos de ovinos submetidos ao pré-condicionamento isquêmico remoto* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

Fundamentos: A Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SRIS) permanece como uma das principais causas de disfunção de órgãos associada à circulação extracorpórea (CEC) na maioria dos pacientes submetidos à cirurgia cardíaca, especialmente em neonatos submetidos à correção de cardiopatias congênitas com auxílio de CEC. A circulação extracorpórea (CEC) neonatal é uma ferramenta essencial para a correção cirúrgica de grande parte das cardiopatias congênitas. Apesar dos avanços importantes na técnica, a CEC geralmente promove uma lesão multi-órgãos, cujo mecanismo inclui a lesão de isquemia-reperfusão (IR) e a resposta inflamatória sistêmica. Na arena clínica, a complicação mais importante pós-CEC neonatal consiste na lesão pulmonar e a disfunção respiratória, com consequente congestão vascular pulmonar e aumento do líquido intersticial. No cenário fetal, a disfunção placentária representa a principal causa de morbi-mortalidade durante e após a CEC fetal. O pré-condicionamento isquêmico remoto (PCIR) tem sido aplicado como alternativa terapêutica capaz de mitigar os danos teciduais consequentes ao processo inflamatório desencadeado pela lesão de IR e proteger tecidos à distância da isquemia subsequente. No entanto, o impacto desta estratégia não foi ainda demonstrado na CEC fetal, para determinar se esta forma de intervenção terapêutica não-invasiva poderia oferecer uma proteção multi-órgãos fetais, como os pulmões e a placenta. **Objetivo:** Testar a hipótese de que o PCIR em fetos de ovinos submetidos a CEC reduz a inflamação sistêmica fetal e a disfunção placentária. **Método:** Foram estudados 18 fetos de ovinos com pesos comparáveis ($p > 0,87$), divididos em 3 grupos: Controle Negativo ($2,68\text{kg} \pm 0,2\text{kg}$), CEC simples, isto é, fetos submetidos à CEC sem PCIR ($2,98\text{kg} \pm 0,4\text{kg}$) e Grupo PCIR, que contempla fetos submetidos ao PCIR antes de serem submetidos à CEC ($2,96\text{kg} \pm 0,4\text{kg}$). O PCIR foi realizado antes da manipulação cirúrgica fetal, com quatro ciclos de isquemia intermitente de um dos membros traseiros (cinco minutos de garroteamento do membro, alternados com dois minutos de reperfusão). Ambos os grupos de estudo foram submetidos à CEC normotérmica durante 30 minutos. O perfusato foi composto de Ringer simples ($61,33\text{ ml} \pm 6,57\text{ ml}$) aquecido (38°C). Os fetos foram monitorizados durante 120 minutos

após a CEC. Foram analisados os marcadores inflamatórios sistêmicos fetais, trocas gasosas através da placenta e alterações morfológicas da placenta e dos pulmões fetais. **Resultados:** Foi observada uma queda progressiva da pressão arterial sistêmica dos animais do grupo CEC simples ao longo do protocolo em relação ao grupo Controle Negativo ($p=0,006$). O grupo PCIR não diferiu dos demais grupos ($p<0,53$). O maior fluxo sanguíneo da CEC fetal foi atingido no grupo PCIR ($191,4 \pm 36 \text{ ml.min}^{-1}.\text{Kg}^{-1}$), quando comparado ao grupo CEC simples ($137,0 \pm 16,3 \text{ ml.min}^{-1}.\text{Kg}^{-1}$; $p=0,0002$). Quanto à função placentária, a partir do estabelecimento da CEC, ambos os grupos de estudo (Controle Positivo e PCIR) evoluíram com uma queda significativa da saturação de oxigênio arterial em relação ao grupo Controle Negativo ($p<0,04$), sendo pior no grupo CEC simples em relação ao grupo PCIR ($p=0,02$). Em relação à avaliação metabólica, os animais submetidos a CEC, com ou sem PCIR, desenvolveram acidose mista progressiva ($p<0,0001$), níveis inferiores de bicarbonato de Sódio ($p<0,0001$) e hiperlactatemia ($p<0,0003$), quando comparados ao grupo Controle Negativo. A avaliação histológica dos pulmões não evidenciou diferenças significativas em relação ao edema interlobular ($p=0,589$), porém foi observado maior espessamento de parede das arteríolas bronquiolares no grupo da CEC simples, quando comparadas aos demais grupos ($p=0,009$). A avaliação imuno-histoquímica do receptor *Toll-Like-4* (TLR-4) e das moléculas de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e vascular-1 (VCAM-1) nos pulmões fetais não evidenciou diferenças significativas entre os grupos. Em relação à placenta, houve um adensamento da fração de área dos núcleos das células similar entre os três grupos ($p=0,91$). Entretanto, foi observado um menor percentual de área de vasculatura intersticial no grupo CEC simples, sinal indireto de maior edema placentário neste grupo ($p<0,04$). A análise imuno-histoquímica dos marcadores inflamatórios ICAM-1, VCAM-1 e TLR-4 no interstício placentário também não evidenciou diferenças significativas entre os grupos no momento final do protocolo, embora tenha sido observada maior expressão da molécula ICAM-1 na vasculatura placentária de ambos os grupos de estudo. Os níveis séricos dos marcadores pró-inflamatórios tromboxana A2 e Interleucina-1 do grupo PCIR foram significativamente menores que aqueles do grupo CEC simples, uma hora após a CEC ($p<0,01$). Os valores séricos da Prostaglandina E2 e Interleucina-6 do grupo PCIR foram significativamente maiores que os valores do grupo CEC simples, também uma hora após a CEC ($p=0,02$). Os marcadores pró-inflamatórios Interleucina-10 e Fator de Necrose Tumoral Alfa não apresentaram variações significativas entre os grupos ou durante os diversos tempos do protocolo ($p>0,08$). **Conclusão:** O PCIR preservou melhor a hemodinâmica fetal, permitindo maior fluxo

sanguíneo durante a CEC fetal. A expressão dos marcadores inflamatórios nos tecidos pulmonar e placentário, após a CEC fetal, não foi modificada pelo PCIR, embora o grupo PCIR tenha apresentado menores valores séricos de marcadores pró-inflamatórios tromboxana A2 (TXA2) e interleucina-1 (IL-1 β). Paradoxalmente, o PCIR não impediu a elevação dos marcadores pró-inflamatórios Interleucina-6 e Prostaglandina E2. Esta forma de terapia não invasiva, PCIR, não impediu a disfunção placentária nem a hipoperfusão tecidual em fetos de ovinos submetidos à circulação extracorpórea, embora o edema placentário e a saturação de oxigênio tenham sido melhor preservados nos fetos submetidos ao PCIR.

Descritores: cirurgia cardíaca; cardiologia fetal; circulação extracorpórea; feto; condicionamento isquêmico, isquemia; reperfusão; placenta; inflamação; ovinos.

Guedes MGA. *Assessment of inflammatory process induced by extracorporeal circulation in fetal lambs submitted to remote ischemic preconditioning* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2019

Background: Systemic inflammatory response Syndrome (SIRS) remains one of the major causes of cardiopulmonary bypass (CPB) associated organ injury in the majority of patients undergoing cardiovascular surgery, especially in neonates submitted to surgical correction of congenital heart lesions with CPB support. Despite significant advances in the technique, CPB is still complicated by multisystem injury, the mechanisms of which include ischemia–reperfusion (IR) injury and a detrimental systemic inflammatory response. In the clinical arena, pulmonary injury and dysfunction remain important complication after CPB, with consequent pulmonary vascular congestion and increase in interstitial fluid. In the fetal scenario, placental dysfunction remains the major cause of mortality during and after fetal CPB. Remote ischemic preconditioning (RIPC) has been applied as an alternative therapy to attenuate tissue injury related to the effects of inflammatory mediators triggered by IR injury. The preconditioning stimulus has systemic effects to protect distant tissues from subsequent ischemia. At the present, the impact of this strategy has not been yet demonstrated on fetal CPB, to determine whether this non-invasive therapeutic intervention can offer fetal multi-organ protection, such as the lungs and placenta.

Objective: To test the hypothesis that RIPC applied to fetal lambs under CPB reduces fetal systemic inflammation and placental dysfunction. **Method:** 18 fetal lambs with comparable weights ($p > 0.87$) were divided into 3 groups: Negative Control ($2.68\text{kg} \pm 0.2\text{kg}$), Sham (CPB without RIPC; $2.98\text{kg} \pm 0.4\text{kg}$) and RIPC Group (CPB plus RIPC; $2.96\text{kg} \pm 0.4\text{kg}$). RIPC stimulus was applied prior to fetal surgical manipulation, with tourniquet occlusion of blood flow to one hind limb with four cycles of 5-minute occlusion followed by 2-minute reperfusion. Animals from both study groups underwent 30 minutes of normothermic CPB. Blood-free priming solution consisted of only warm Ringer Solution ($61.33\text{ ml} \pm 6.57\text{ ml}$; 38°C). Fetuses were monitored for 120 minutes after CPB. Fetal systemic inflammatory markers, fetal gas exchange, and morphological changes of the placenta and fetal lungs were assessed. **Results:** There was a progressive decrease of the systemic blood pressure in the Sham group throughout the protocol, as compared to Negative Control group ($p = 0.006$). The RIPC group did not differ from the other groups ($p < 0.53$). Animals from the RIPC group reached highest blood flow during CPB ($191.4 \pm 36.0\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{Kg}^{-1}$), when compared to Sham group ($137.0 \pm 16.3\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{Kg}^{-1}$; $p = 0.0002$). Regarding placental function,

both groups (Sham and RIPC) developed a significant decrease in arterial oxygen saturation since the very beginning of CPB, as compared to the Negative Control group ($P < 0.04$). That change was even worse in the Sham group, when compared to PCIR group ($p = 0.02$). Concerning metabolic assessment, the animals from both study groups developed progressive mixed acidosis ($p < 0.0001$), lower levels of sodium bicarbonate ($p < 0.0001$) and hyperlactatemia ($p < 0.0003$), when compared to Negative Control group. Histological assessment of fetal lungs did not show significant differences of interlobular inflammatory edema among the three groups ($p > 0.05$), although the animals from Sham group presented increased thickness of the bronchiolar arterioles, when compared to the other groups ($p = 0.009$). Fetal lung immunohistochemical assessment of Toll-Like Receptor-4 (TLR-4), as well as the intercellular adhesion molecule ICAM-1 and the vascular adhesion molecule VCAM-1 did not show significant differences among the three groups. Regarding the area fraction of the placental cellular nuclei, there was no significant differences among the three groups ($p = 0.91$). However, Sham group presented with a smaller area fraction of interstitial vasculature, an indirect signal of increased placental edema ($p < 0.04$). The analysis of placental interstitial inflammatory markers ICAM-1, VCAM-1 and TLR-4 did not show significant differences among the three groups at the end of the protocol, although an increased expression of ICAM-1 was observed in the placental perivascular area of both study groups. The pro-inflammatory thromboxane A₂ and interleukin-1 levels were significantly lower in the RIPC group than in Sham group, at 60-minute post-CPB ($p < 0.01$). Prostaglandin E₂ and interleukin-6 levels were significantly higher in the RIPC group than in the Sham group at 60-minute post-CPB ($p = 0.02$). Tumor necrosis factor- α and interleukin-10 did not show significant differences among the three groups nor throughout the protocol ($p > 0.08$). **Conclusion:** RIPC better preserved fetal hemodynamics, allowing for increased blood flow during fetal CPB. The expression of inflammatory markers on placenta and fetal lungs were not modified by RIPC after CPB, although the RIPC group presented with lower values of pro-inflammatory markers thromboxane A₂ and Interleukin-1. Paradoxically, the RIPC did not prevent the increase of the pro-inflammatory markers interleukin-6 and Prostaglandin E₂. The RIPC non-invasive therapy did not prevent placental dysfunction or tissue hypoperfusion in fetal lambs under CPB, although placental edema and oxygen saturation were better preserved in fetuses submitted to RIPC.

Descriptors: cardiac surgery; fetal cardiology; extracorporeal circulation; fetal; ischemic preconditioning; ischemia; reperfusion; placenta; inflammation; ovine.

As cardiopatias congênitas são definidas como defeitos cardíacos estruturais de câmaras, vasos da base, valvas, tecido condutor e/ou coronárias, estabelecidos durante o desenvolvimento deste órgão. As cardiopatias congênitas representam o maior problema de saúde global. A incidência de cardiopatias congênitas varia entre 6 a 9 por 1000 nascidos vivos¹. Os defeitos cardiovasculares são os mais comuns (28%) dentre todos os defeitos congênitos maiores e determinam maior incidência de óbitos dentre as malformações observadas ao nascimento.² As cardiopatias congênitas complexas representam 25% dos defeitos cardiovasculares e podem se manifestar clinicamente ainda na vida intrauterina ou, mais frequentemente, no período neonatal precoce (0 a 6 dias de vida), quando cursam com elevada morbimortalidade e permanência prolongada em unidade de terapia intensiva.^{3,4} Segundo a Organização Mundial de Saúde, os defeitos cardíacos congênitos respondem por 42% dos óbitos infantis e se tornaram a principal causa de mortalidade infantil.⁵ Por estas características peculiares desta população, são observados altos custos com diagnóstico e terapêutica, ainda que os neonatos acometidos recebam intervenção precoce em centros de excelência. Segundo Pinto Jr. et al, estima-se uma demanda de 28.846 novos casos de cardiopatias congênitas no Brasil por ano. Em torno de 20% dos casos, a cura é espontânea, estando relacionada a defeitos menos complexos e de repercussão hemodinâmica discreta. A necessidade média de cirurgia cardiovascular em congênitos no Brasil é da ordem de 23.077 procedimentos/ano, fazendo parte desta estimativa, além dos novos nascimentos com cardiopatia congênita, as reintervenções. Existe uma

demanda reprimida estimada em 65% dos casos novos. Somente no estado de São Paulo, existe uma demanda de aproximadamente 5.400 cirurgias cardíacas pediátricas por ano, com um déficit de aproximadamente 2.300 cirurgias anuais.⁶

A busca por menor morbimortalidade nas intervenções cirúrgicas é constante e disseminada por todas as áreas do conhecimento científico. Determinadas cardiopatias congênitas complexas têm apresentado melhor resultado terapêutico por meio de uma abordagem mais precoce e intervencionista. Desde a década de 80, tem-se buscado intervir de modo cada vez mais precoce. Para se atingir tais objetivos, intervenções diversas têm sido indicadas no período neonatal e, de forma ainda restrita, no feto cardiopata. O maior domínio da proteção do miocárdio imaturo, da hipotermia profunda e da parada circulatória viabilizou o tratamento cirúrgico definitivo nos primeiros dias de vida, permitindo desenvolvimento cardíaco pós-natal adequado, evitando-se assim as sequelas da cianose crônica e hiperfluxo pulmonar, com o restabelecimento da fisiologia e anatomia cardiovascular normal no período neonatal. Entretanto, apesar dessa abordagem precoce, ainda existem pacientes portadores de lesões cardíacas complexas que perdem a oportunidade do tratamento cirúrgico no momento adequado ou são submetidos a diversas cirurgias paliativas, evoluindo com prognóstico incerto em longo prazo. Neste sentido, a intervenção cardíaca durante a vida intrauterina pode suprir esta importante lacuna.^{7,8,9}

A experiência acumulada com o ecocardiograma fetal tem proporcionado um melhor entendimento da história natural de cardiopatias detectadas no útero.¹⁰ Atualmente, várias cardiopatias congênitas podem ser

precisamente diagnosticadas pelo ecocardiograma em torno da 18^a semana de gestação através da parede abdominal ou até mesmo em torno de 11 a 13 semanas de gestação pela via transvaginal.¹¹ De um modo geral, o exame é realizado entre 16 e 24 semanas de gestação. Portanto, há uma boa janela para a intervenção fetal entre 20 a 26 semanas de gestação. Em 2014, Yaun propôs uma atualização sobre intervenções terapêuticas aplicáveis a fetos com defeitos cardíacos congênitos.¹² Exemplos incluem a síndrome da hipoplasia de câmaras esquerdas com septo atrial íntegro ou restritivo, obstruções da via de saída dos ventrículos, como a estenose aórtica grave ou atresia pulmonar com septo interventricular íntegro (Tabela 1).

Tabela 1- Cardiopatias congênitas passíveis de tratamento pré-natal

Hipofluxo direito:	- Estenose pulmonar grave com SIV íntegro - Doença de Ebstein
Hipofluxo esquerdo:	- Estenose aórtica grave - Forame oval restritivo ou ocluído
Arritmias fetais:	- Bloqueio átrio-ventricular total

SIV = septo interventricular

Distúrbios do ritmo cardíaco fetal, como o bloqueio atrioventricular total congênito, também continuam sendo uma afecção problemática, principalmente quando associados a frequências cardíacas muito baixas (menores que 50 bpm) e hidropisia fetal, com mortalidade fetal e neonatal elevadas.^{13,14} Quando houver evidências ecocardiográficas de deterioração dos parâmetros hemodinâmicos, desenvolvimento ou aumento da hidropisia, apesar da administração de dexametasona ou salbutamol, o próximo passo

lógico deve ser o implante de marcapasso pré-natal.^{15,16} Entretanto, para se considerar a intervenção pré-natal nesses fetos, o diagnóstico e encaminhamento precoces são imperativos.¹⁷ O ecocardiograma fetal permite distinguir aquelas cardiopatias que poderiam eventualmente ser abordadas através da intervenção intrauterina, auxiliando não apenas no manuseio clínico do feto, como também na decisão da via do parto e o planejamento do mesmo em centro de alta complexidade para tratamento especializado.^{18,19,20}

Em 2016, Riera-Kinkel propôs a expressão “a terceira onda da cirurgia cardíaca”, vivida na atualidade, como a etapa da explosão tecnológica, que se inicia com os procedimentos toracoscópicos e posteriormente com o uso da robótica, firmando o conceito de reduzir o trauma cirúrgico com cirurgias minimamente invasivas.²¹ Paralelamente, estabeleceram-se os procedimentos híbridos para tratar determinadas cardiopatias congênitas e, finalmente, a cirurgia cardíaca intrauterina como alternativa interessante a partir do momento em que o procedimento se torna factível para fetos com elevado risco de óbito pela cardiopatia congênita. O objetivo principal de intervenção pré-natal consiste na reversão do processo patológico, para preservar ou recuperar a estrutura cardíaca e sua função, modificando assim a história natural da cardiopatia, de modo que a gravidade da doença pós-natal seja substancialmente reduzida.

1.1 Patogênese das cardiopatias congênitas

Ao se considerar a intervenção intrauterina, é importante citar os possíveis mecanismos envolvidos na patogênese das cardiopatias congênitas,

fisiologia cardiovascular fetal normal e as alterações hemodinâmicas que podem ocorrer com as anomalias cardíacas congênitas. De acordo com a teoria da moldagem hemodinâmica, existe uma relação entre a forma e a função do coração fetal em crescimento, principalmente nos últimos estágios do desenvolvimento fetal.²² A formação intrauterina normal do sistema cardiovascular está intimamente relacionada com o estímulo pressórico e volumétrico da corrente sanguínea nas paredes do coração fetal, contribuindo para o tamanho e posição dos grandes vasos, dimensões das câmaras cardíacas, e até mesmo para o tamanho do orifício valvar. Os defeitos primários são estabelecidos durante a morfogênese cardíaca, isto é, durante as oito primeiras semanas de vida intrauterina.^{23,24} Portanto, qualquer obstrução intracardíaca, seja no nível do forame oval, ductus arteriosus, ou valvas cardíacas ou até mesmo uma complacência ventricular diminuída, podem alterar dramaticamente o volume de sangue através das câmaras cardíacas. Os defeitos secundários são consequência de um fluxo sanguíneo inadequado, somado a outros mecanismos (pressão e volume).^{25,26} Esta situação gera uma lesão secundária gradual e progressiva que se manifesta tardiamente, alterando significativamente a anatomia pós-natal. O grau de hipoplasia da estrutura afetada representa o principal fator determinante do insucesso após a intervenção neonatal convencional. Infere-se dos conceitos de defeitos primário e secundário que intervenções sobre os defeitos primários podem minimizar os defeitos secundários.

Vários centros de pesquisa buscam maximizar a sobrevida dos pacientes portadores de cardiopatias congênitas complexas. O embasamento racional aponta para a abordagem terapêutica intra-uterina como estratégia a

ser aplicada. O tratamento durante o estágio inicial de desenvolvimento pode representar maior chance de sobrevida para estes pacientes. Muitas destas lesões complexas, como as hipoplasias ventriculares ou dos grandes vasos, são sequelas de lesões primárias relativamente simples, que ocorrem precocemente no desenvolvimento fetal. Caso estas lesões sejam abordadas e corrigidas ainda na vida intrauterina, complicações secundárias poderiam ser evitadas, com melhora significativa do prognóstico do paciente após o nascimento. Entretanto, a cirurgia cardíaca fetal ainda não se consagrou como método padronizado de tratamento. Infelizmente, poucos são os centros referenciais no nosso país. As intervenções precoces via cateter e a triagem por ultrassonografia não são universais num país de dimensões continentais. Nesta população de doentes, buscam-se intervenções capazes de sustar ou minimizar os danos secundários à patologia inicial, através de técnicas menos agressivas para os tecidos, com menor resposta inflamatória sistêmica. As intervenções por cateteres já são realidade; resta superar as barreiras para a implementação da cirurgia cardíaca fetal.

1.2 Benefício Terapêutico

Durante a fase embrionária, o grau de divisão celular do miocárdio é elevado. Esta maior capacidade mitótica das células cardíacas fetais proporcionaria melhor crescimento de câmaras ventriculares hipoplásicas após intervenção intrauterina. Por outro lado, após o nascimento, a maior parte do

crescimento ventricular ocorre por hipertrofia celular. Portanto, com o restabelecimento do fluxo intra-cardíaco normal durante a vida fetal, haveria uma maior possibilidade de se recuperar a anatomia da câmara afetada devido a este potencial hiperplásico. Da mesma forma, estudos da circulação coronariana fetal mostraram que, quando o ventrículo direito fetal foi submetido à sobrecarga pressórica, ocorreu maior desenvolvimento do leito vascular coronariano em resposta a este estímulo.²⁷ Quando esta mesma sobrecarga foi aplicada no ventrículo do neonato, a possibilidade de aumento da vascularização coronariana foi menor que aquela observada na vida fetal.²⁸ Portanto, existem motivos anatômicos e fisiológicos para se considerar a intervenção intrauterina em relação à terapêutica neonatal convencional, principalmente em lesões associadas a hipoplasia ventricular, devido ao potencial de crescimento e desenvolvimento das estruturas fetais.

1.3 Circulação Extracorpórea Fetal e Síndrome da Resposta Inflamatória

As pesquisas em cirurgia cardíaca fetal foram iniciadas há quase quatro décadas.^{29,30} Como consenso geral, as intervenções cardíacas via cateter são estratégias lógicas para tratar determinadas cardiopatias congênitas (Tabela 1; recomendação classe IIb; nível de evidência, B / C). Entretanto, certamente, não são absolutamente resolutivas.

Intervenções intra-cardíacas, sob visão direta, poderão ser imperativas quando outro método não for aplicável, como por exemplo na atresia pulmonar com septo ventricular íntegro, estenose aórtica grave, tetralogia de Fallot com agenesia da valva pulmonar e doença de Ebstein com grave insuficiência tricúspide e cardiomegalia importante, com consequente compressão do parênquima pulmonar fetal. A primeira aplicação da circulação extracorpórea (CEC) fetal em humanos foi realizada na Universidade de Stanford, Califórnia, E.U.A., em 2003. A cirurgia foi realizada por Hanley et al., no terceiro trimestre da gestação, em feto com diagnóstico de displasia da valva tricúspide, insuficiência tricúspide grave, cardiomegalia importante e hidropisia.³¹ A Plastia da valva tricúspide foi realizada com sucesso. Entretanto, a tentativa de desmame da CEC não foi coroada de êxito, devido à atresia valvar pulmonar anatômica, considerada funcional no pré-operatório. Alguns aspectos relevantes foram aprendidos a partir dessa experiência: a placenta tolerou bem a intervenção cirúrgica com auxílio da CEC, conduzida sem maiores problemas técnicos. A maior limitação foi relacionada ao tamanho das cânulas, que certamente necessita aprimoramento da indústria.

Atualmente, o principal foco das investigações vem sendo direcionado para a fisiopatologia da circulação extracorpórea fetal, indispensável para a cirurgia cardíaca fetal a céu aberto. Está claramente estabelecido que, após cirurgias cardíacas complexas com auxílio da CEC, ocorre uma resposta inflamatória importante³², o que provoca disfunção de órgãos e tecidos.^{33,34,35} Os primeiros estudos realizados na década de 80 demonstraram a possibilidade de se instalar e desligar a CEC em fetos de ovelhas com menos de 1.500 gramas, porém com elevada mortalidade após o

procedimento.^{36,37,38,39} A principal complicação da CEC fetal foi a disfunção placentária. Esta complicação é, neste momento, o fator determinante maior da mortalidade fetal em estudos experimentais. Esta disfunção é caracterizada pela diminuição do fluxo sanguíneo placentário de 40% para 15% do débito cardíaco fetal, decorrente do aumento da resistência vascular placentária. Consequentemente, as trocas gasosas deterioram-se, acarretando acidose respiratória progressiva e óbito fetal. Por outro lado, o leito vascular pulmonar, que normalmente recebe apenas 7% do débito cardíaco, apresenta vasodilatação acentuada durante a CEC.⁴⁰ Estas alterações provavelmente estão associadas à má perfusão tecidual e acidose metabólica fetal importante, secundárias ao fenômeno de "roubo de fluxo pulmonar". A fisiopatologia da disfunção placentária após a CEC fetal é multifatorial e inclui a produção de prostanoídes induzida pela CEC, disfunção endotelial, ativação de leucócitos e complemento e outras vias endovasculares vasoativas e inflamatórias.⁴¹ Há sinergismo entre vários fatores para determinar disfunção orgânica.⁴² Com o objetivo de mitigar os efeitos nocivos da CEC fetal, estudos experimentais prévios revelaram alguns dos mecanismos da disfunção placentária.⁴³

Em primeiro lugar, ocorre a liberação de prostaglandinas vasoativas, tais como tromboxane e prostaglandina E2, importantes moduladores do tônus vascular placentário (Figura 1). O bloqueio da síntese de prostaglandinas vasoativas, pela administração de corticoides ou indometacina durante a CEC fetal, impede o aumento da resistência vascular placentária, o que favorece o fluxo placentário e, consequentemente, a troca de gases sanguíneos fetais.^{44,45} Em meados da década de 80, Assad e al. estudaram as características hemodinâmicas da circulação placentária em ovinos durante a CEC fetal.^{9,46,47}

Estabeleceram que a resistência vascular placentária é dependente do fluxo sanguíneo, pela ausência de mecanismo auto-regulatório ou inervação da vasculatura placentária. A condição de hipotermia promoveu aumento da resistência vascular placentária e, conseqüentemente, maior prejuízo das trocas gasosas.

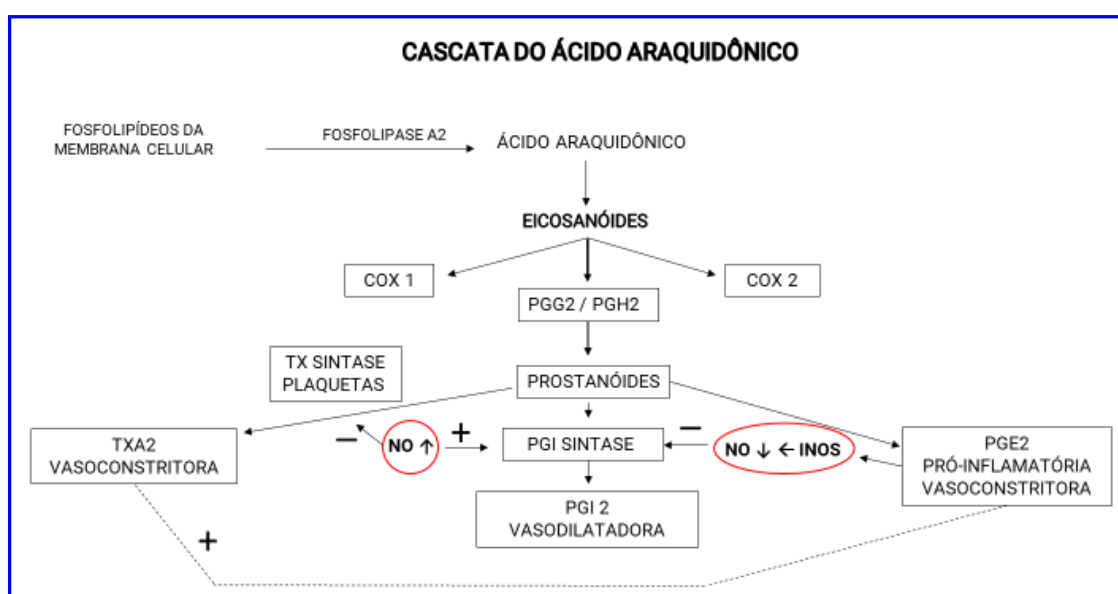


Figura 1- Tromboxane e prostaglandina E2: moduladores do tônus vascular placentário.

COX: Prostaglandina H2 sintase, também conhecida como Cicloxigenase; TX: Tromboxana; TXA2: Tromboxana A-2; PGG2: Prostaglandina G-2; PGH2: Prostaglandina H-2 PGI 2: Prostaglandina I-2; NO: Óxido Nítrico; INOS: Óxido Nítrico Sintase

Por outro lado, os efeitos sistêmicos nocivos da CEC pós-natal são sabidamente resultantes do contato do sangue com a superfície do circuito. Assim, a miniaturização do circuito de CEC fetal tem sido também uma prioridade técnica.^{48,49} Para tanto, foi desenvolvido um mini-circuito de CEC

fetal, sem oxigenador, com uma bomba axial e perfusato sem sangue materno, para comparação com circuitos convencionais (rolete e oxigenador). Os autores estudaram a hemodinâmica fetal e as trocas gasosas placentárias. A miniaturização do circuito da CEC fetal permitiu a preservação da função placentária, quando comparado ao circuito convencional de CEC. De fato, um dos mecanismos desencadeadores da resposta inflamatória humoral é a exposição do sangue ao circuito da CEC. Ademais, há relação direta entre a magnitude da inflamação e o tempo de exposição, tamanho e biocompatibilidade do circuito.

Há duas estratégias relacionadas ao binômio CEC - Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SRIS) aplicáveis à cirurgia cardíaca fetal: minimizar a agressão ao feto e modular a resposta inflamatória. Conforme ilustrado na figura 2, outros fatores coadjuvantes na disfunção placentária durante e após a CEC fetal incluem a disfunção endotelial, liberação de citocinas, infiltração de células inflamatórias nos tecidos, ativação de neutrófilos com degranulação, ativação de plaquetas, do sistema complemento e do sistema de coagulação, além de outras vias inflamatórias e vasoativas, determinando intensa resposta inflamatória, manifestada pela Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica.⁵⁰

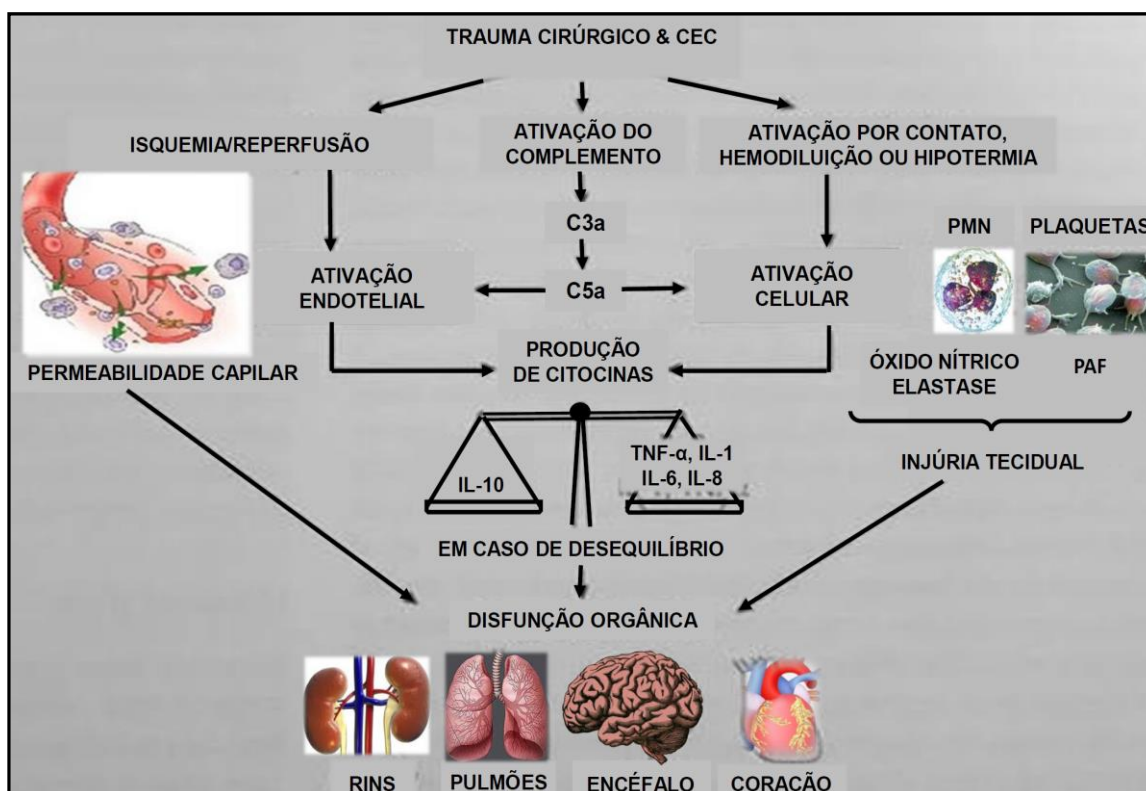


Figura 2- Fisiopatologia da Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica e disfunção orgânica. CEC: Circulação extracorpórea; C: Complemento; IL: Interleucina; PMN: Polimorfonucleares; PAF: Fator de ativação plaquetária; TNF- α : Fator de Necrose Tumoral Alfa.

A SRIS, desencadeada pela resposta inflamatória inata, apresenta-se em graus variados de gravidade. Pode apresentar uma resposta autolimitada ou progredir para choque cardiogênico e falência de múltiplos órgãos. A vasodilatação periférica, depleção de volume intravascular, depressão miocárdica e aumento do metabolismo determinam um desequilíbrio entre a oferta e demanda de oxigênio, resultando em hipóxia e choque.

A inflamação inicial é desencadeada pelo contato do sangue com a superfície estranha do circuito da CEC, que ativa o fator XII da cascata da coagulação.⁵¹ O fator XII, por sua vez, ativa a calicreína e bradicinina, que estimulam receptores β_1 e β_2 . Consequentemente, são produzidos óxido

nítrico, eicosanóides e citocinas pró-inflamatórias, que têm seus níveis plasmáticos elevados rapidamente.^{52,53} Estas citocinas associam-se ao complemento e sistemas de contato, ativando os leucócitos^{54,55}.

O segundo mecanismo de inflamação associado a CEC relaciona-se a isquemia e posterior reperfusão de múltiplos sítios da microcirculação inadequadamente perfundidos. A isquemia-reperfusão (**I/R**) caracteristicamente envolve a interação entre neutrófilos e células endoteliais. A lesão endotelial, trombose microvascular e disfunção de órgãos são característicos do fenômeno da **I/R**.^{56,57,58,59}

A disfunção microvascular induzida por **I/R** tem sido descrita na maioria dos órgãos e é reconhecida como um problema potencialmente sério, encontrado durante uma variedade de procedimentos clínicos e cirúrgicos, como terapia trombolítica, transplante de órgãos, angioplastia coronariana e CEC.⁶⁰ As células endoteliais ativadas em todos os segmentos da microcirculação produzem mais radicais livres de oxigênio e menos óxido nítrico no período inicial pós reperfusão.

Isto representa o principal substrato fisiopatológico da inflamação consequente à **I/R**. O desequilíbrio resultante entre superóxido e óxido nítrico em células endoteliais leva a liberação de mediadores inflamatórios (fator ativador de plaquetas e fator de necrose tumoral) e à biossíntese de moléculas de adesão, favorecendo a adesão de leucócitos ao endotélio.

A interação entre neutrófilos e células endoteliais inicia-se com a marginação dos neutrófilos na microcirculação e seu acoplamento as células endoteliais pela conjugação entre moléculas de adesão da família das inas (ina E e ina P), molécula 1 de adesão intercelular (ICAM-1) e molécula 1 de adesão

do endotélio vascular (VCAM-1), expressas nas células endoteliais e as integrinas, expressas na superfície dos neutrófilos. A expressão dessas moléculas é resultado do processo de ativação do endotélio que ocorre em condições de lesão tecidual, na presença de subprodutos de microrganismos (e.g., lipopolissacarídio - LPS) ou mediante contato com fatores provenientes da resposta inflamatória, como componentes das cascatas do complemento, coagulação, citocinas (IL-1, TNF- α) e mediadores, como a histamina e o leucotrieno B₄. As integrinas são proteínas localizadas na superfície celular, mediadoras da adesão entre neutrófilos e células endoteliais, bem como entre neutrófilos e proteínas da matriz extracelular. O acoplamento da Integrina a seu ligante é primordial para que ocorra a migração dos neutrófilos para os tecidos. As integrinas leucocitárias interagem por meio de adesão às moléculas de adesão intercelular (ICAMs), presentes no endotélio ativado. Estas últimas, por sua vez, são caracterizadas por domínios extracelulares relacionados à família das imunoglobulinas e induzidas no endotélio ativado (ICAM-1, VCAM-1), no endotélio em repouso (ICAM-2) e nos leucócitos ativados (PECAM). A molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1), também chamada de CD-54 (*Cluster of Differentiation 54*), é uma glicoproteína da superfamília imunoglobulina. Os receptores Toll-like (TLR), moléculas de superfície presentes nas células de defesa do organismo, por sua vez, são responsáveis pela geração de sinais que disparam uma série de eventos intracelulares envolvendo proteínas e fatores de transcrição de inúmeros genes. A liberação de mediadores inflamatórios, tais como, fator de necrose tumoral (TNF- α), fator ativador de plaquetas (PAF), interleucinas (IL-1 e IL-6), óxido nítrico (NO) e metabólitos do ácido araquidônico, é responsável pela febre, coagulação intravascular,

depressão miocárdica e hipotensão. Elevações nos níveis plasmáticos de interleucinas (IL-6 e IL-8) estão relacionados à necessidade de suporte inotrópico, aumento da permeabilidade capilar e da mortalidade pós-operatória. A ativação do complemento (C3a e C5a) induz ativação e degranulação de neutrófilos, liberação de histamina por mastócitos e basófilos e agregação plaquetária, que resultam em disfunção orgânica e ventilação mecânica prolongada.

Os efeitos remotos da **I/R** são mais frequentemente observados no sistema respiratório e cardiovascular, e podem resultar no possível desenvolvimento da SRIS e na síndrome de disfunção de múltiplos órgãos, ambos responsáveis por 30% a 40% da mortalidade em unidades de terapia intensiva de referência terciária⁶¹.

Diante de tais fatos, torna-se evidente que a maior barreira para a aplicação clínica da cirurgia cardíaca intrauterina a céu aberto não está relacionada à técnica cirúrgica em si, mas sim às respostas fisiopatológicas do feto durante a CEC fetal.

1.4 Síndrome da Resposta Inflamatória e Pré-Condicionamento Isquêmico

A reperfusão de tecidos isquêmicos é frequentemente associada à disfunção microvascular, com comprometimento do endotélio das arteríolas, filtração de fluidos, obstrução de leucócitos em capilares e extravasamento de proteínas plasmáticas. As células endoteliais ativadas em todos os segmentos da microcirculação produzem mais radicais livres de oxigênio e menos óxido

nítrico no período inicial pós-reperfusão. O desequilíbrio resultante entre superóxido e óxido nítrico em células endoteliais leva à liberação de mediadores inflamatórios (fator ativador de plaquetas e fator de necrose tumoral) e à biossíntese de moléculas de adesão, favorecendo a adesão de leucócitos no endotélio. Os mediadores inflamatórios liberados pela reperfusion ativam células endoteliais de outros órgãos à distância, que não estão expostos ao insulto isquêmico inicial (Figura 3).

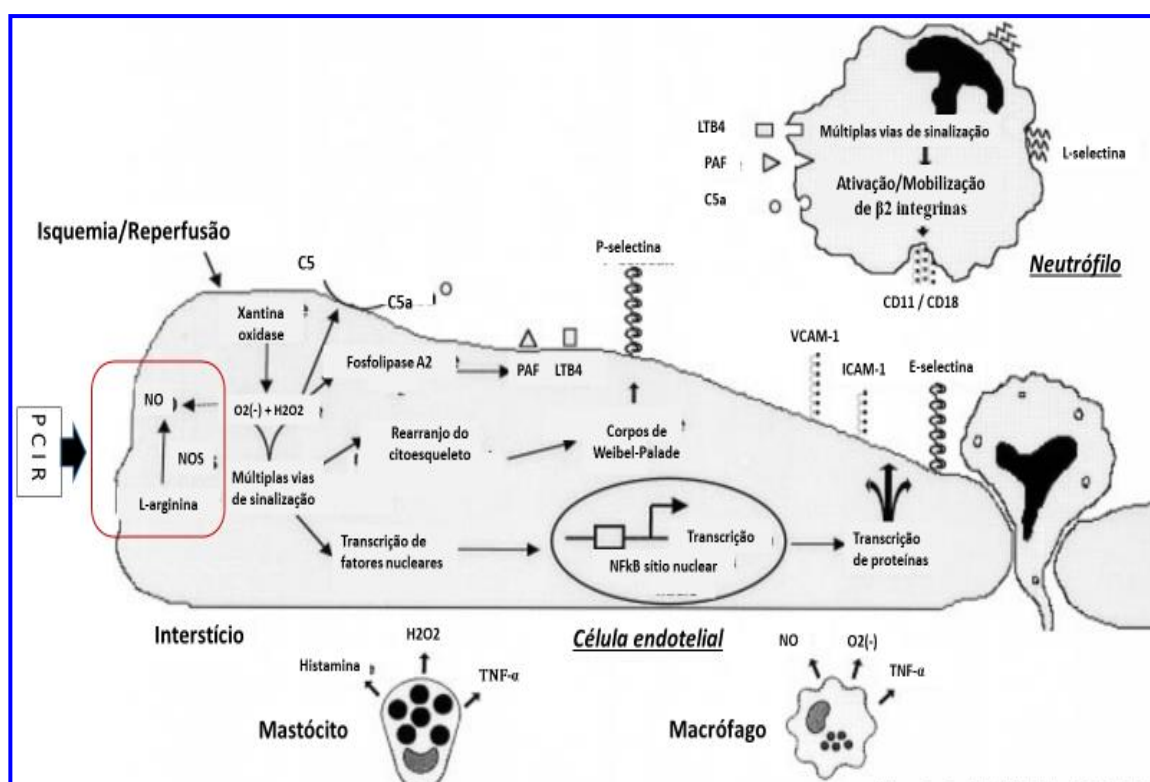


Figura 3 - Mecanismos dependentes do endotélio para amplificação da resposta inflamatória. CD: *Cluster of Differentiation*; C5a: Fator Complemento 5a; eNOS: óxido nítrico sintase endotelial; ICAM: molécula de adesão intercelular; LTB4: Leucotrieno B4; NF-Kb: Fator nuclear kappa B; NO: óxido nítrico; PAF: Fator de ativação plaquetária; PCIR: Pré-condicionamento isquêmico remoto; TNF- α : Fator de Necrose Tumoral Alfa; VCAM: molécula de adesão do endotélio vascular.

Esta resposta remota à isquemia-reperfusão pode resultar em lesão microvascular dependente de leucócitos, que é característica da síndrome da

insuficiência de múltiplos órgãos. Foram demonstradas respostas adaptativas à lesão isquemia-reperfusão, que permitem proteger os tecidos isquêmicos contra os efeitos nocivos da isquemia prolongada, um fenômeno denominado pré-condicionamento isquêmico. O Pré-Condicionamento Isquêmico Remoto (PCIR) tem demonstrado importante eficácia na redução do processo inflamatório e proteção a múltiplos órgãos submetidos à injúria por isquemia-reperfusão, tal como ocorre com a circulação extracorpórea. No início da década passada, Carden e Granger descreveram com detalhes a fisiopatologia da isquemia-reperfusão (Figura 4).⁶²

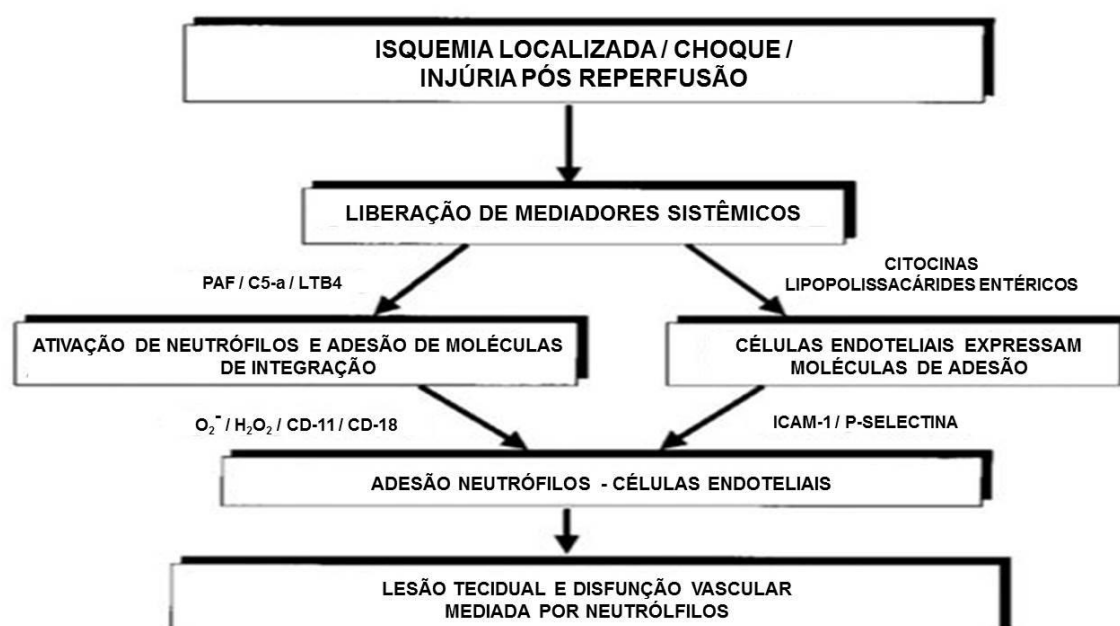


Figura 4 - Mecanismos de amplificação de resposta inflamatória local para resposta inflamatória sistêmica após isquemia-reperfusão. CD: *Cluster of Differentiation*; ICAM: molécula de adesão intercelular; LTB4: Leucotrieno B4; PAF: Fator de ativação plaquetária.

O primeiro ensaio clínico a utilizar o PCIR foi publicado em 2006 e envolveu crianças com cardiopatias congênitas submetidas à correção total.⁶³ Neste estudo, a indução de quatro ciclos de isquemia no membro inferior, durante cinco minutos, seguida de cinco minutos de perfusão, permitiu uma

redução dos níveis de troponina no pós-operatório, menor necessidade de agentes inotrópicos e menor resistência das vias respiratórias.

Publicado no ano seguinte, num ensaio clínico randomizado de PCIR em 57 indivíduos submetidos à cirurgia de revascularização do miocárdio eletiva, foram obtidos resultados semelhantes, com uma redução dos níveis de troponina nas primeiras 72 horas do pós-operatório.⁶⁴

Desde então, vários estudos foram realizados em cirurgia de revascularização do miocárdio (com e sem CEC), correção de aneurismas da aorta abdominal, troca valvar e intervenção coronária percutânea. O objetivo principal foi o nível de troponina no pós-operatório, que estava associado a pior prognóstico em curto e longo prazo^{65,66} e se correlacionou com a área de infarto^{67,68}. Contudo, os resultados dos estudos de PCIR não são uniformes, o que poderia ser explicado pelas diferenças no protocolo utilizado (local escolhido para pré-condicionamento, número de ciclos, tempo de isquemia/reperfusão), a idade do doente, as comorbidades associadas, a medicação e o tipo de anestesia utilizado durante a cirurgia.

Em 2009, Kharbanda et al. revisaram amplamente o PCIR e sua possível aplicação como método capaz de minimizar os danos teciduais consequentes ao binômio isquemia-reperfusão.⁶⁹ Estes autores demonstraram em modelo de CEC em suínos que o pré-condicionamento remoto induz um efeito sistêmico protetor multiorgãos com relação às lesões por isquemia-reperfusão. Esta proteção é transferível entre espécies, independentemente da atividade neurogênica local, e requer a ativação de receptores opióides.⁷⁰

Embora os mecanismos desencadeantes não estejam ainda totalmente esclarecidos, estão estabelecidas as modificações celulares verificadas com o pré-condicionamento, tais como a indução da cascata intracelular de cinases, com consequente modificação da função mitocondrial e diminuição de

neutrófilos pró-inflamatórios, devido a alterações nos perfis de expressão gênica de leucócitos polimorfonucleares circulantes. Há também o envolvimento da via neural, através da adenosina, bradicinina e calcitonina.

No ano seguinte (2010), Shimizu et al. avaliaram o impacto do PCIR sobre a função dos neutrófilos, após 1 e 10 dias de isquemia transitória do antebraço humano (três ciclos de isquemia de 5 min, seguida de 5 min de reperfusão). O estudo demonstrou que o PCIR resultou em diminuição da adesão, exocitose e fagocitose dos neutrófilos, além da secreção diminuída de citocinas.⁷¹

Em 2013, Costa et al. publicaram uma análise interessante de artigos científicos publicados desde 1986, data da primeira descrição do pré-condicionamento isquêmico, até dezembro de 2012, que continham os termos “*remote ischemic preconditioning*”.⁷² Os autores descreveram os mecanismos fisiopatológicos envolvidos no pré-condicionamento isquêmico remoto (Figura 5), mecanismos subcelulares, a fase precoce e tardia do PCIR, a hipótese neuronal e humoral dos mecanismos de comunicação entre território remoto e miocárdio.

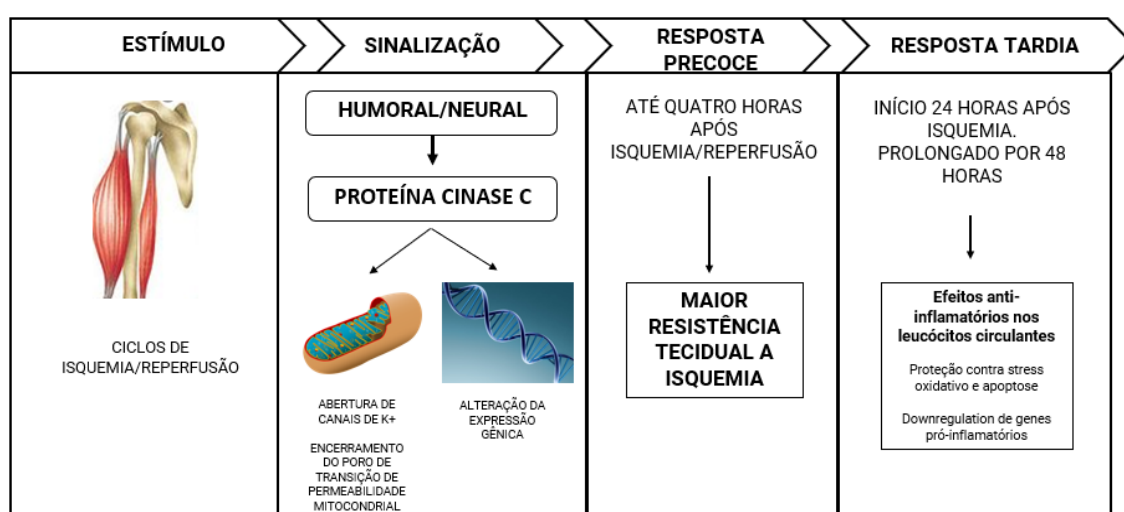


Figura 5 - Representação esquemática das várias fases e respectivos mecanismos fisiopatológicos envolvidos no pré-condicionamento isquêmico remoto.⁷²

A hipótese neuronal considera que substâncias produzidas no território remoto submetido a isquemia atuem localmente em vias neuronais aferentes (Figura 6). Estas ativam várias vias eferentes induzindo a proteção miocárdica. Uma recente revisão sobre o tema enfoca o envolvimento potencial de vias neurogênicas na mediação da cardioproteção induzida pelo PCIR. De fato, os efeitos cardioprotetores induzidos pelo PCIR dependem da presença de vias neuronais intactas, o que foi confirmado por estudos experimentais envolvendo secção dos nervos vago, femoral ou ciático.⁷³

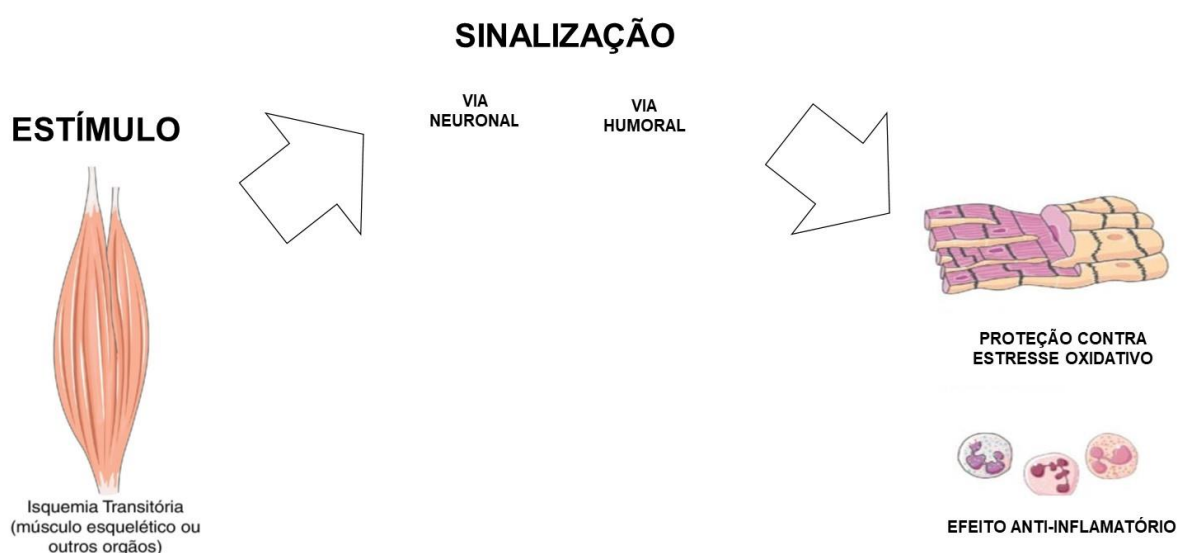


Figura 6 - Mecanismos neuronal e humoral de proteção entre território remoto e órgãos distantes. O PCIR protege a mitocôndria contra o estresse oxidativo e promove efeito anti-inflamatório.

O envolvimento de vias neuronais foi demonstrado experimentalmente em ratos submetidos ao PCIR, associado à secção do nervo femoral ou ciático. O grupo submetido à desnervação do membro apresentou uma atenuação da

proteção conferida pelo PCIR⁷⁴. Mastitskaya et al. também demonstraram em ratos que neurônios do núcleo motor dorsal do nervo vago tem um papel fundamental na mediação do PCIR. A ativação deste grupo pré-ganglionar vagal, mesmo sem isquemia muscular, é suficiente para reproduzir o efeito do PCIR.⁷⁵

Loukogeorgakis et al. demonstraram o papel do sistema nervoso autônomo no PCIR. Os autores observaram um efeito atenuante sobre o PCIR através do antagonismo dos receptores nicotínicos e da reserpina (fármaco que inibe a captação de neurotransmissores para as vesículas sinápticas).⁷⁶

Em relação à hipótese humoral, o estímulo isquêmico do PCIR ocasiona a produção de diversas substâncias que, entrando em circulação, atingem o miocárdio e exercem aí o seu efeito protetor (Figura 7). Estudos experimentais de Weinbrenner et al. demonstraram que o PCIR é mediado pela proteinoquinase C, elemento comum nas vias de transdução de sinal. Curiosamente, a produção dos fatores de proteção depende da duração da isquemia do membro.⁷⁷

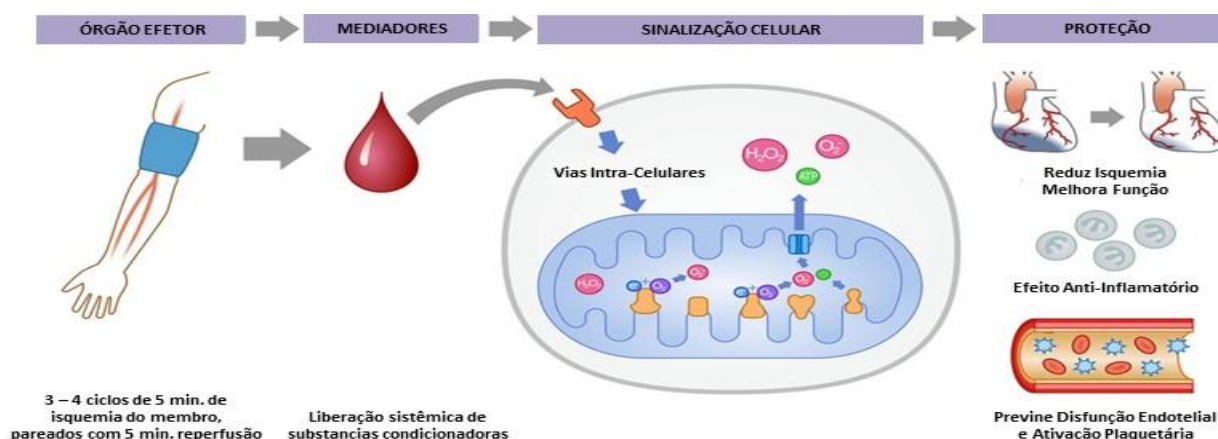


Figura 7- Mecanismo humoral de proteção entre território remoto e o miocárdio

Diante do exposto, pode-se inferir que o PCIR seria um método simples, rápido, virtualmente sem custos, não invasivo e não farmacológico para ser aplicado antes de intervenções (percutâneas ou cirúrgicas) do coração. Esta estratégia parece fazer parte de uma complexa rede de interações intra e inter-órgãos, através da qual o organismo gera estímulos citoprotetores, que aumentam a sua resistência à isquemia.⁷⁸

No entanto, a literatura ainda é muito escassa em relação ao modelo experimental da CEC em fetos, no que tange a resposta inflamatória sistêmica e ao pré-condicionamento remoto. Neste estudo, a peculiar fisiopatologia da inflamação sistêmica pós CEC fetal e o impacto do pré-condicionamento remoto foram analisados em modelo experimental.

2- OBJETIVOS

2.1 Objetivo Primário

Analisar a inflamação sistêmica e disfunção placentária em fetos de ovinos submetidos à CEC.

2.2 Objetivo Secundário

Analisar gases sanguíneos, Citocinas, Tromboxane, Prostaglandina e a expressão das moléculas de adesão endoteliais nos pulmões e placenta de fetos de ovinos submetidos à CEC, com e sem pré-condicionamento isquêmico remoto.

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Anexo A) e realizado de acordo com as normas de uso de animais em ensino e pesquisa do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Foram utilizados 18 fetos de ovinos (50% genética Santa Inês) com pesos comparáveis (Tabela 2) e idade gestacional aproximada de 130 a 140 dias (termo: 147 dias), divididos em tres grupos:

Tabela 2 - Peso dos animais do grupo Controle e dos animais submetidos à circulação extracorpórea (CEC), com e sem pré-condicionamento isquêmico remoto (PCIR)

Grupos	Controle	CEC sem PCIR	CEC com PCIR	Valor de p
Ovelhas	51,33 ± 5,28	48,50 ± 2,05	51,00 ± 0,00	0,801
Fetos	2,68 ± 0,20	2,98 ± 0,42	2,96 ± 0,39	0,872

Valores (Kg) = Média ± Erro Padrão das Médias; n=6 para cada grupo.

3.1 Grupo Controle Negativo

Os fetos foram submetidos à toracotomia, porém sem o PCIR e sem estabelecimento da CEC. Foram respeitados os mesmos tempos cirúrgicos dos demais grupos para coleta de amostras sanguíneas (Figura 8).

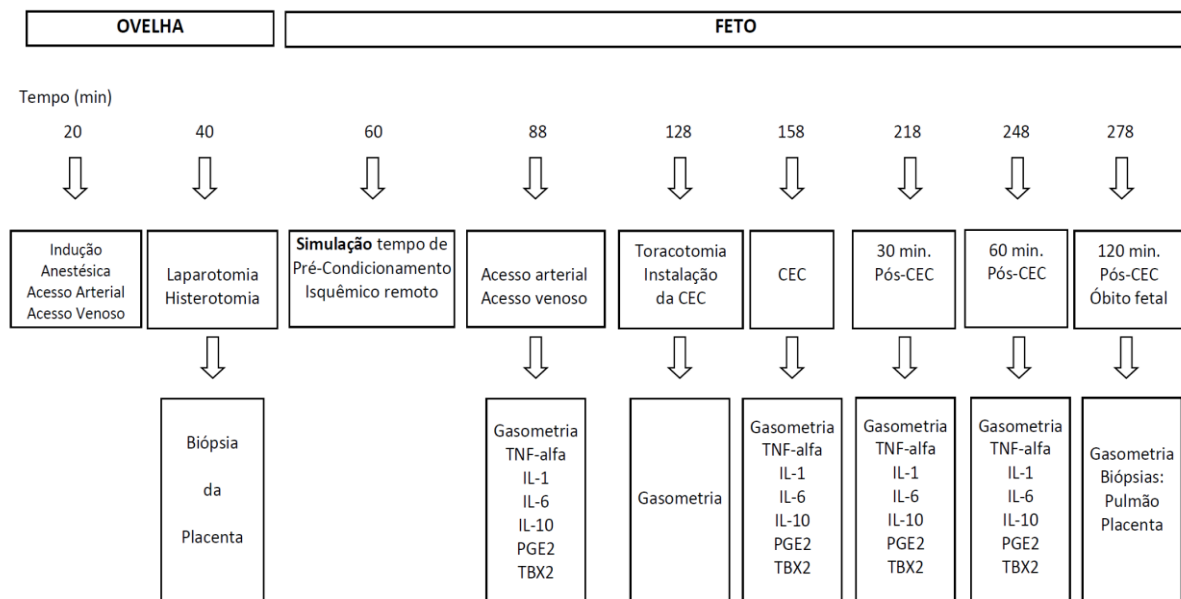


Figura 8- Cronograma do grupo Controle negativo.

CEC: Circulação extracorpórea; TNF- α : Fator de Necrose Tumoral Alfa;

IL: Interleucina; PGE: Prostaglandina; TBX: Tromboxane

3.2 Grupo Controle Positivo

Os fetos foram submetidos a 30 minutos de CEC, sem oxigenador no circuito, tendo a placenta como único oxigenador in-vivo da circulação fetal. Não foi realizado o pré-condicionamento isquêmico remoto prévio. Foram respeitados 28 minutos sem intervenções, antes do estabelecimento da CEC (tempo equivalente ao pré-condicionamento do grupo de estudo), conforme demonstrado na Figura 9.

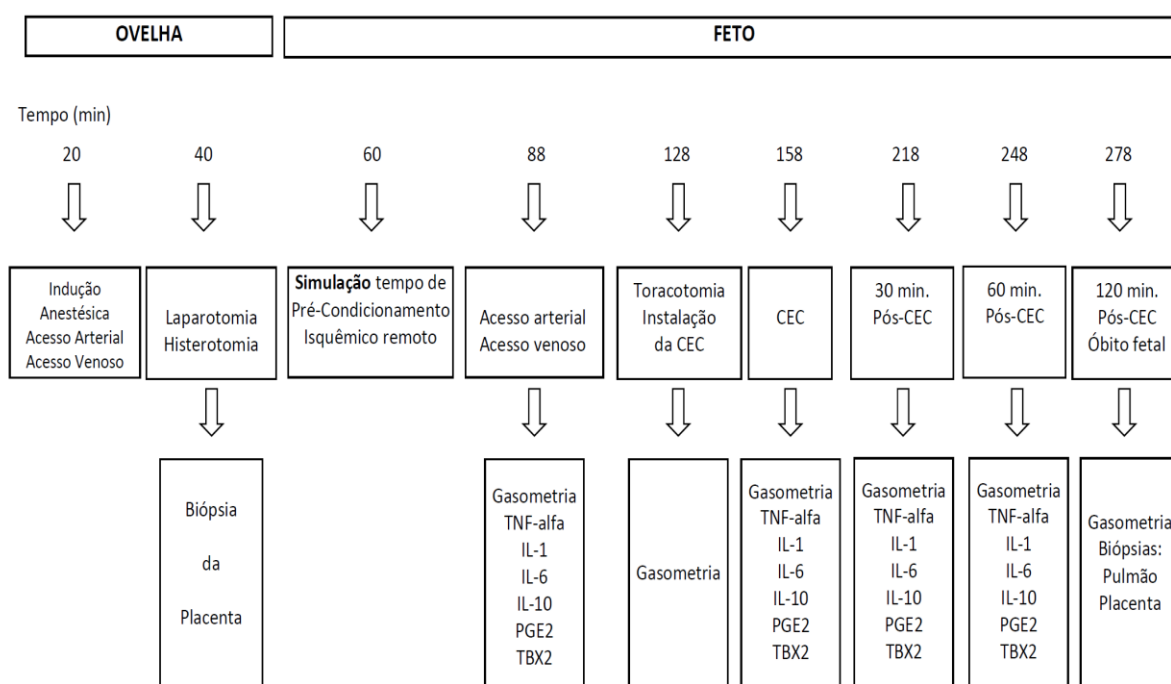


Figura 9 - Cronograma do grupo Controle positivo.

CEC: Circulação extracorpórea; TNF- α : Fator de Necrose Tumoral Alfa;
IL: Interleucina; PGE: Prostaglandina; TBX: Tromboxane

3.3 Grupo Pré-condicionado (PCIR)

Os fetos tiveram um pré-condicionamento isquêmico remoto, através de quatro ciclos de isquemia intermitente do membro traseiro (cinco minutos de garroteamento do membro, alternados com dois minutos de perfusão), antes da canulação venosa e arterial. Posteriormente, os fetos foram também submetidos ao mesmo tempo de CEC (Figura 10).

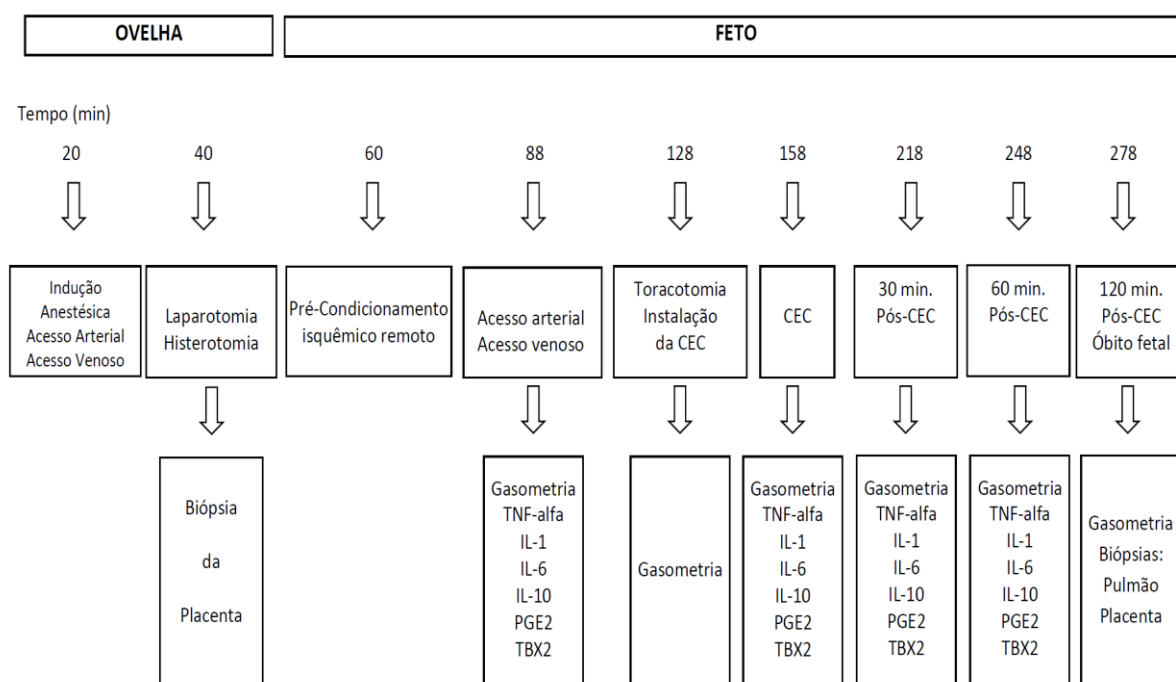


Figura 10 - Cronograma do grupo Pré-condicionado.

CEC: Circulação extracorpórea; TNF- α : Fator de Necrose Tumoral Alfa;

IL: Interleucina; PGE: Prostaglandina; TBX: Tromboxane

3.4 Anestesia

Os animais foram mantidos em jejum alimentar e hídrico pré-operatório por 24 horas. As ovelhas receberam pré-medicação anestésica composta de Cetamina (10mg/kg) e Midazolam (0,5 mg/kg), por via intramuscular (IM). A seguir, uma linha venosa foi obtida através de punção da veia jugular do animal para infusão de fármacos e solução cristalóide. A indução anestésica foi complementada com a associação entre Propofol (2,6-diisopropilfenol; 3mg/kg), Cetamina (2mg/kg) e Fentanil (2 μ g/kg), por via intravenosa. A ovelha foi

colocada em decúbito esternal para intubação oro-traqueal e, posteriormente, colocada em ventilação mecânica, sem necessidade de bloqueio neuromuscular (ventilador Dixtal DX2020). A ventilação foi mantida com fração inspirada de oxigênio em 100% com volume corrente de 7-10 ml/kg, 15 a 20 respirações por minuto e PEEP de 5 cmH₂O. O ajuste fino destes parâmetros foi realizado de acordo com a avaliação da capnografia e gasometria basal da mãe. A anestesia foi mantida com Isoflurano em oxigênio 100% associado ao bloqueio regional através de anestesia peridural lombossacra com Bupivacaína (30 mg), morfina (6 mg), diluídas em 10 ml de solução salina fisiológica (Figura 11).



Figura 11- Anestesia peridural lombossacra da ovelha

A monitorização foi padronizada com eletrocardiografia, oximetria, CO₂ expirado (ETCO₂) e registro de pressão arterial materna, obtida após a colocação do cateter na artéria auricular e registrada continuamente através de

sistema computadorizado (Dixtal DX2020) e software de interpretação ACQknowledge 3.01. A anestesia fetal foi complementada com injeção de Cetamina (aproximadamente 50 mg/kg - I.M.), logo após a abertura da cavidade uterina. A ovelha foi hidratada com solução de Ringer simples, a 6 ml/kg/hora. A profilaxia antibiótica foi contemplada com uma dose de penicilina benzatina 1.200.000 UI, três doses de cefalotina 1g e gentamicina 40 mg por via intramuscular (IM), a cada 12 horas, com início logo antes da operação.

3.5 Procedimento

Após monitorização completa, a ovelha foi preparada para intervenção cirúrgica estéril. O útero foi exposto através de laparotomia mediana longitudinal infra umbilical. Um dos membros traseiros do feto foi localizado por palpação e orientou a primeira histerotomia. A seguir, o líquido amniótico foi aspirado para realizar a primeira biópsia placentária. O membro traseiro foi então extraído para administração intramuscular do anestésico fetal (Cetamina). No grupo PCIR, o membro traseiro foi submetido aos ciclos preconizados de isquemia-reperfusão. Posteriormente, a primeira histerotomia foi fechada com fio absorvível, em dois planos. A segunda Histerotomia, de aproximadamente 10 cm, foi orientada pelo membro dianteiro esquerdo. O membro dianteiro foi então extraído da cavidade uterina para canular os vasos axilares com cateter intracath 17-G (Becton Dickinson - Juiz de Fora, MG), com o objetivo de repor eventuais perdas sanguíneas e monitorizar a pressão

arterial sistêmica fetal, além de coletar amostras de sangue fetal para análise de gases sanguíneos (Nova Biomedical – Stat Profile Ultra; Waltham, MA, EUA), e dosagem de marcadores inflamatórios (Figura 12).

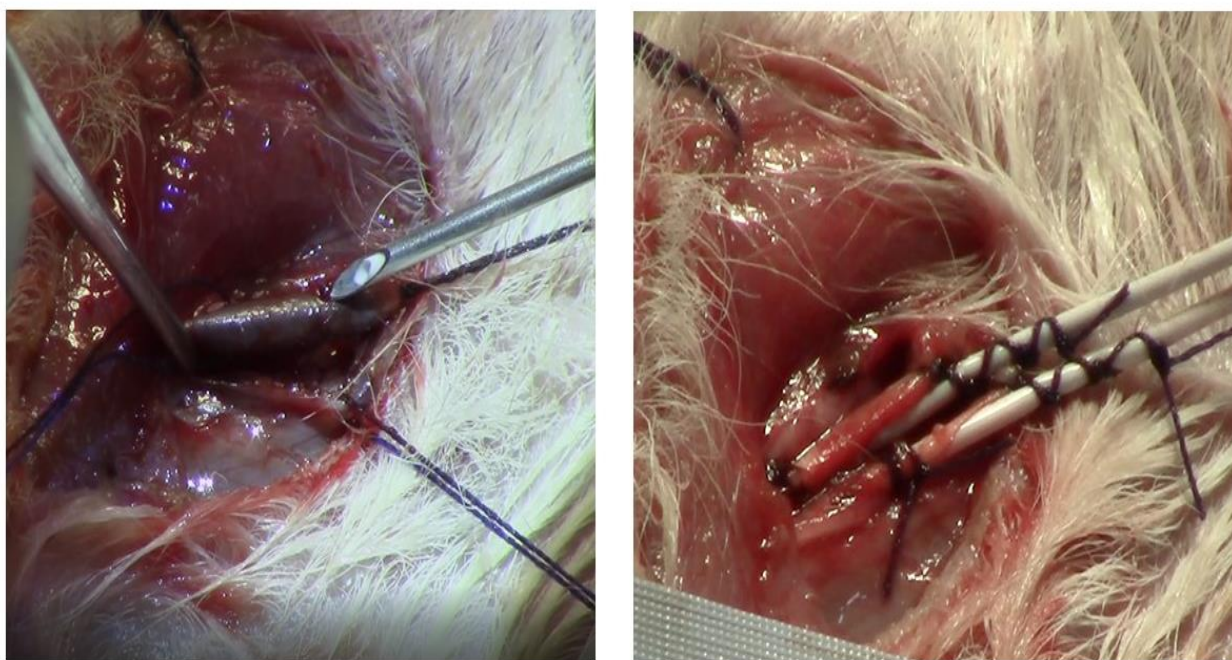


Figura 12- Cateterismo dos vasos axilares do feto, imediatamente após a segunda histerotomia.

3.6 Instalação da CEC fetal

Posteriormente à monitorização fetal e pré-condicionamento isquêmico remoto, quando designado, foi realizada toracotomia mediana transesternal para exposição do coração e canulação do átrio direito e tronco pulmonar (Figura 13), após administração de heparina sistêmica no feto (400 UI/Kg).

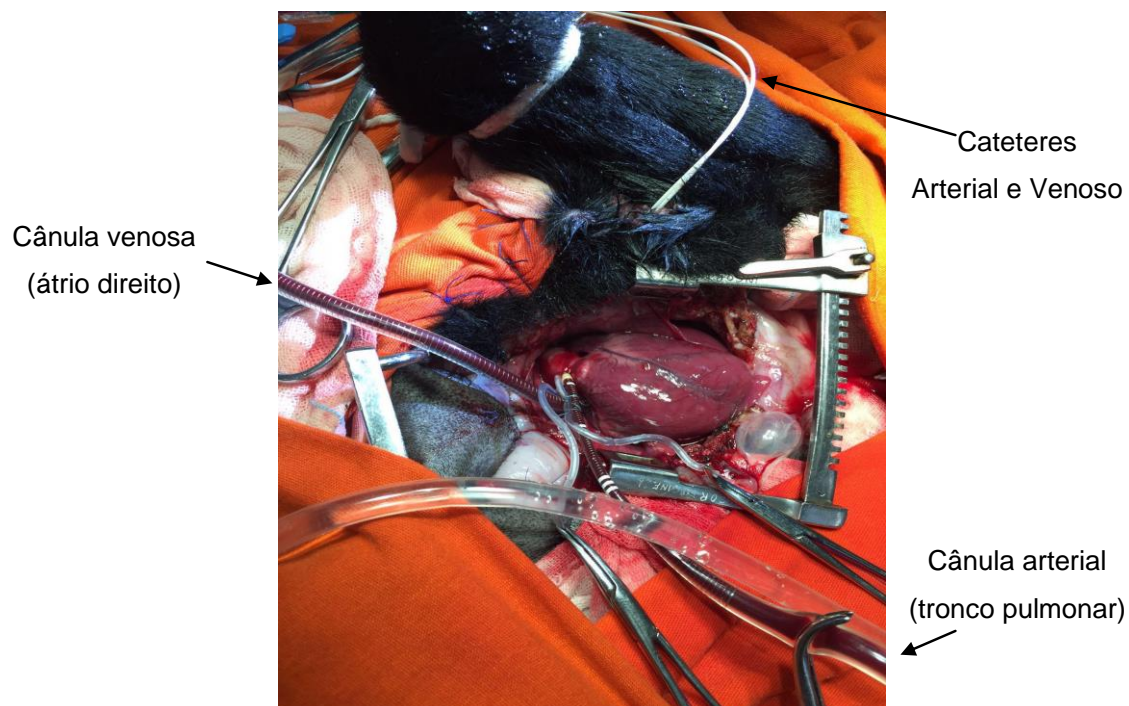


Figura 13 - Detalhe do coração fetal exposto através de toracotomia mediana transesternal, para canulação arterial no tronco pulmonar e venosa no átrio direito.

O circuito da CEC fetal foi composto por uma mini-bomba centrífuga Rotaflow Maquet (Hirrlingen, Alemanha), conforme demonstrada na figura 14. Não foi utilizado oxigenador no circuito, permanecendo a placenta como único oxigenador *in-vivo* da circulação fetal.



Figura 14 - Bomba Rotaflow do circuito da circulação extracorpórea fetal

O perfusato foi feito com solução de ringer simples pré-aquecido a 40° C. A CEC fetal foi feita em normotermia, objetivando-se um fluxo em torno de 200 ml/min/kg de peso fetal. A circulação extracorpórea foi mantida por 30 minutos (Figura 15). Após a CEC, o feto foi mantido durante 120 minutos para avaliação final dos marcadores inflamatórios, hemodinâmica e função placentária (gases sanguíneos).

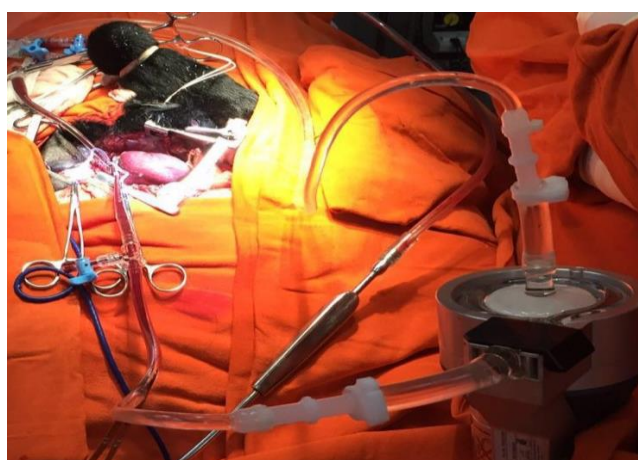


Figura 15 - Mini-circuito da circulação extracorpórea fetal com bomba Rotaflow, sem oxigenador, preenchido com ringer simples pré-aquecido a 40° C

3.7 Coleta de Amostras Sanguíneas

Foram colhidas amostras fetais para dosagem de marcadores inflamatórios e gasometria arterial imediatamente após a obtenção das linhas arterial e venosa de ambos (1ª coleta), antes do estabelecimento da CEC fetal (2ª coleta), durante a CEC fetal (3ª coleta), 30, 60 e 120 minutos após o encerramento da CEC fetal (4ª, 5ª e 6ª coletas), conforme demonstrado na tabela 3.

Tabela 3- Coleta de amostras para avaliar gases sanguíneos fetais

Acesso Vascular Periférico Fetal (Basal):		1ª Coleta
Pré CEC Fetal:		2ª Coleta
Durante a CEC fetal:		3ª Coleta
30 minutos Pós CEC Fetal:		4ª Coleta
60 minutos Pós CEC Fetal:		5ª Coleta
120 minutos Pós CEC Fetal:		6ª Coleta

3.8 Avaliação do Processo Inflamatório

3.8.1 Avaliação Histológica

Completado o protocolo cirúrgico, os fetos foram extraídos para análise morfológica dos pulmões. Em seguida, foi executada a segunda biópsia da

placenta. As amostras destes órgãos foram fixadas em solução de formalina salina (formol a 10% em solução salina a 0,9%, tamponado com fosfato de sódio monobásico e bibásico, para pH 7,0). As biópsias foram assim mantidas por um período de 24 horas. A seguir, foram incluídas em parafina e processadas para análise histológica. A partir dos blocos, foram submetidas a cortes histológicos de 5 µm de espessura, utilizando-se micrótomo (Leica RM 2145). Os cortes foram pescados em lâminas de vidro previamente tratadas com organosilano e levados à temperatura de 37°C para secagem e colagem. Seguiram-se as colorações pelas técnicas de Hematoxilina-Eosina (HE) e de Miller para demonstração de fibras elásticas.

3.8.1.1 Avaliação Histológica dos Pulmões

O percentual da espessura de parede das arteríolas bronquiolares e o edema inflamatório foram analisados em sistema de análise de imagens com auxílio do software Zeiss Axiovision (Hallbergmoos, Alemanha). A espessura da parede bronquiolar foi quantificada em percentual do calibre dos vasos, calculado pela seguinte fórmula, conforme descrito por Rabinovitch et al.⁷⁹:

$$\frac{2 \times \text{espessura da parede} \times 100}{\text{Diâmetro externo}}$$

Para cada animal, foram analisados 10 campos microscópicos para leitura das arteríolas seccionados no seu menor diâmetro (Figura 16). O valor final foi tomado como a média das medidas.

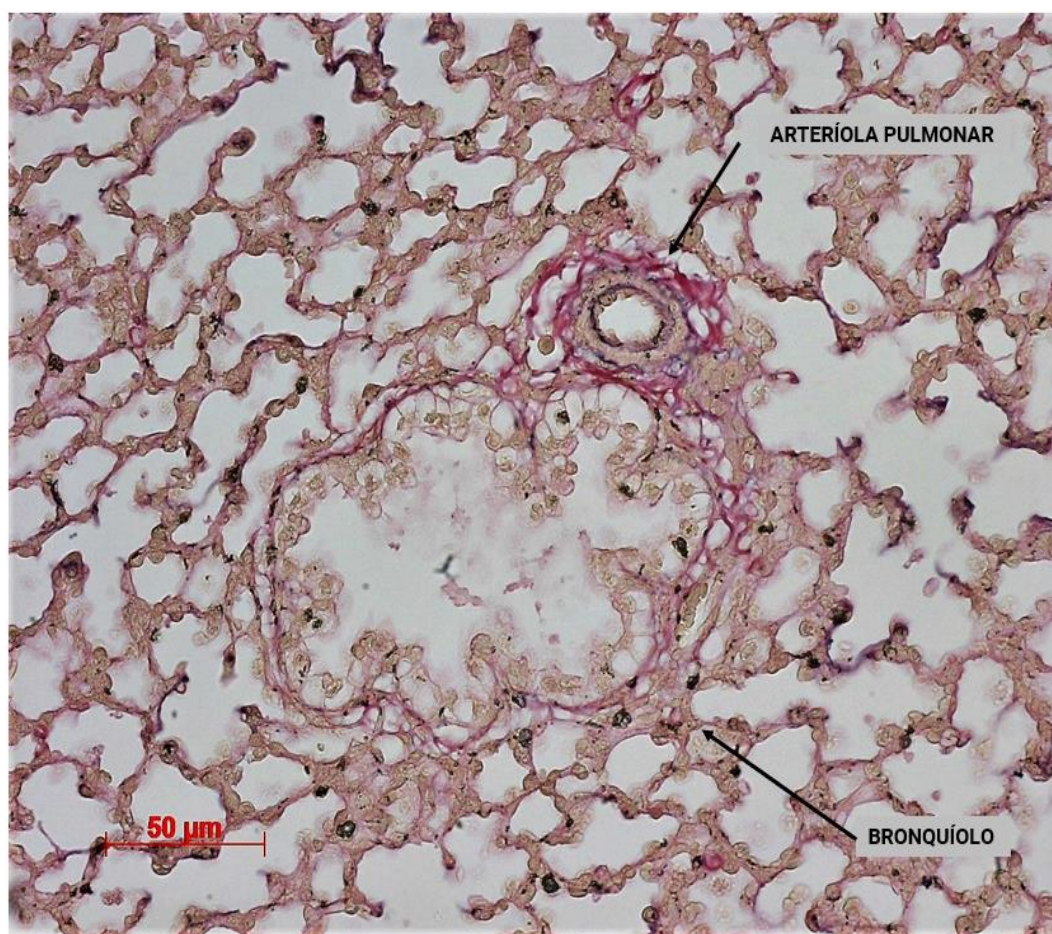


Figura 16 - Fotomicrografia do pulmão fetal, corada pela técnica de Miller para demonstração de fibras elásticas. Campo com arteríola seccionada no seu menor diâmetro para avaliação percentual da espessura de parede

A avaliação da fração de área dos septos interlobulares do pulmão fetal foi feita através de sistema teste com 336 pontos sobre cinco imagens aleatórias do pulmão fetal. Foram contados os pontos incidentes sobre os septos interlobulares. Os resultados de cada feto foram obtidos a partir da

média entre as observações das cinco imagens. Admitiu-se que valores maiores de fração de área de septos interlobulares representam maior edema pulmonar.

3.8.1.2 Avaliação Histológica da Placenta

A fração da área dos núcleos de células e de vasos intersticiais da placenta foi quantificada através de um sistema-teste contendo 340 pontos espaçados regularmente. Para cada feto, foram escolhidos quatro campos (aumento de 400x) aleatoriamente de cada condição, ou seja, **das amostras basais e finais do protocolo**. Para cada campo, foi determinado o número de pontos sobre os núcleos de células e de vasos intersticiais da placenta, relativo ao número de pontos sobre o campo inteiro. Esta relação determina a fração de área ocupada por núcleos e vasos da placenta.

3.8.2 Avaliação Imuno-Histoquímica

Fragmentos de pulmões e placenta, após processamento histológico descrito anteriormente, foram também seccionados e submetidos a exame imuno-histoquímico para a pesquisa das moléculas de adesão endoteliais, *Intercellular Adhesion Molecule-1* (ICAM-1) e *Vascular Cell Adhesion Molecule-1* (VCAM-1) e receptores *Toll-like 4*. Cortes de 4µm de espessura foram colocados em lâminas de vidro, previamente revestidas com organo-silano 3-Aminopropil-trietoxi-silano (Sigma Chemical Co. - Saint Louis, MO - EUA) em suporte adequado. O processo de remoção da parafina foi realizado em xilol

quente (estufa a 65° C), durante 15 minutos e, posteriormente, em 3 banhos de xilol frio. Para hidratação dos cortes, as lâminas foram colocadas em dois banhos de álcool absoluto, seguidos de banhos com álcool 95°, álcool 70° e ácido fórmico por 3 minutos. Em seguida, foram lavadas em água corrente não ionizada. A recuperação dos sítios antigênicos foi realizada em alta temperatura, com solução de EDTA pH 8 (EasyPath) e Tris-citrato pH9 (Dako - Santa Clara, CA - EUA), de acordo com a padronização de cada anticorpo. O bloqueio da peroxidase endógena presente nas hemácias foi feito com água oxigenada 10 volumes (3%) por quatro tempos de cinco minutos. No caso específico do anticorpo *Toll-Like 4*, foi utilizado o bloqueio de proteína (Dako Cytomation) por 10 minutos, à temperatura ambiente. As lâminas foram então incubadas com os anticorpos primários por um período de 12 horas, em geladeira (4° C), de acordo com a concentração padronizada. Posteriormente, os anticorpos foram diluídos em solução diluente Universal (EasyPath Diagnósticos – São Paulo, SP). A seguir, as lâminas foram incubadas com o kit de amplificação Novolink Max Polymer Novocastra (Leica Biosystems NewCastle - Nussloch, Alemanha). Foi utilizado como cromógeno a Diaminobenzidina (Sigma-Aldrich Chemie - Steinheim, Alemanha) e a contra-coloração com Hematoxilina de Harris (Merck - Darmstadt, Alemanha) para todos os casos.

3.8.3 Ensaio de Imunoadsorção Enzimática (ELISA)

Amostras de plasma foram utilizadas para a determinação das concentrações séricas de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), Interleucina (IL)-1 β , IL-6 e IL-10, através da utilização de kits de ELISA específicos para

ovinos, segundo instruções do fabricante (*MyBioSource Inc., San Diego, CA, USA*). Os resultados foram expressos em pg/mL. As mesmas amostras foram utilizadas para a determinação das concentrações séricas de prostaglandina E (PGE)-2 e tromboxana (TBX)-2, por técnica de ELISA, segundo instruções do fabricante (*Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA*). Os resultados foram expressos em pg/mL. Os ensaios imuno-enzimáticos e imuno-histoquímicos foram conduzidos no Laboratório de Investigação Médica em Cirurgia Cardiovascular e Fisiopatologia da Circulação (LIM-11) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3.9 Análise estatística

Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média e avaliados utilizando-se análise de variância de dois fatores (grupos e momentos), seguida das comparações múltiplas de Bonferroni. O nível de significância utilizado foi de 5%. Foi utilizado o programa de estatística GraphPad Prism (versão 5.0, La Jolla, CA – EUA).

4- RESULTADOS

Houve dois óbitos em cada um dos grupos de estudo após a CEC, antes do final do protocolo (mortalidade: 33,3%), relacionados à disfunção placentária progressiva.

4.1 Avaliação Hemodinâmica

As medidas de frequência cardíaca dos fetos ao longo do protocolo estão apresentadas na figura 17.

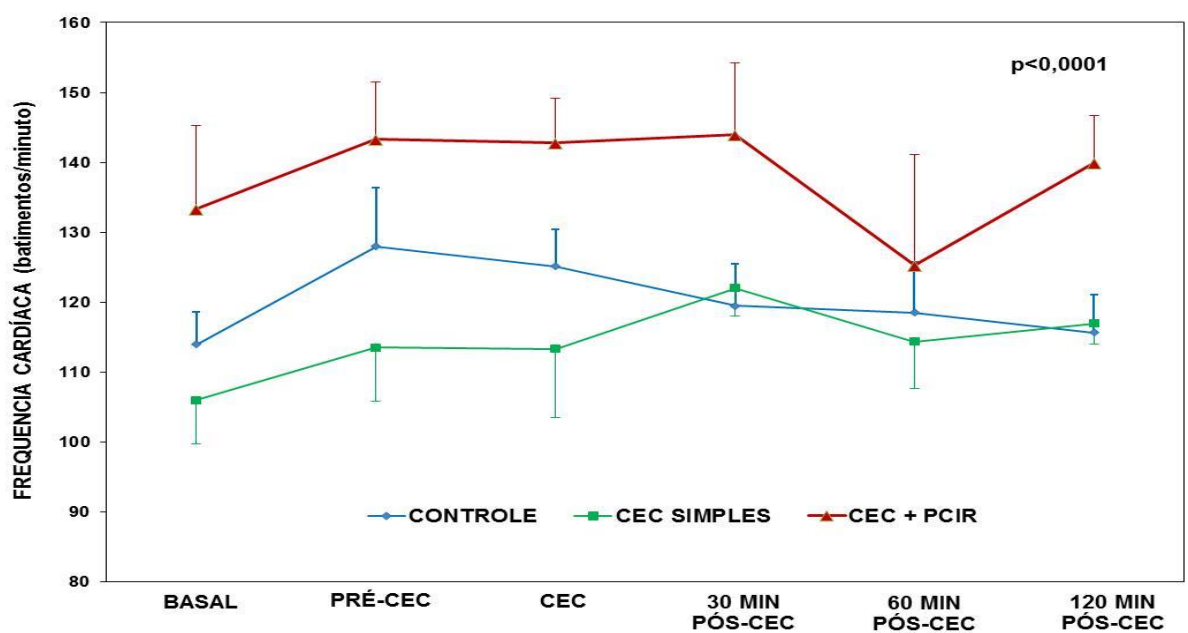


Figura 17 - Frequência Cardíaca fetal do grupo Controle e dos animais submetidos à circulação extracorpórea (CEC), com e sem pré-condicionamento isquêmico remoto (PCIR). n=6 para cada grupo; $p < 0,0001$ entre os grupos. Valores (batimentos/minuto) = Média \pm Erro Padrão das Médias.

Houve diferença significativa da frequência cardíaca fetal entre os grupos ($p < 0,0001$). O grupo submetido ao pré-condicionamento isquêmico apresentou

frequência cardíaca maior que os demais grupos (controle: $p=0,001$; CEC simples: $p<0,0001$). Não houve diferença entre o grupo controle do grupo da CEC simples ($p=0,61$).

Os dados de pressão arterial média sistêmica dos fetos ao longo do protocolo estão apresentados na figura 18.

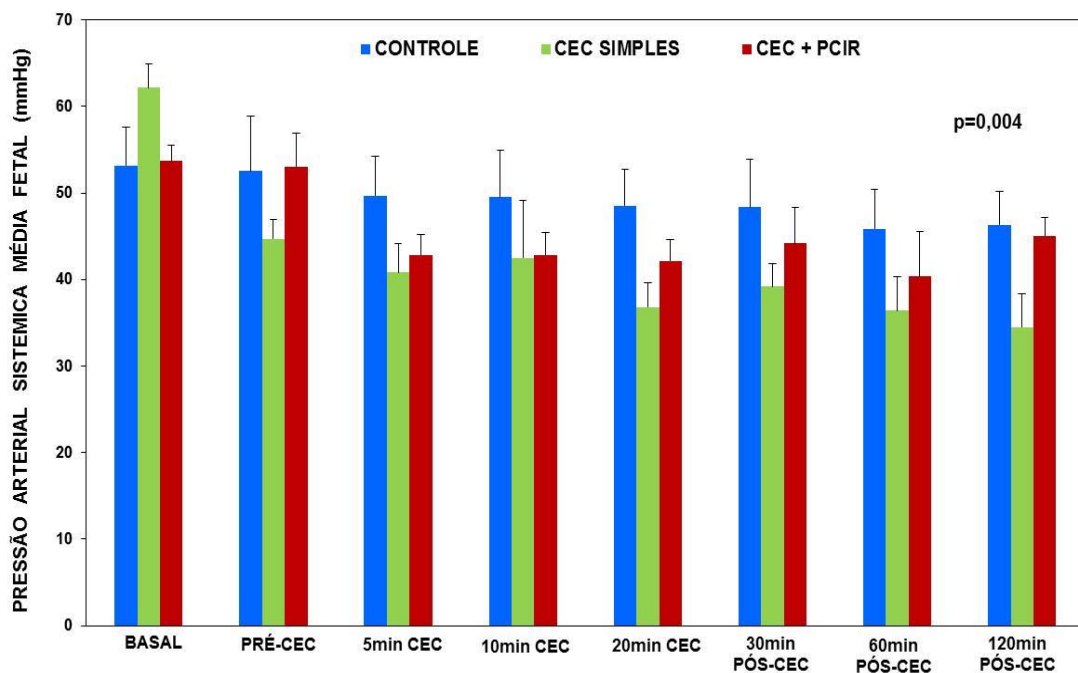


Figura 18 - Pressão arterial média sistêmica dos fetos do grupo Controle e dos animais submetidos à circulação extracorpórea (CEC), com e sem pré-condicionamento isquêmico remoto (PCIR).

$n=6$ para cada grupo; $p=0,004$ entre os grupos.

Valores (mm Hg) = Média \pm Erro Padrão das Médias.

Foi observada diferença significativa entre os grupos ($p=0,004$) e entre os diversos momentos do protocolo ($p=0,0002$). Entretanto, houve uma queda progressiva da pressão arterial sistêmica dos animais do grupo da CEC simples ao longo do protocolo em relação ao grupo controle ($p=0,006$). O grupo

submetido ao pré-condicionamento isquêmico remoto não diferiu dos demais grupos (controle: $p=0,22$; CEC simples: $p<0,53$).

Os dados de fluxo sanguíneo durante a CEC fetal dos grupos com e sem pré-condicionamento isquêmico estão apresentados na figura 19.

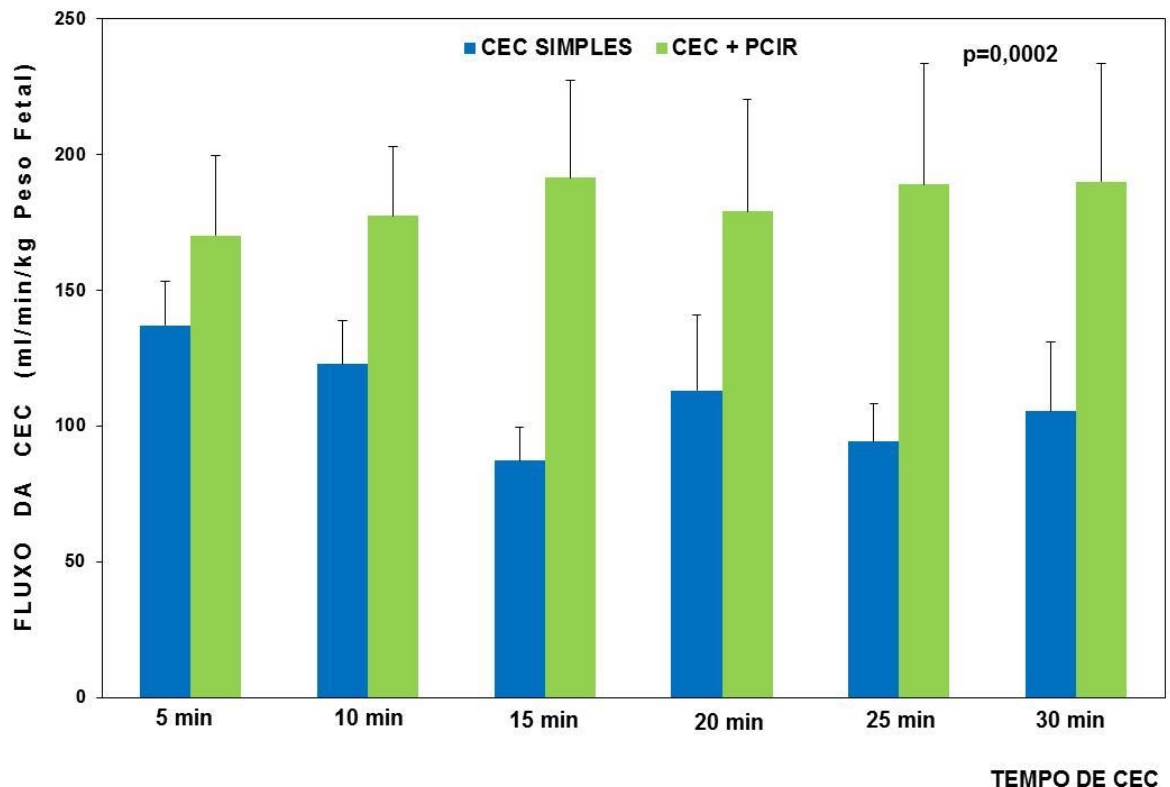


Figura 19 - Fluxo sanguíneo da circulação extracorpórea (CEC) dos grupos com e sem pré-condicionamento isquêmico remoto (PCIR).

$n=6$ para cada grupo; $p=0,0002$ entre os grupos.

Valores (ml/min/Kg de peso fetal) = Média \pm Erro Padrão das Médias.

Houve diferença significativa do fluxo da CEC entre os grupos ($p=0,0002$), variando entre $87,2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1} \pm 12,2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ a $137,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1} \pm 16,3 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ no grupo Controle Positivo, enquanto que no grupo submetido ao pré-condicionamento isquêmico remoto, o fluxo variou

entre $170,1 \text{ ml.min}^{-1}.\text{kg}^{-1} \pm 29,7 \text{ ml.min}^{-1}.\text{kg}^{-1}$ a $191,4 \text{ ml.min}^{-1}.\text{kg}^{-1} \pm 36,0 \text{ ml.min}^{-1}.\text{kg}^{-1}$.

4.2 Avaliação Metabólica

Foram analisadas amostras de sangue arterial fetal, apresentadas nas figuras 19 (pH), 20 (pressão de oxigênio), 21 (pressão de dióxido de carbono), 22 (saturação de oxigênio), 23 (Bicarbonato de sódio) e 24 (lactato).

Os animais submetidos à CEC, com ou sem pré-condicionamento isquêmico remoto, desenvolveram uma acidose progressiva durante e após a CEC, em relação ao grupo controle negativo (Figura 20).

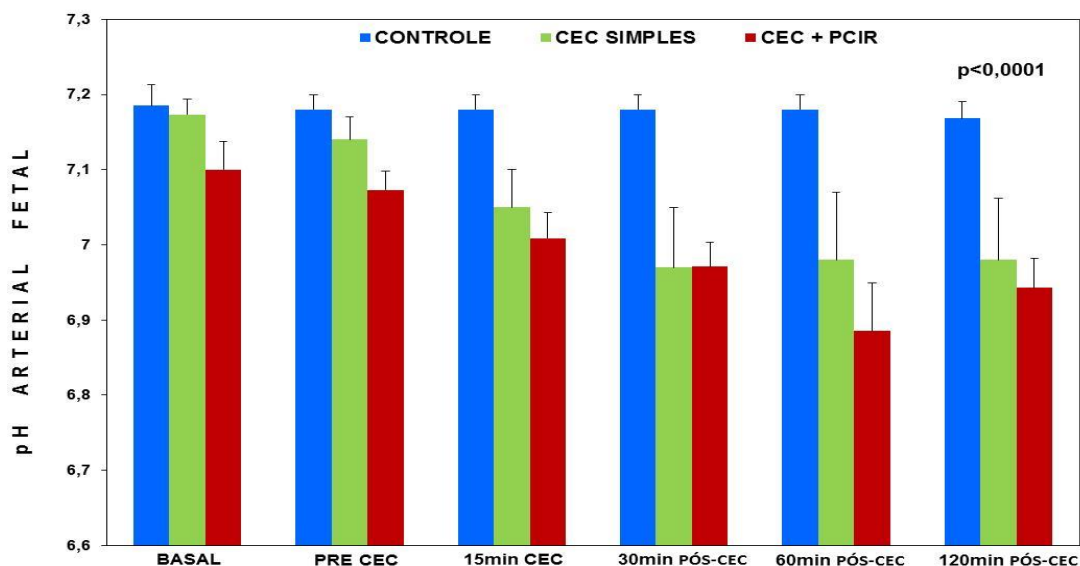


Figura 20 - pH arterial fetal do grupo Controle e dos animais submetidos à circulação extracorpórea (CEC), com e sem pré-condicionamento isquêmico remoto (PCIR).
 n=6 para cada grupo; $p<0,0001$ entre os grupos.
 Valores = Média \pm Erro Padrão das Médias.

Foi observada diferença significativa entre os grupos ($p<0,0001$) e entre os diversos momentos do protocolo ($p=0,0003$). Ambos os grupos de estudo desenvolveram acidose significativa ao longo do protocolo em relação ao grupo controle ($p<0,0001$). Não foi observada diferença significativa entre os grupos de estudo ($p=0,09$).

Em relação às medidas de pO_2 arterial fetal, a figura 21 mostra uma diferença significativa entre os grupos ($p=0,0002$) e entre os diversos momentos do protocolo ($p=0,0009$). Ambos os grupos de estudo apresentaram hipoxemia após o início da CEC, quando comparados ao grupo controle (CEC simples: $p=0,002$; CEC com pré-condicionamento isquêmico remoto: $p=0,0004$). Similarmente ao pH, não foi observada diferença significativa entre os grupos de estudo ($p>0,999$).

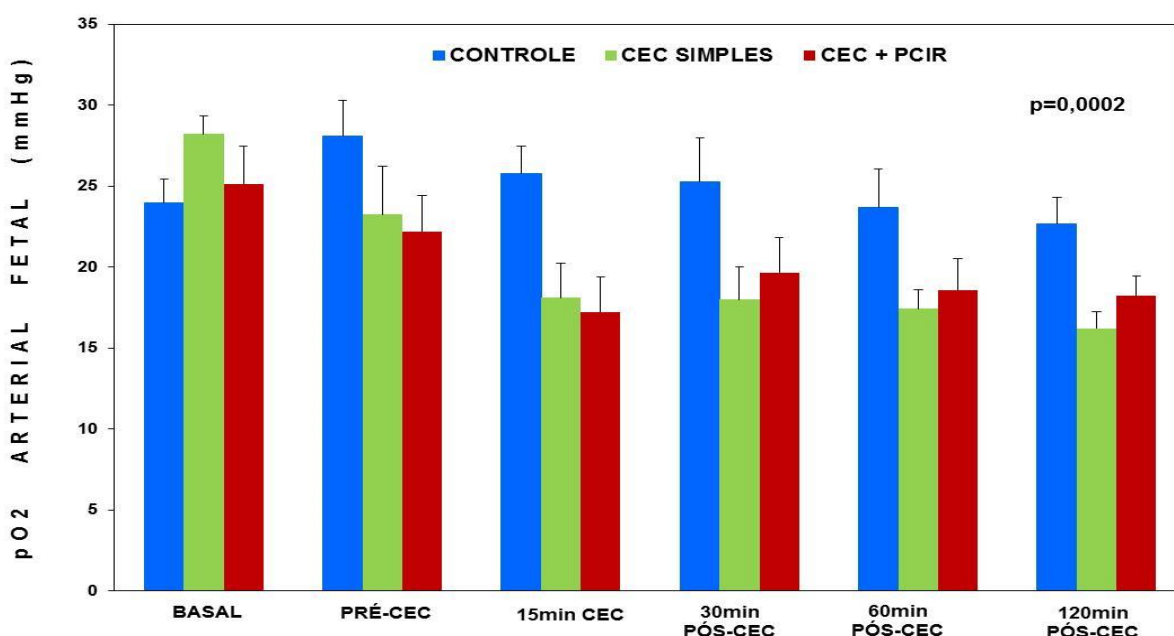


Figura 21 - Pressão de oxigênio arterial fetal do grupo Controle e dos animais submetidos à circulação extracorpórea (CEC), com e sem pré-condicionamento isquêmico remoto (PCIR). $n=6$ para cada grupo; $p=0,0002$ entre os grupos. Valores (mm Hg) = Média \pm Erro Padrão das Médias.

Na figura 22, a análise dos níveis de dióxido de carbono arterial fetal evidenciou uma diferença significativa entre os diversos momentos do protocolo ($p<0,0001$), não identificando, porém, diferença significativa entre os grupos ($p=0,08$). Entretanto, houve uma tendência de aumento progressivo de dióxido de carbono arterial fetal nos animais dos grupos submetidos à CEC, com ou sem pré-condicionamento isquêmico remoto, ocasionando uma acidose respiratória nos fetos destes grupos.

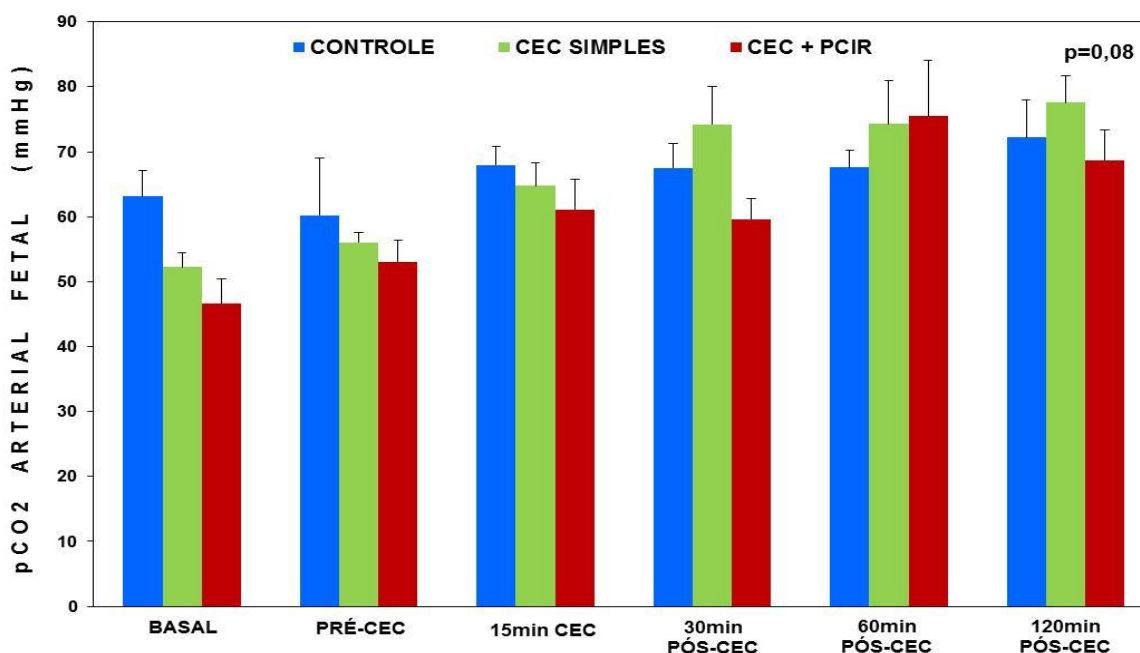


Figura 22 - Pressão de dióxido de carbono arterial fetal do grupo Controle e dos animais submetidos à circulação extracorpórea (CEC), com e sem pré-condicionamento isquêmico remoto (PCIR).

n=6 para cada grupo; $p=0,08$ entre os grupos.

Valores (mm Hg) = Média \pm Erro Padrão das Médias.

A figura 23 mostra o gráfico da saturação de oxigênio arterial fetal dos três grupos. Houve diferença significativa entre os grupos ($p<0,0001$) e entre os diversos momentos do protocolo ($p<0,0001$). A partir do estabelecimento da

CEC, ambos os grupos de estudo evoluíram com uma queda significativa da saturação de oxigênio arterial (sem pré-condicionamento isquêmico remoto: $p < 0,0001$; pré-condicionado: $p = 0,04$) em relação ao grupo Controle Negativo. Foi observada uma saturação de oxigênio arterial fetal inferior no grupo Controle Positivo em relação ao grupo pré-condicionado ($p = 0,02$).

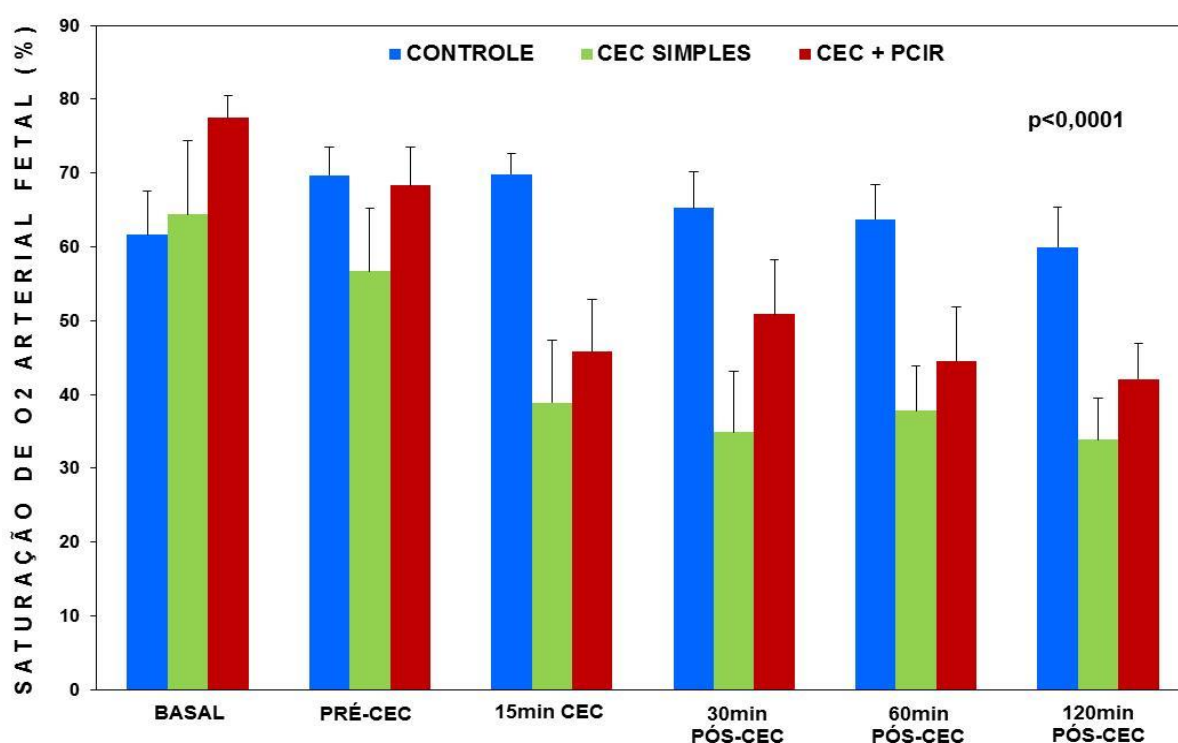


Figura 23 - Saturação de oxigênio arterial fetal do grupo Controle e dos animais submetidos à circulação extracorpórea (CEC), com e sem pré-condicionamento isquêmico remoto (PCIR). $n=6$ para cada grupo; $p < 0,0001$ entre os grupos. Valores (%) = Média \pm Erro Padrão das Médias.

Em relação ao Bicarbonato de Sódio arterial fetal, foi observada diferença significativa entre os grupos ($p < 0,0001$). Ambos os grupos de estudo apresentaram valores de Bicarbonato de Sódio significativamente inferiores ao grupo controle, ao longo do protocolo ($p < 0,0001$ para ambos os grupos de

estudo). O grupo pré-condicionado apresentou níveis sanguíneos significativamente menores que o grupo sem pré-condicionamento isquêmico remoto ($p < 0,0004$), com piora progressiva ao longo do protocolo, o que corrobora uma acidose mista (Figura 24).

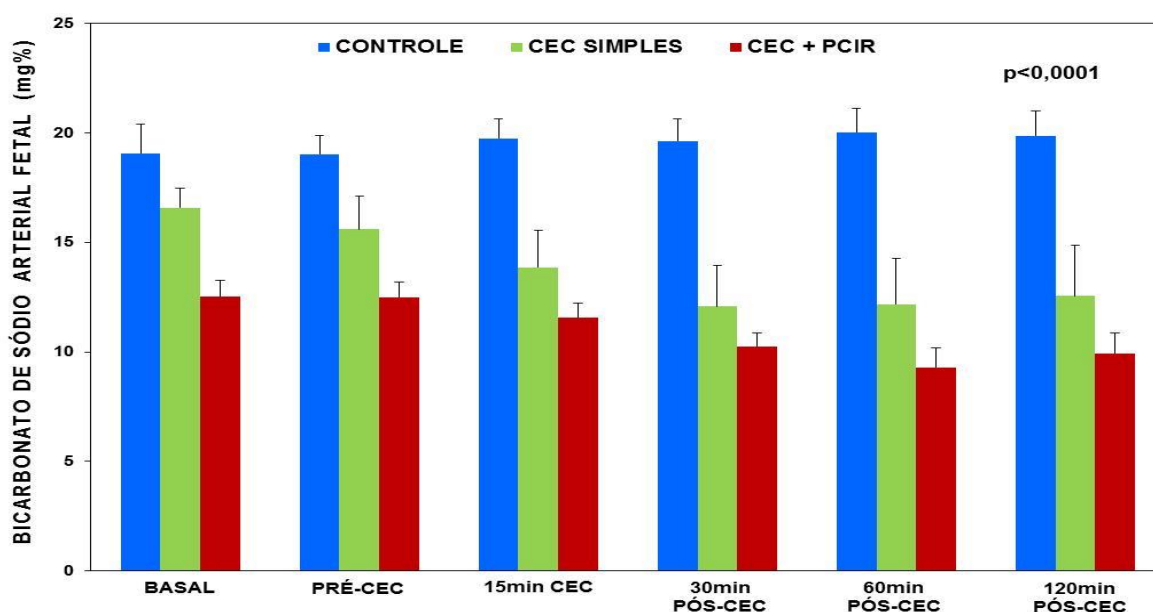


Figura 24 - Bicarbonato de Sódio arterial fetal do grupo Controle e dos animais submetidos à circulação extracorpórea (CEC), com e sem pré-condicionamento isquêmico remoto (PCIR). $n = 6$ para cada grupo; $p < 0,0001$ entre os grupos. Valores (mg/%) = Média \pm Erro Padrão das Médias.

A Figura 25 mostra a evolução dos níveis de lactato durante o protocolo. Houve diferença significativa entre os grupos ($p < 0,0001$) e entre os diversos momentos do protocolo ($p = 0,02$). A partir do estabelecimento da CEC, os animais dos grupos de estudo apresentaram um aumento progressivo do lactato em relação ao grupo controle (grupo Controle Positivo: $p < 0,0001$; pré-condicionado: $p = 0,0003$). Não houve diferença dos valores de lactato entre os grupos de estudo. No final do protocolo, foi observado um incremento de

140,9% no grupo Controle Positivo e de 144,2% no grupo **com** pré-condicionamento isquêmico remoto, em relação ao grupo Controle Negativo no mesmo momento.

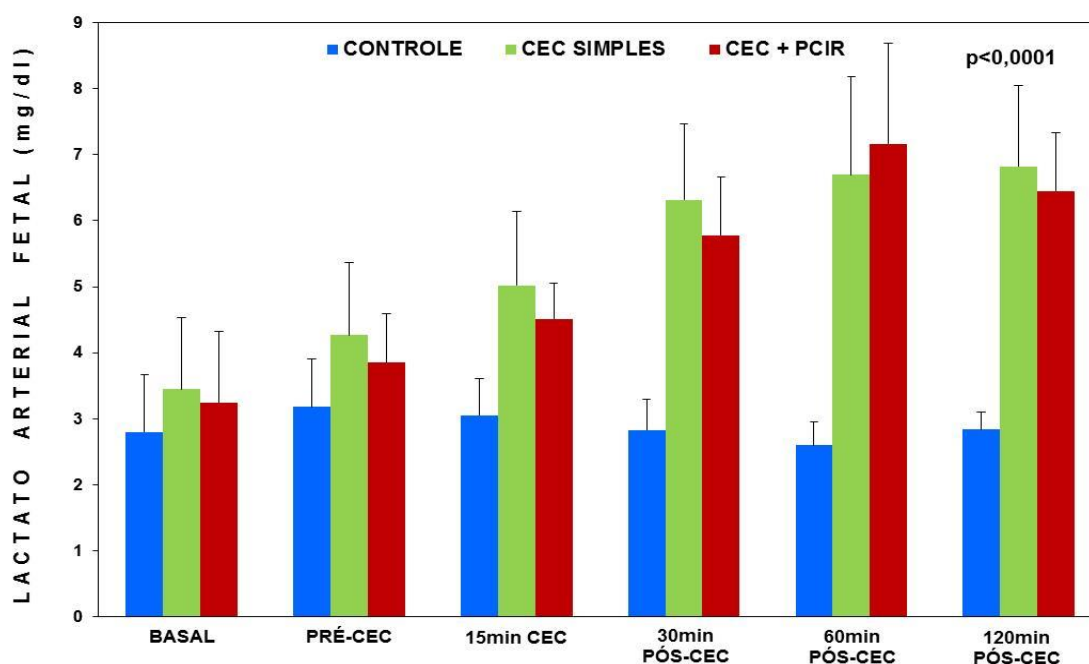


Figura 25 - Lactato venoso fetal do grupo Controle e dos animais submetidos à circulação extracorpórea (CEC), com e sem pré-condicionamento isquêmico remoto (PCIR). n= 6 para cada grupo; p<0,0001 entre os grupos. Valores (mg/dl) = Média \pm Erro Padrão das Médias.

4.3 Avaliação do Processo Inflamatório

4.3.1 Avaliação Histológica

O percentual da espessura das paredes das arteríolas bronquiolares fetais dos três grupos está demonstrado na figura 26. Foi observada diferença significativa entre os grupos (p<0,01), sendo que o grupo da CEC simples

apresentou um percentual de espessura da arteríolas bronquiolares significativamente maior que o grupo controle ($p < 0,05$). Por outro lado, não houve diferenças quanto ao percentual de espessura dessas arteríolas entre os grupos de fetos pré-condicionados e o grupo Controle.

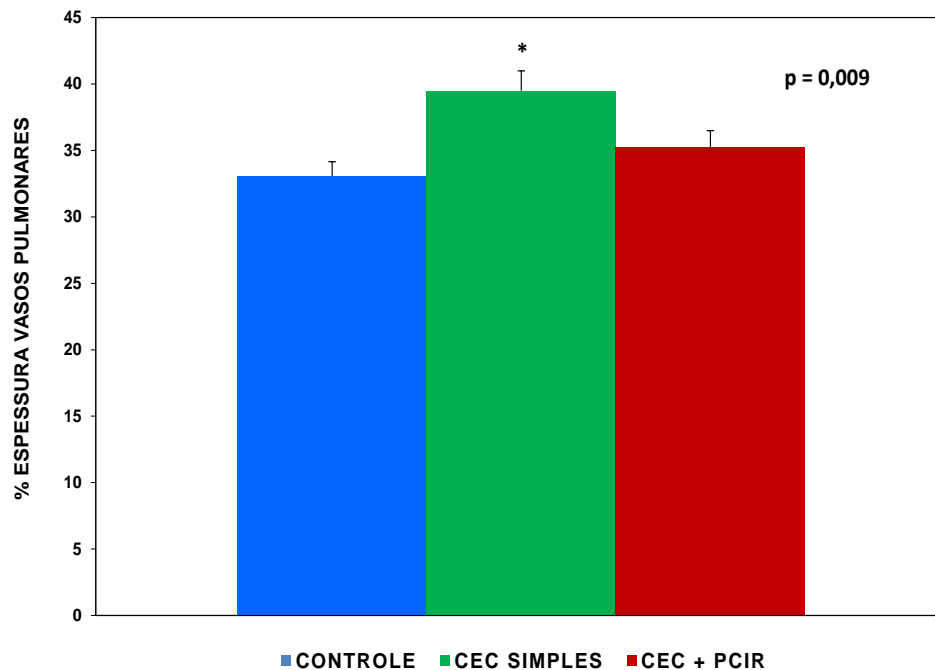


Figura 26 - Percentual da espessura das arteríolas bronquiolares do grupo Controle e dos animais submetidos à circulação extracorpórea (CEC), com e sem pré-condicionamento isquêmico remoto (PCIR).

n= 6 para cada grupo; $p < 0,01$ entre os grupos.

Valores (%) = Média ± Erro Padrão das Médias.

Em relação à fração de área dos septos interlobulares dos pulmões fetais, demonstrada na figura 27, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos ($p = 0,589$).

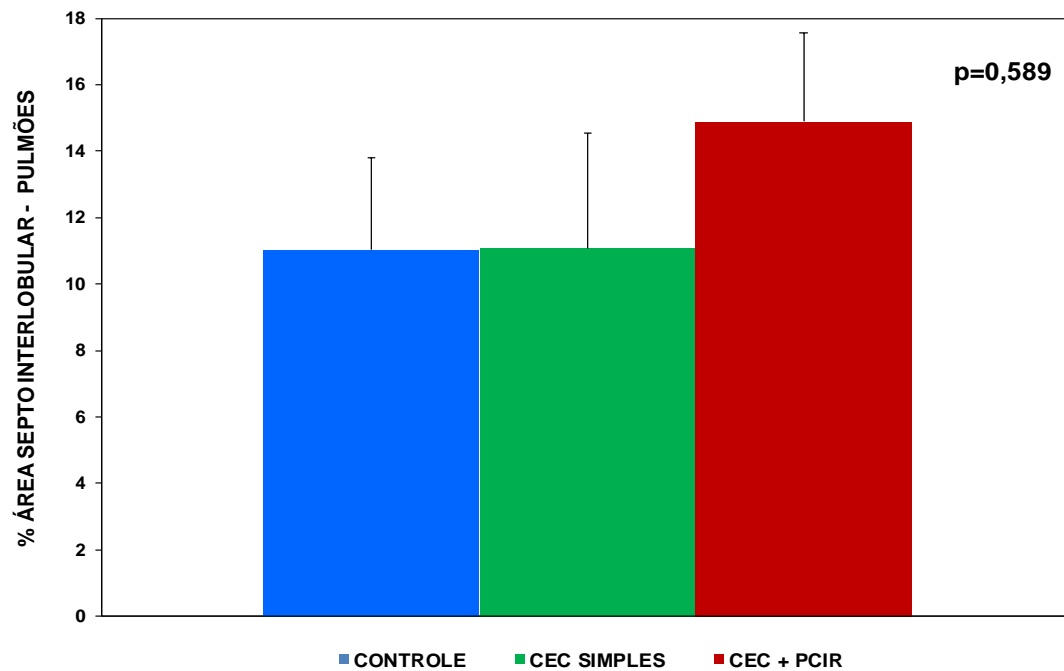


Figura 27 - Percentual da área do septo interlobular pulmonar do grupo Controle e dos animais submetidos à circulação extracorpórea (CEC), com e sem pré-condicionamento isquêmico remoto (PCIR).

n= 6 para cada grupo; $p > 0,05$ entre os grupos.

Valores (%) = Média \pm Erro Padrão das Médias.

A fração de área dos núcleos das células placentárias está apresentada na figura 28. Não foi observada diferença significativa entre os grupos ($p = 0,65$) ou entre os momentos basal e final ($p = 0,07$).

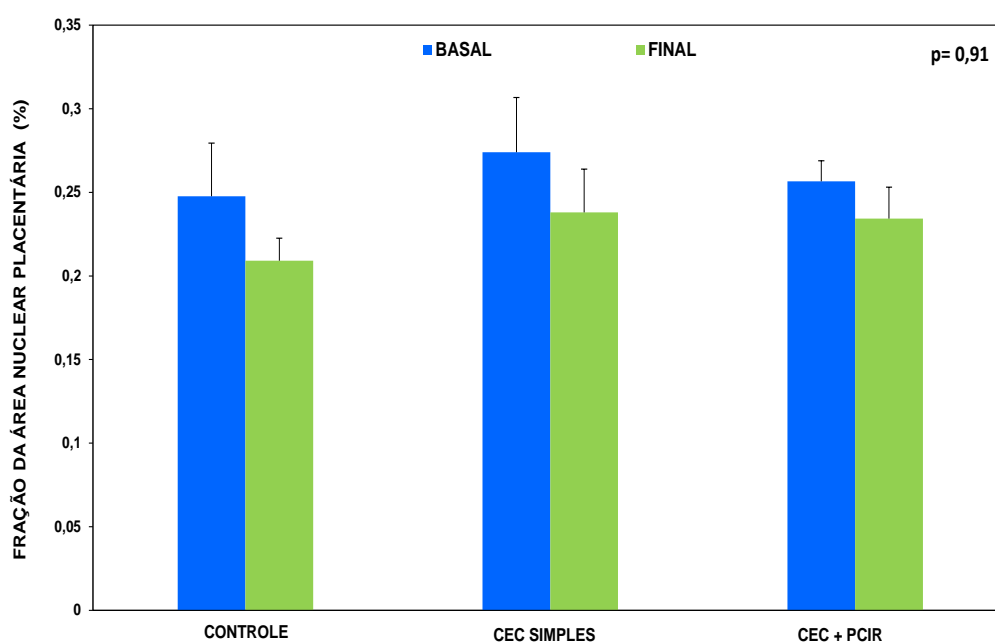


Figura 28 - Fração da área dos núcleos das células placentárias do grupo Controle e dos animais submetidos à circulação extracorpórea (CEC), com e sem pré-condicionamento isquêmico remoto (PCIR).

n= 6 para cada grupo; p=0,91 para interação entre grupos e momentos.

Valores (%) = Média \pm Erro Padrão das Médias.

A fração de área dos vasos intersticiais da placenta está apresentada na figura 29. Foram observadas diferenças entre os grupos ($p < 0,03$) e entre os momentos do protocolo ($p < 0,04$). A diferença foi pontuada no momento basal, entre os grupos controle e CEC simples ($p < 0,01$).

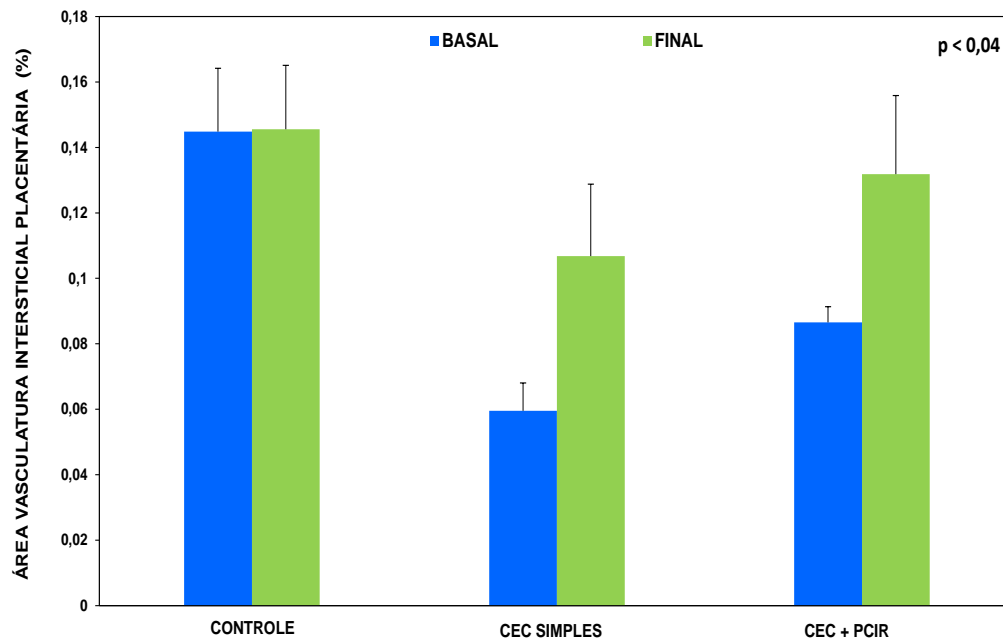


Figura 29 - Fração da área dos vasos placentários do grupo Controle e dos animais submetidos à circulação extracorpórea (CEC), com e sem pré-condicionamento isquêmico remoto (PCIR).

n= 6 para cada grupo; $p < 0,04$ para interação entre grupos e momentos.

Valores (%) = Média \pm Erro Padrão das Médias.

4.3.2 Imuno-histoquímica da Placenta - Interstício

A expressão da molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) no interstício da placenta dos três grupos está demonstrada na Figura 30. Os grupos de estudo apresentaram níveis inferiores àqueles do momento basal do grupo Controle ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa entre os grupos no momento final ($p > 0,05$).

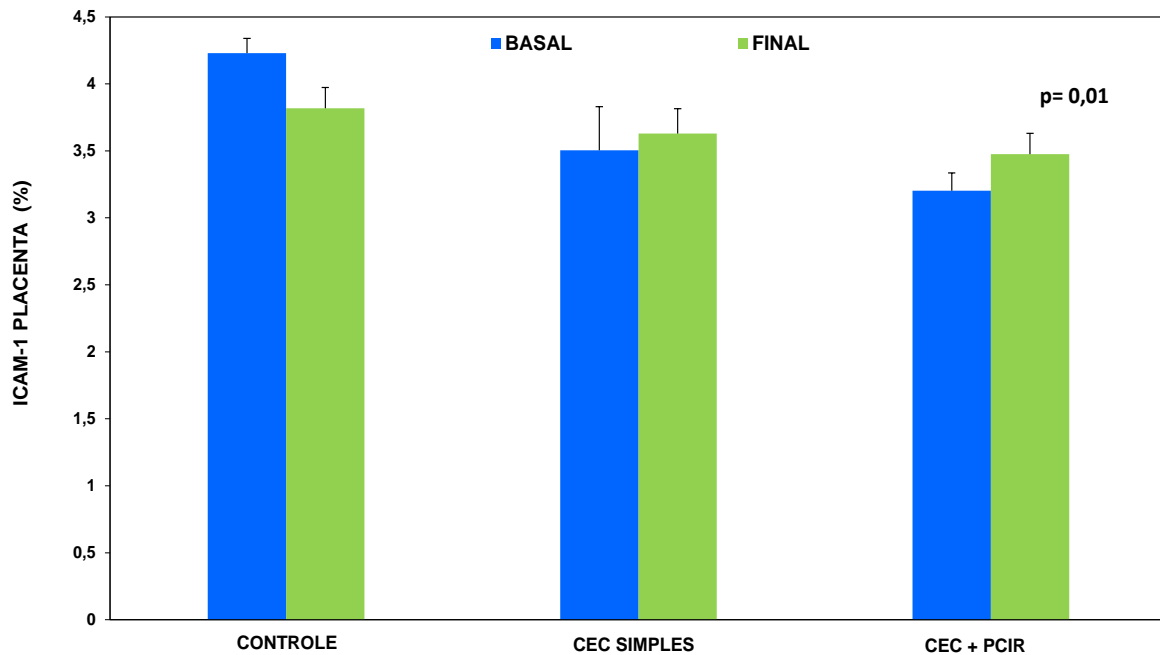


Figura 30 - Valores percentuais basais e finais da molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) na placenta do grupo Controle e daqueles submetidos à circulação extracorpórea (CEC), com e sem pré-condicionamento isquêmico remoto (PCIR).

n= 6 para cada grupo; p=0,01 entre os grupos.

Valores (%) = Média \pm Erro Padrão das Médias.

Não foram observadas diferenças significativas para os valores da expressão da molécula de adesão vascular-1 (VCAM-1) no interstício da placenta dos três grupos, conforme demonstrado na Figura 31 ($p>0,05$).

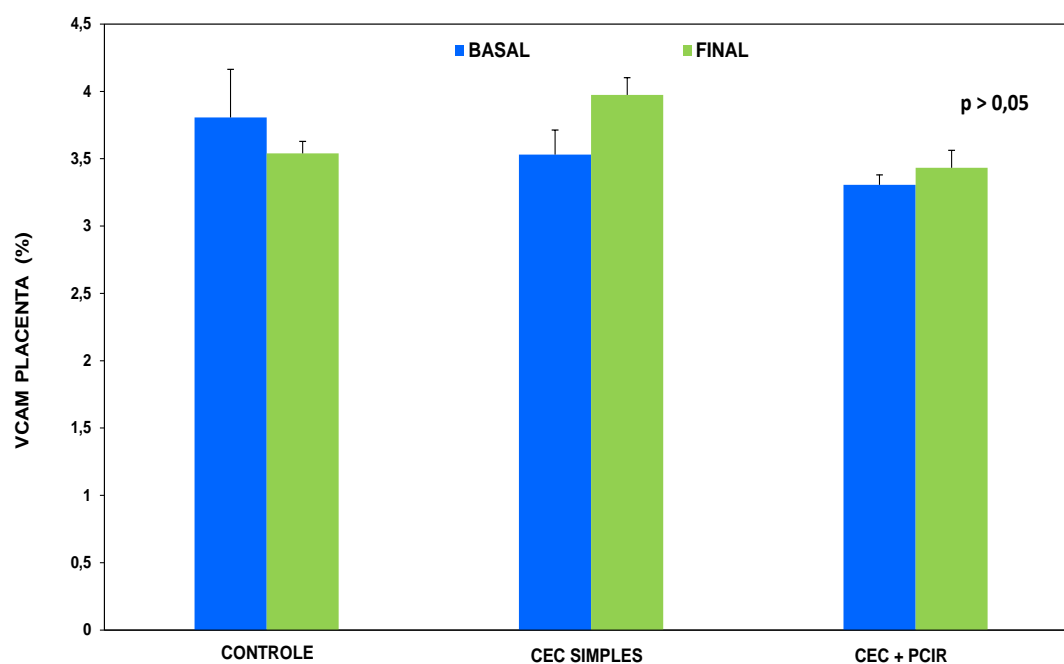


Figura 31- Valores percentuais basais e finais da molécula de adesão vascular-1 (VCAM-1) no interstício da placenta do grupo Controle e dos animais submetidos à circulação extracorpórea (CEC), com e sem pré-condicionamento isquêmico remoto (PCIR).
n= 6 para cada grupo; $p > 0,05$ entre os grupos, nos momentos basal e final do protocolo.
Valores (%) = Média \pm Erro Padrão das Médias.

A Figura 32 mostra os valores percentuais basais e finais do receptor *Toll-Like-4* no interstício da placenta dos três grupos. Similarmente ao VCAM, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos ou entre os momentos basal e final ($p=0,15$).

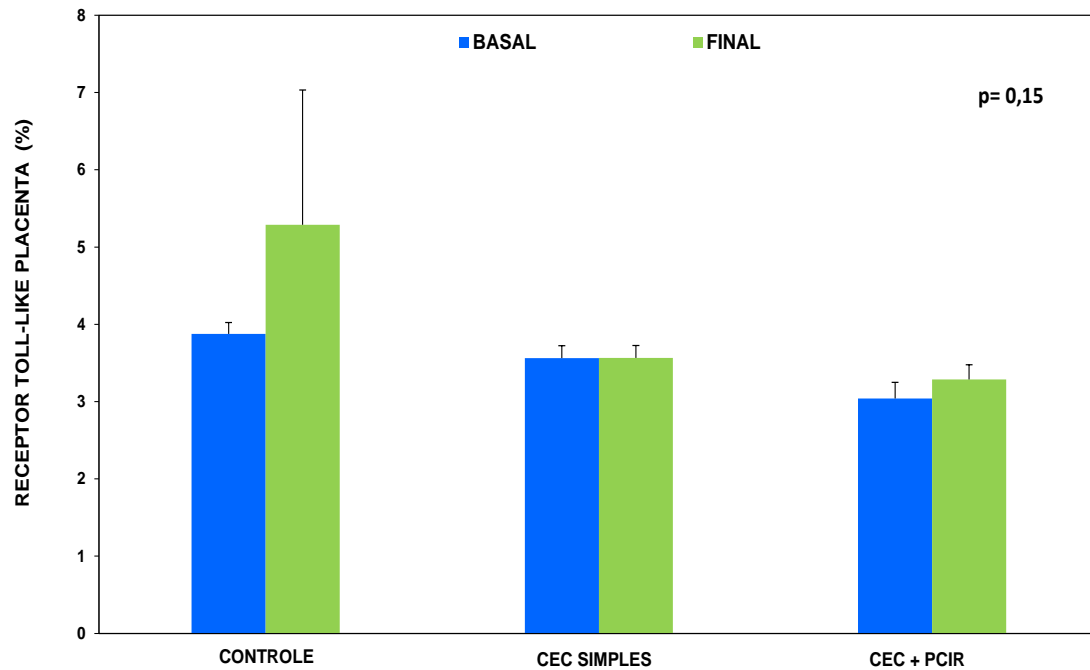


Figura 32 - Valores percentuais basais e finais do receptor *Toll-Like-4* (TLR) no interstício da placenta do grupo Controle e dos animais submetidos à circulação extracorpórea (CEC), com e sem pré-condicionamento isquêmico remoto (PCIR).
 n= 6 para cada grupo; p=0,15 entre os grupos, nos momentos basal e final do protocolo.
 Valores (%) = Média \pm Erro Padrão das Médias.

4.3.3 Imuno-histoquímica da Vasculatura Placentária

A figura 33 mostra os valores percentuais basais e finais da expressão da molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) na vasculatura placentária dos animais dos três grupos. Ambos os grupos de estudo apresentaram maior expressão desta molécula em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

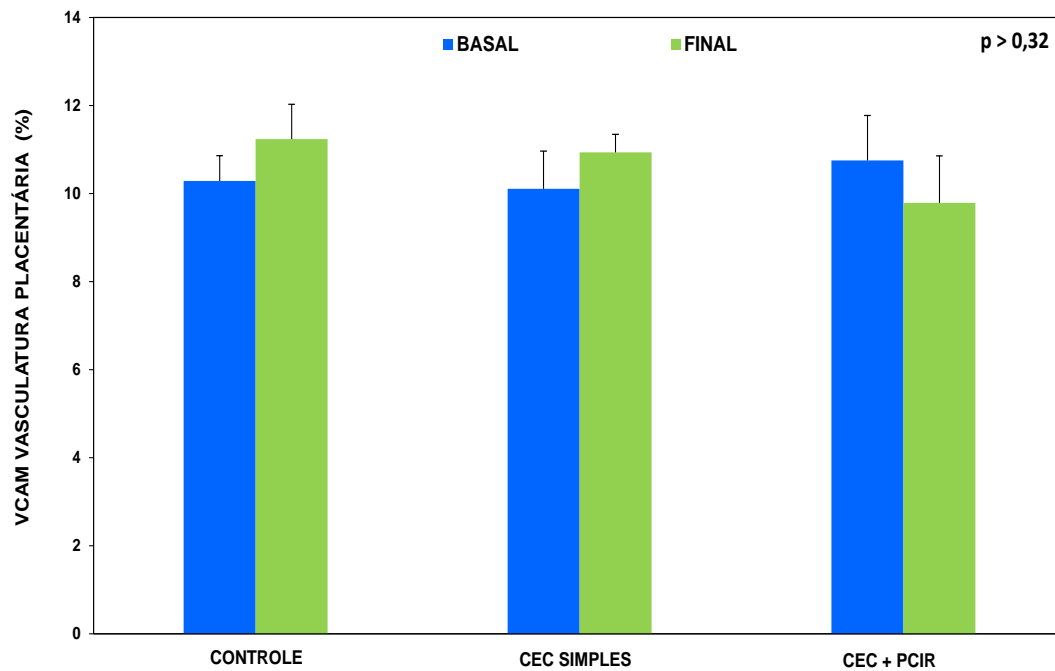


Figura 33 - Valores percentuais basais e finais da molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) da vasculatura placentária dos animais do grupo Controle e daqueles submetidos à circulação extracorpórea (CEC), com e sem pré-condicionamento isquêmico remoto (PCIR). n= 6 para cada grupo; $p < 0,004$ entre os grupos. Valores (%) = Média \pm Erro Padrão das Médias.

A expressão da molécula de adesão vascular (VCAM) na vasculatura placentária dos três grupos está demonstrada na Figura 34. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos ou entre os momentos basal e final ($p > 0,32$).

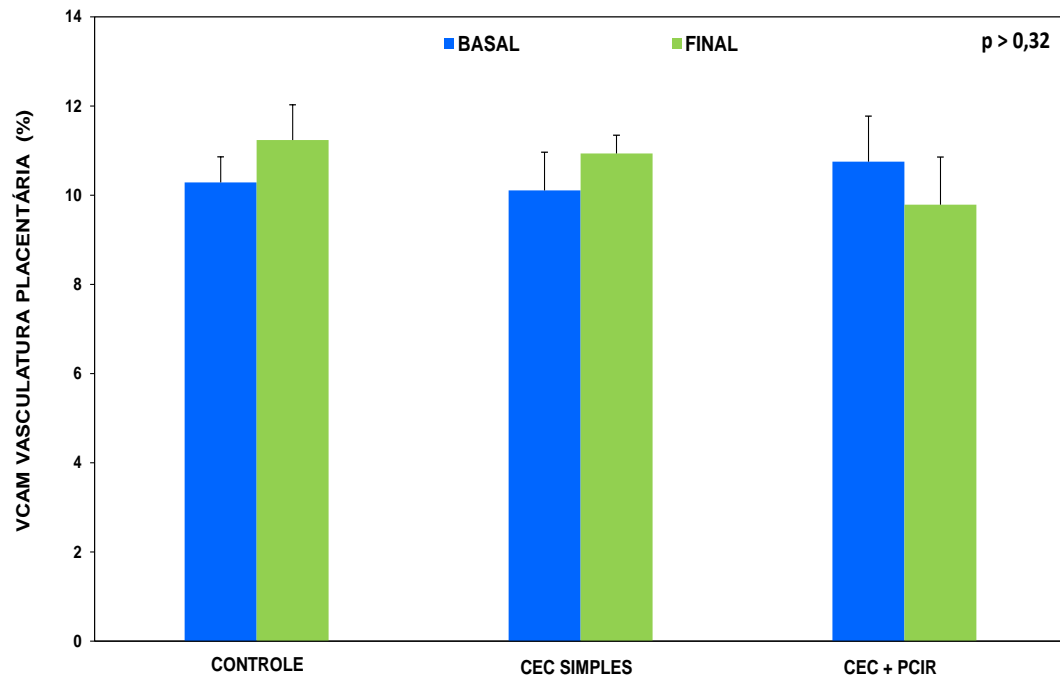


Figura 34 - Valores percentuais basais e finais da molécula de adesão vascular (VCAM) da vasculatura placentária dos animais do grupo Controle e daqueles submetidos à circulação extracorpórea (CEC), com e sem pré-condicionamento isquêmico remoto (PCIR).
n= 6 para cada grupo; $p > 0,32$ para interação entre grupos e momentos.
Valores (%) = Média \pm Erro Padrão das Médias.

A figura 35 mostra os valores percentuais basais e finais da expressão do receptor *Toll-Like 4* na vasculatura placentária dos animais dos três grupos. Similarmente ao VCAM, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos ou entre os momentos basal e final ($p > 0,71$).

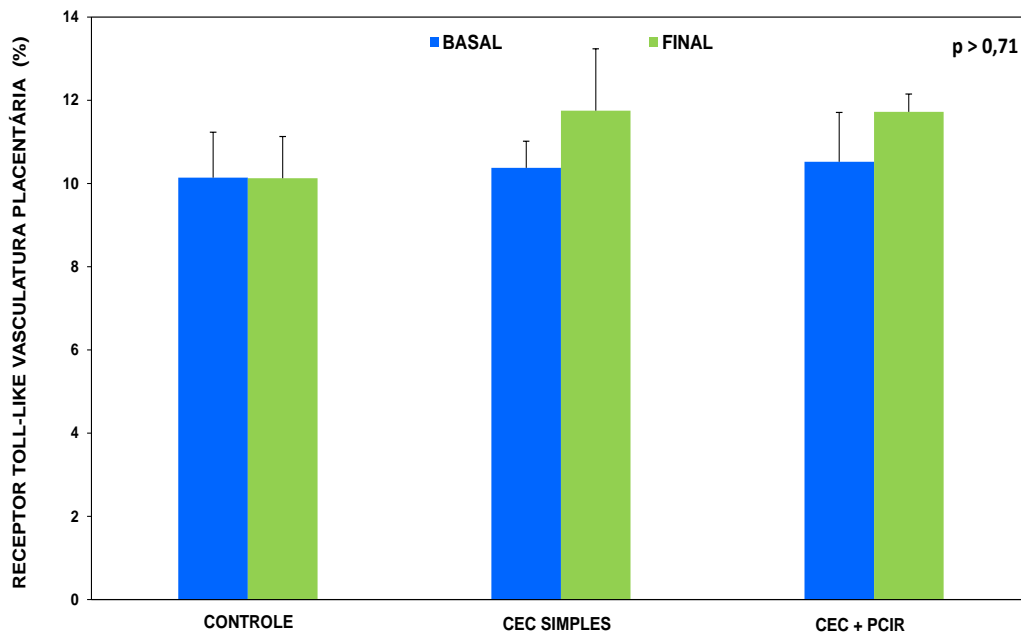


Figura 35 - Valores percentuais basais e finais do receptor *Toll-Like* 4 (TLR) da vasculatura placentária dos animais do grupo Controle e daqueles submetidos à circulação extracorpórea (CEC), com e sem pré-condicionamento isquêmico remoto (PCIR).
 n= 6 para cada grupo; $p > 0,71$ para interação entre grupos e momentos.
 Valores (%) = Média \pm Erro Padrão das Médias.

4.3.4 Imuno-histoquímica dos Pulmões Fetais

A figura 36 mostra os valores percentuais da expressão da molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) nos pulmões dos animais dos três grupos. Não houve diferenças significativas entre os grupos ($p = 0,467$).

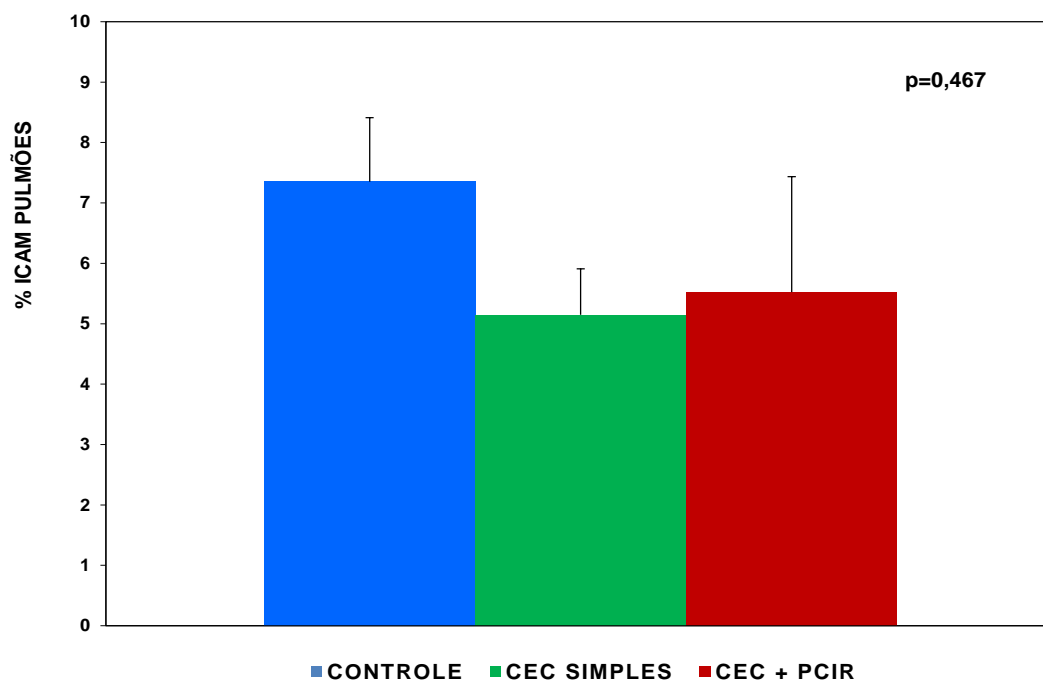


Figura 36 - Valores percentuais da molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) nos pulmões dos animais do grupo Controle e daqueles submetidos à circulação extracorpórea (CEC), com e sem pré-condicionamento isquêmico remoto (PCIR).

n= 6 para os grupos Controle negativo e positivo; n= 5 para o grupo submetido à CEC e PCIR. p=0,467 entre os grupos; Valores (%) = Média ± Erro Padrão das Médias.

A expressão da molécula de adesão vascular-1 (VCAM-1) nos pulmões dos animais dos três grupos está demonstrada na Figura 37. Similarmente à molécula de adesão intercelular-1, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos (p= 0,240).

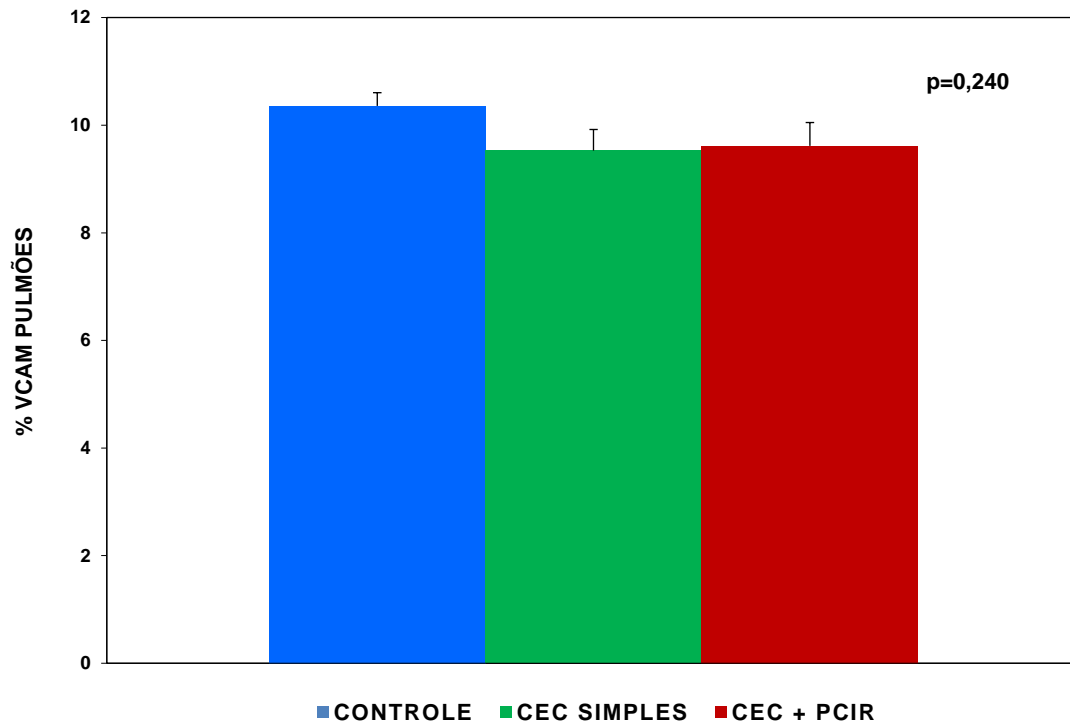


Figura 37 - Valores percentuais da molécula de adesão vascular-1 (VCAM-1) nos pulmões dos animais do grupo Controle e daqueles submetidos à circulação extracorpórea (CEC), com e sem pré-condicionamento isquêmico remoto (PCIR).
n= 6 para cada grupo; p=0,240 entre os grupos.
Valores (%) = Média ± Erro Padrão das Médias.

A figura 38 mostra os valores percentuais da expressão do receptor *Toll-Like* 4 nos pulmões dos animais dos três grupos. Similarmente às moléculas de adesão intercelular e vascular, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos (p= 0,225).

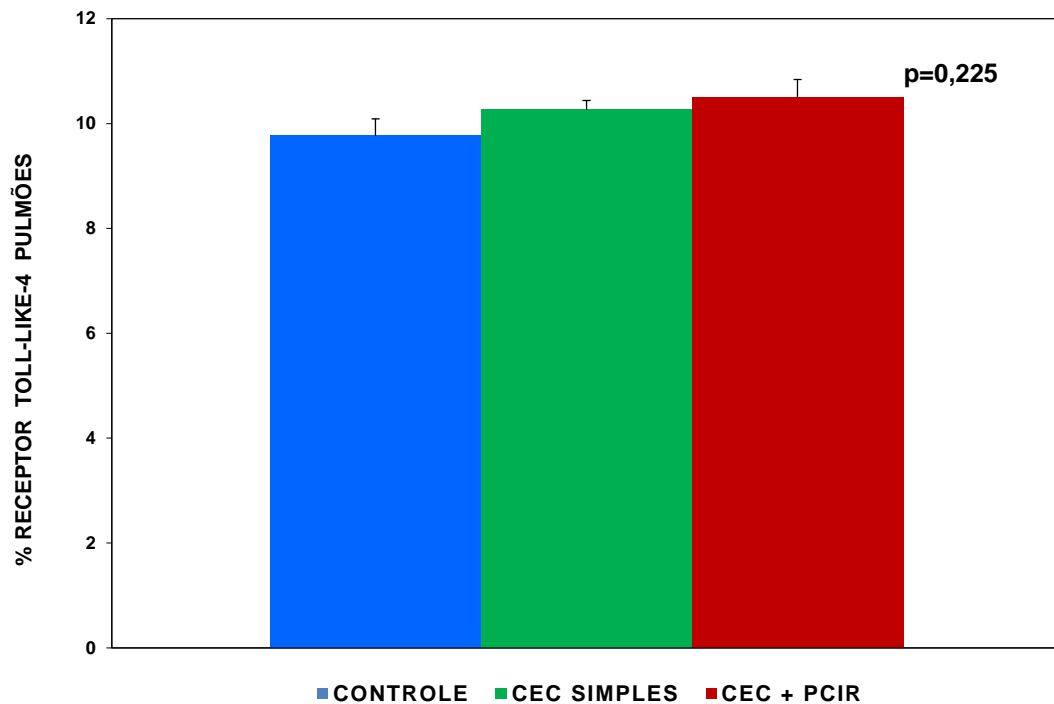


Figura 38 - Valores percentuais do receptor *Toll-Like 4* (TLR) nos pulmões dos animais do grupo Controle e daqueles submetidos à circulação extracorpórea (CEC), com e sem pré-condicionamento isquêmico remoto (PCIR).

n= 6 para cada grupo; p=0,225 entre grupos.

Valores (%) = Média \pm Erro Padrão das Médias.

4.3.5 Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA)

A figura 39 mostra os valores séricos fetais de tromboxana A2 dos três grupos. Os grupos de estudo foram diferentes do grupo Controle (p=0,03). Após 60 minutos da interrupção da CEC fetal, o pré-condicionamento isquêmico remoto foi capaz de minimizar significativamente a liberação desta prostaglandina vasoativa (p=0,03).

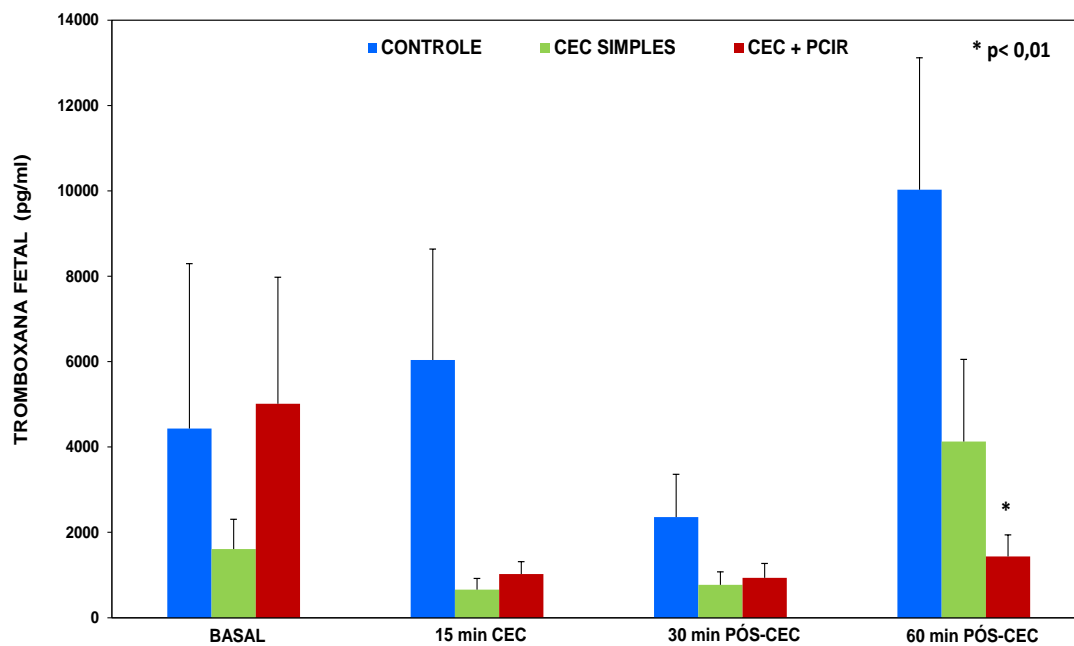


Figura 39 - Valores séricos fetais de Tromboxana do grupo Controle e dos animais submetidos à circulação extracorpórea (CEC), com e sem pré-condicionamento isquêmico remoto (PCIR). n= 6 para cada grupo; p=0,01 entre os grupos controle positivo e aquele submetido à circulação extracorpórea (CEC), com pré-condicionamento isquêmico remoto (PCIR). Valores (pg/ml) = Média \pm Erro Padrão das Médias.

Os valores séricos de Prostaglandina fetal dos três grupos estão apresentados na figura 40. Após 60 minutos de encerramento da CEC fetal, foi observada diferença significativa entre os grupos de estudo, com um aumento de 249,44% no grupo pré-condicionado em relação ao grupo da CEC simples (p=0,02).

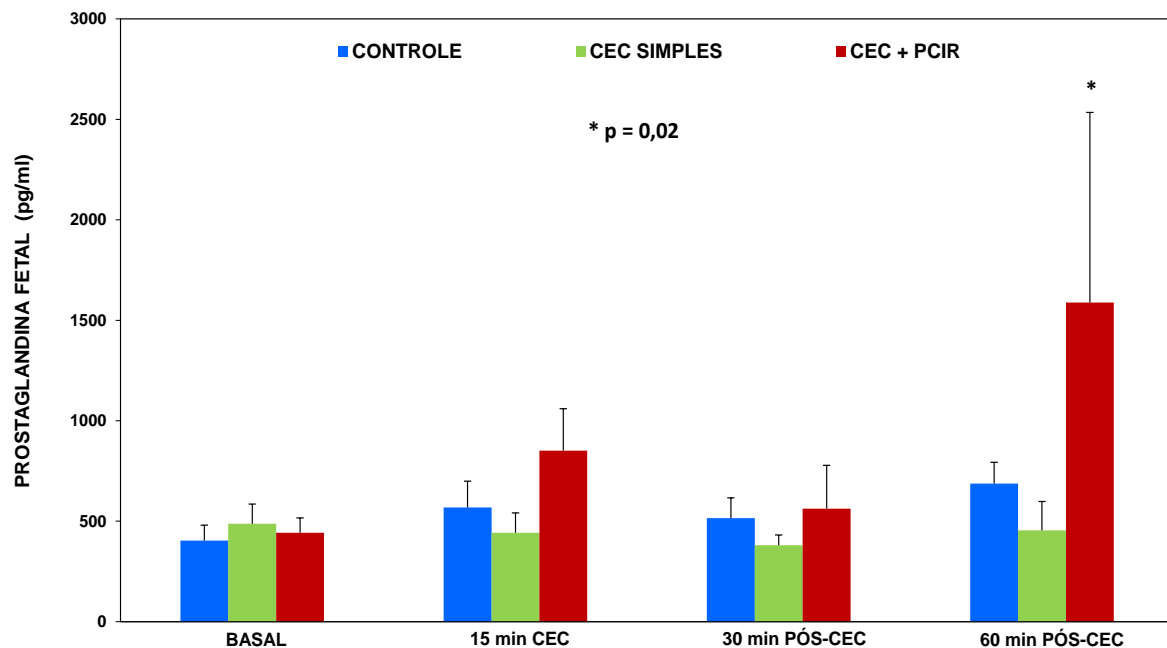


Figura 40 - Valores séricos fetais de Prostaglandina E2 do grupo Controle e dos animais submetidos à circulação extracorpórea (CEC), com e sem pré-condicionamento isquêmico remoto (PCIR). n= 6 para cada grupo; p=0,02 entre os grupos submetidos à CEC, com e sem PCIR. Valores (pg/ml) = Média \pm Erro Padrão das Médias.

O Fator de Necrose Tumoral Alfa não apresentou variações significativas entre os grupos ou durante os diversos tempos do protocolo ($p > 0,08$), conforme demonstrado na figura 41.

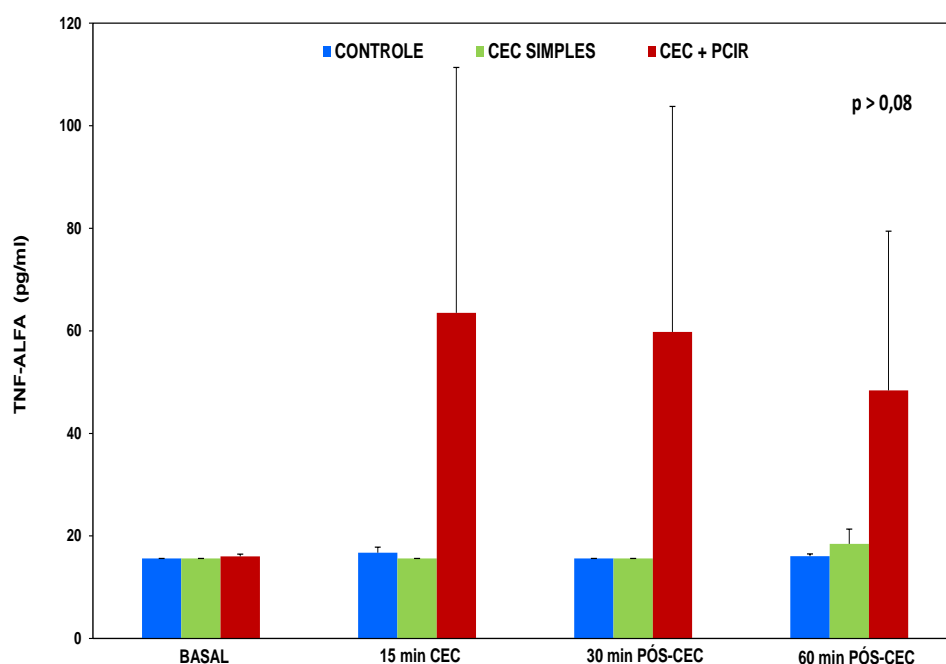


Figura 41 - Valores séricos fetais de Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α) do grupo Controle e dos animais submetidos à circulação extracorpórea (CEC), com e sem pré-condicionamento isquêmico remoto (PCIR).

n= 6 para cada grupo; p=0,02 entre os grupos submetidos à CEC, com e sem PCIR.

Valores (pg/ml) = Média \pm Erro Padrão das Médias.

Os valores séricos fetais de Interleucina 1 dos três grupos estão apresentados na figura 42. Foi observada diferença significativa entre os grupos, sendo que o pré-condicionamento isquêmico manteve níveis baixos desta citocina ao longo do protocolo em relação aos demais grupos (p<0,0001).

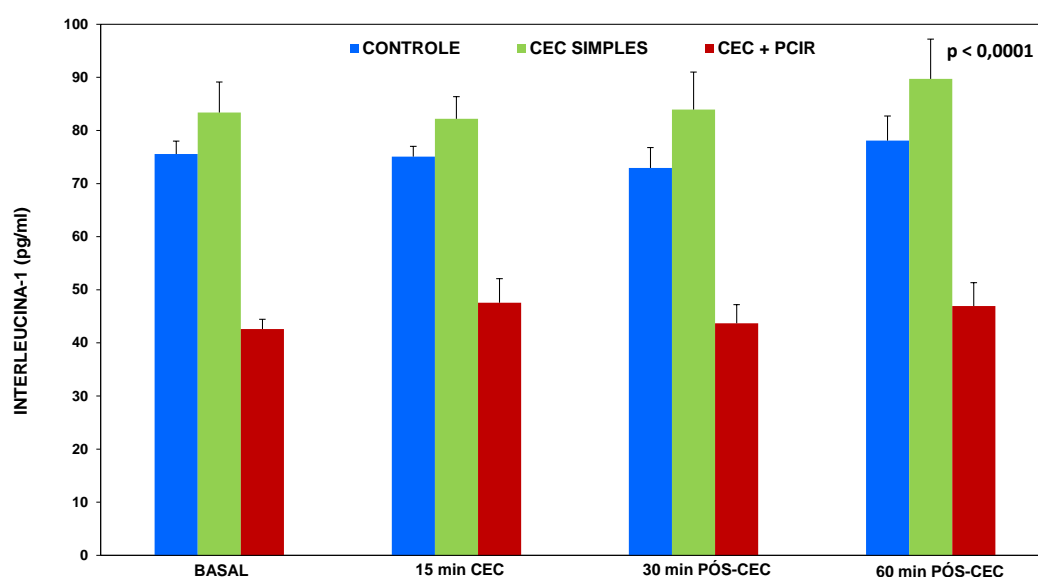


Figura 42 - Valores séricos fetais de Interleucina-1 do grupo Controle e dos animais submetidos à circulação extracorpórea (CEC), com e sem pré-condicionamento isquêmico remoto (PCIR). n= 6 para cada grupo; $p < 0,0001$ entre o grupo submetido à CEC com PCIR e os demais grupos.
Valores (pg/ml) = Média \pm Erro Padrão das Médias.

A análise dos valores séricos fetais de Interleucina-6 evidenciou diferença significativa entre os três grupos ao longo do protocolo ($p = 0,042$), conforme demonstrado na figura 43. Paradoxalmente à redução dos marcadores pró-inflamatórios Tromboxana A-2 e Interleucina 1-B, foi observado um aumento significativo da Interleucina-6 no grupo submetido ao PCIR após 30 minutos do encerramento da CEC.

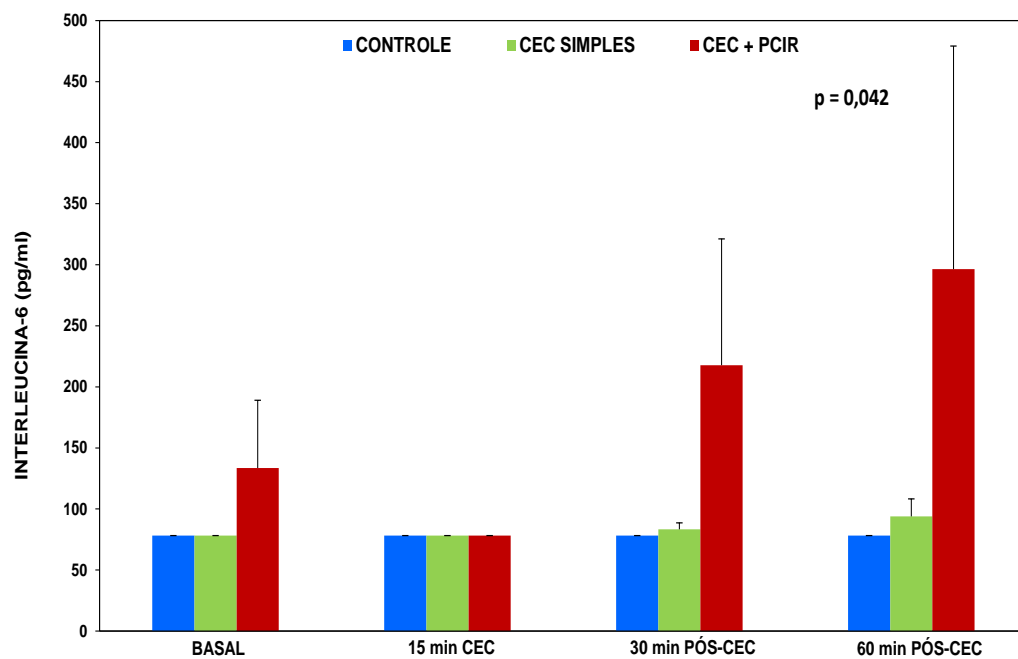


Figura 43 - Valores séricos fetais de Interleucina-6 do grupo Controle e dos animais submetidos à circulação extracorpórea (CEC), com e sem pré-condicionamento isquêmico remoto (PCIR). n= 6 para cada grupo; p=0,042 entre os grupos. Valores (pg/ml) = Média \pm Erro Padrão das Médias.

Os valores séricos fetais de Interleucina 10 dos três grupos estão apresentados na figura 44. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos de estudo nem ao longo do protocolo ($p > 0,05$).

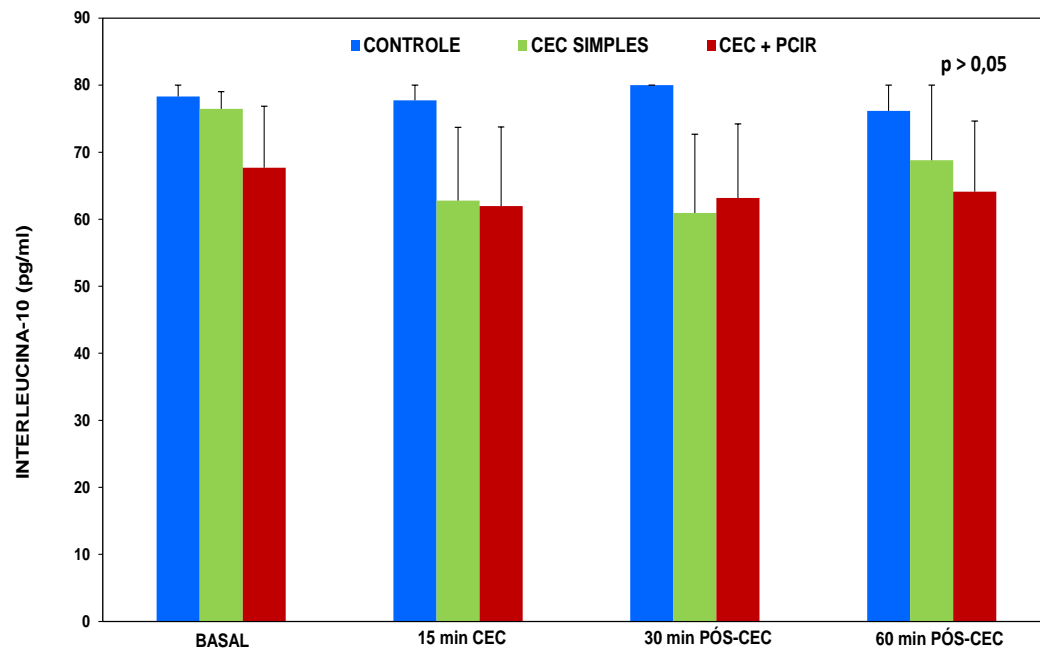


Figura 44 - Níveis séricos fetais de Interleucina 10 (IL-10) do grupo Controle e dos animais submetidos à circulação extracorpórea (CEC), com e sem pré-condicionamento isquêmico remoto (PCIR).

n= 6 para cada grupo; $p>0,05$ entre grupos.

Valores (pg/ml) = Média \pm Erro Padrão das Médias

5- DISCUSSÃO

A correção cirúrgica de determinadas cardiopatias congênitas complexas ainda na vida intra-uterina pode se beneficiar do potencial de hiperplasia e de proliferação vascular coronariana presentes no feto, diferentemente da condição pós-natal, evitando-se assim as lesões progressivas relacionadas ao distúrbio da corrente sanguínea pelas câmaras cardíacas e vasos sanguíneos. Esta abordagem terapêutica intra-uterina pode suscitar o auxílio da CEC para tratar lesões intra-cardíacas. Apesar de importantes avanços nas pesquisas em cirurgia cardíaca intra-uterina, o denominador comum dos estudos prévios a respeito da CEC fetal tem sido a disfunção placentária, caracterizada pelo aumento de sua resistência vascular e queda do fluxo sanguíneo, com consequente prejuízo nas trocas gasosas fetais.^{44,45,80} Diversas pesquisas científicas têm focalizado nos mecanismos para coibir esta disfunção e melhorar as chances de sucesso do procedimento. O presente estudo avaliou o impacto do pré-condicionamento isquêmico em modelo experimental de fetos ovinos submetidos à circulação extracorpórea. Foi demonstrado que a liberação de alguns mediadores pró-inflamatórios com propriedades vasoativas foi minimizada com a aplicação do pré-condicionamento isquêmico remoto. Apesar disso, não houve um impacto positivo na função placentária durante e após a CEC fetal.

5.1 Pré-condicionamento isquêmico remoto

O pré-condicionamento isquêmico remoto tem sido utilizado com sucesso em cirurgias de crianças com cardiopatias congênitas, revascularização do miocárdio, troca valvar, correção de aneurisma da aorta abdominal e angioplastias coronarianas. Todavia, este tipo de estratégia permanece controverso e nunca foi descrito previamente para aplicação em intervenções fetais. Curtos períodos de isquemia do músculo esquelético, seguidos de reperfusão, induzem um mecanismo de proteção, quando ocorre algum insulto posterior. O PCIR envolve a ativação de vias humorais e neuronais que, atuando em órgãos distantes, desencadeiam mecanismos anti-inflamatórios e de proteção contra o estresse oxidativo, tornando as células mais resistentes à necrose. Contudo, não há na literatura científica mundial nenhum estudo que aborde a influencia do PCIR na fisiopatologia da CEC fetal. Apesar dos efeitos benéficos do PCIR descritos em modelos animais e em humanos, o presente estudo é o primeiro a analisar sua influência na função placentária durante e após a CEC fetal. Todos os animais submetidos ao PCIR apresentaram uma piora progressiva das trocas gasosas placentárias, semelhante ao grupo da CEC simples. Como a placenta não apresenta mecanismo auto-regulatório e é desprovida de inervação,^{9,46,47,81} o fluxo sanguíneo placentário é regido principalmente pelo equilíbrio entre agentes vasodilatadores endócrinos, parácrinos e biomecânicos, tais como prostaciclina⁸², óxido nítrico⁸³ e peptídeo atrial natriurético⁸⁴ de um lado e, de outro lado, agentes vasoconstritores, tais como tromboxana⁸⁵, prostaglandina

E2^{44,45}, endotelina-1⁸⁶ e angiotensina⁸⁷. Entretanto, outros fatores podem também ter um papel importante na fisiopatologia da disfunção placentária, como ativação de neutrófilos e do sistema complemento, sequestro e liberação de citocinas pró-inflamatórias e radicais livres, com consequente disfunção endotelial. Pelo fato do feto realizar trocas gasosas placentárias com os lagos venosos maternos, o metabolismo fetal está fisiologicamente adaptado à baixa saturação de oxigênio no sangue arterial (em torno de 75%). No presente estudo, o efeito anti-inflamatório do PCIR não foi impactante na inibição da disfunção placentária durante e após a CEC fetal, corroborando os achados de Zhou et al., que utilizaram, na CEC de fetos caprinos, o inibidor do fator nuclear kappa-B, um dos principais agentes reguladores de resposta inflamatória.⁸⁸ Talvez a duração ou a quantidade de massa muscular envolvidos na isquemia não tenham sido suficientes para desencadear um estímulo pleno dos agentes anti-inflamatórios ou anti-oxidantes, uma variável tempo dependente, segundo Weinbrenner et al.⁷⁷ Como este é o primeiro estudo desta linha de pesquisa que aborda o PCIR, futuros estudos deverão avaliar tempos diferentes de isquemia para avaliar a real eficácia desta estratégia.

5.2 Mini Circuito da CEC

Um fator crucial desencadeador de resposta inflamatória durante e após a CEC fetal está relacionado ao material empregado no circuito da CEC, devido à exposição do sangue às condições e superfícies não fisiológicas. Estímulos coadjuvantes na disfunção placentária também incluem o volume e o tipo de perfusato, fluxo da CEC e resposta ao estresse cirúrgico. Circuitos

maiores, que contemplam também o uso de oxigenador, são menos fisiológicos e ativam diversas vias humorais plasmáticas.⁸⁹ Grandes volumes de perfusato causam hemodiluição fetal, sendo que a utilização de sangue adulto no perfusato também não seria ideal, por causa da diferença na afinidade de oxigênio entre a hemoglobina de adulto e fetal. Dependendo do peso fetal, mesmo uma pequena hemorragia durante a canulação pode resultar num hematócrito significativamente baixo, o que comprometeria muito a hemodiluição com a reposição volêmica. Levando em consideração estes aspectos, um circuito miniaturizado de CEC seria ideal para minimizar o tamanho da superfície extracorpórea, o volume de perfusato e evitar o estímulo de vias inflamatórias humorais. Levando-se em consideração estes aspectos, o grupo da Universidade de Stanford demonstrou pioneiramente a melhora da hemodinâmica placentária de ovinos após a CEC fetal com a utilização de mini-circuitos de CEC. O primeiro estudo foi realizado em 1996, utilizando a bomba Hemopump (Johnson & Johnson, Rancho Cordova, CA – EUA), cujo fluxo mínimo era demasiadamente elevado para utilização em fetos de baixo peso. Ademais, este tipo de bomba já não se encontra disponível no mercado.⁴⁸ Em estudo mais recente⁴⁹, o mesmo grupo utilizou uma mini-bomba centrífuga desenvolvida em 2004, na Universidade de Tóquio, Japão.⁹⁰ Este tipo de bomba proporcionou uma gama maior de fluxos durante a CEC fetal. Os autores propõem este modelo de CEC para fetos mais prematuros.

No presente estudo, a miniaturização do circuito da CEC por si não impediu a disfunção placentária. O circuito da CEC apresentou baixo volume de perfusato (em torno de 60 ml) e uma ampla faixa de fluxos facilmente ajustados no console do dispositivo. Um aspecto técnico importante deve ser

salientado: a canulação direta do átrio direito, diferentemente dos procedimentos descritos por Reddy et al.⁴⁸ e Sebastian et al.,⁴⁹ nos quais a canulação venosa do átrio direito foi realizada através da veia cava superior, com evidente restrição ao fluxo sanguíneo. A canulação venosa da CEC fetal de ambos os grupos de estudo aqui avaliados foi obtida diretamente no átrio direito, através da aurícula direita, com sutura em bolsa de polipropileno 6-0, aplicada à delicada parede atrial. Foram diversas tentativas durante os experimentos de estudo-piloto, sendo até mesmo motivo de insucesso cirúrgico, pela fragilidade da parede atrial fetal. Durante a CEC fetal, a cânula venosa permaneceu cuidadosamente imobilizada, para se evitar lesão da parede atrial direita. A utilização de cânula venosa 14Fr proporcionou maior fluxo sanguíneo durante a CEC. Apesar da boa drenagem do átrio direito fetal, o fluxo sanguíneo preferencial para o lado esquerdo do coração pelo forame oval pode ter sido um fator limitante para se obter fluxos maiores durante a CEC, conforme apontado pelo estudo em fetos caprinos de Liu et al.⁸⁰ Não obstante tenha sido obtido um fluxo maior da CEC no grupo de fetos pré-condicionados, não foi possível estabelecer o fluxo teórico ideal ($400 \text{ ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{Kg}^{-1}$). Quanto à bomba centrífuga utilizada neste protocolo, ela está disponível no mercado, o que a torna acessível para aplicação clínica em humanos. A placenta também foi utilizada como único oxigenador in-vivo, para simplificar o circuito da CEC fetal e minimizar a ativação de mediadores inflamatórios com a exposição adicional à superfície estranha de um oxigenador artificial.

5.3 Hemodinâmica Fetal

Foi observado um efeito taquicardizante no grupo de fetos submetidos ao PCIR, em relação aos demais grupos, evidenciando uma das respostas sistêmicas do PCIR. Estudos experimentais prévios demonstraram que, dentre os efeitos farmacológicos do PCIR, inclui-se a atividade adrenérgica, relacionada com a liberação de adenosina, bradicinina e norepinefrina.⁹¹ Estes fatores humorais podem explicar um dos prováveis mecanismos de taquicardia após os curtos períodos de isquemia no membro traseiro do feto. Outra hipótese a ser considerada seria que a taquicardia foi compensatória à hipovolemia relativa instalada após vasodilatação do território vascular sistêmico fetal por decréscimo dos valores séricos do tromboxane.

A maior estabilidade hemodinâmica observada nos fetos submetidos à CEC pode estar relacionada ao efeito protetor do PCIR no miocárdio. Um recente estudo proteômico identificou potenciais alvos cardioprotetores liberados no sangue após o PCIR em membros.⁹² Várias moléculas circulantes específicas também foram estudadas em detalhe. A liberação de óxido nítrico relacionada ao estresse de cisalhamento, secundário à hiperemia reativa induzida pela isquemia transitória do membro, aumenta o nitrito plasmático no sangue, conhecido agente cardioprotetor.⁹³

Embora ainda controversa, a influência do Óxido Nítrico no PCIR foi avaliada com a utilização de inibidores da enzima Óxido Nítrico Sintetase.^{94,95} O PCIR foi ineficaz em animais geneticamente modificados com deficiência da isoenzima óxido nítrico sintase endotelial.⁹⁶ O pré-tratamento com a sulfanilamida (antagonista de nitrito) anulou o efeito cardioprotetor plasmático

obtido após o PCIR em voluntários humanos, quando utilizado para perfundir corações isolados de ratos. Yellon & Downey demonstraram o importante papel do Óxido Nítrico como mediador desta proteção miocárdica.⁹⁷ Há evidências crescentes de que a disfunção endotelial e a redução da biodisponibilidade de Óxido Nítrico são componentes importantes da lesão de isquemia-reperfusão, possivelmente limitando a extensão da reperfusão após a isquemia e amplificando a lesão isquêmica. O Óxido Nítrico é normalmente produzido pelas células endoteliais através da conversão do aminoácido L-arginina em L-citrulina pela enzima Óxido Nítrico sintase. Embora tenha meia-vida muito curta, o Óxido Nítrico é continuamente sintetizado e rapidamente oxidado em nitrito, que rapidamente se converte em nitrato.⁹⁸ A isoenzima Óxido Nítrico sintase, encontrada no endotélio vascular, é responsável pela produção de Óxido Nítrico endógeno, que desempenha um papel importante na manutenção do fluxo sanguíneo capilar e na regulação da função celular. Apesar do Óxido Nítrico não ter sido avaliado neste protocolo, há evidências claras da sua ação no grupo submetido ao PCIR.

Além da maior estabilidade hemodinâmica, foi observado um fluxo maior durante a CEC fetal neste grupo. Como o fluxo sanguíneo da CEC neste tipo de circuito, que utiliza uma bomba centrífuga, está também relacionado à pós-carga, o maior fluxo atingido durante a CEC fetal do grupo submetido ao PCIR reflete um estado de menor resistência vascular periférica.

5.4 Metabolismo Fetal

Conforme já mencionado, a disfunção placentária após a CEC fetal continua a ser o calcanhar de Aquiles da cirurgia cardíaca fetal experimental.^{99,100,101} Apesar do grupo de fetos submetidos ao PCIR apresentar maior preservação da saturação de oxigênio arterial em relação ao grupo Controle Positivo, não houve grande impacto desta estratégia na preservação da função placentária. Provavelmente, a inflamação induzida pela CEC fetal e a resposta inadequada do feto ao estresse cirúrgico estão implicadas nesta fisiopatologia. Como o eixo adrenocortical fetal não é capaz de desencadear uma resposta adequada, a administração de corticoide nos fetos certamente iria mascarar os resultados almejados com a ação anti-inflamatória do PCIR, o que dificultaria muito a interpretação dos dados. Ademais, a suplementação de esteróides utilizada previamente por Sabik et al. demonstrou sucesso limitado.⁴⁴ Neste estudo, apesar da aplicação do PCIR, ambos os grupos de estudo evoluíram com uma piora progressiva dos níveis de Lactato e Bicarbonato de Sódio após o estabelecimento da CEC fetal. O Lactato liberado pelos tecidos é uma manifestação de má perfusão tecidual ou falha na captação do oxigênio sanguíneo, apesar do efeito vasodilatador do PCIR. O acúmulo de lactato progressivo observado neste estudo reflete um aumento do metabolismo anaeróbico e correlaciona-se bem com a diminuição da saturação de oxigênio ocorrida nos grupos de estudo em relação ao grupo Controle negativo. O aumento do Lactato tem implicações prognósticas importantes no pós-operatório da cirurgia cardíaca. Em neonatos, o aumento dos níveis séricos de Lactato é um preditor de óbito ou da necessidade de ECMO

(assistência circulatória mecânica) após a correção cirúrgica, o que corrobora a mortalidade elevada de 33,3% nos dois grupos de estudo. Um dos dois óbitos do grupo Controle Positivo foi mais precoce, cerca de 13 minutos após o encerramento da CEC, enquanto que os demais óbitos ocorreram com mais de uma hora pós-CEC. Apesar da estabilidade hemodinâmica e da gasometria materna durante todo o protocolo e, consequentemente, uma oferta normal de oxigênio materno ao feto e remoção adequada de metabolitos tóxicos do feto na unidade materno-placentária, a disfunção da unidade feto-placentária foi evidenciada pela grave deterioração metabólica e acidose mista desenvolvida em todos os fetos dos grupos de Estudo (Controle Positivo e PCIR), durante e após a CEC fetal.

5.5 Processo Inflamatório Fetal

Embora a fisiopatologia da disfunção placentária relacionada à CEC tenha sido bem caracterizada na literatura científica e que certas medidas terapêuticas tenham sido identificadas, o mecanismo fundamental ainda permanece desconhecido. Compreende-se atualmente que a disfunção da unidade feto-placentária observada após a CEC fetal seja em essência um fenômeno inflamatório sistêmico, em parte decorrente da reação mediada por citocinas, conforme aquela observada na CEC pós-natal. Formulamos a hipótese de que o PCIR fetal poderia mitigar a ativação da cascata inflamatória, com o objetivo de reduzir a disfunção da unidade feto-placentária. Para testar essa hipótese, aplicamos o PCIR em um grupo de fetos submetidos à CEC,

para determinar seu efeito nos marcadores pró-inflamatórios e sua relação com a hemodinâmica fetal e função placentária. Um dos parâmetros inflamatórios analisados foi a expressão do edema tecidual nos pulmões e na placenta. Como parte da evolução da inflamação após interação neutrófilo/célula endotelial, quando ocorre a transudação da luz vascular para o interstício, as células e vasos ainda íntegros são mais dispersados por unidade de área. Há um menor adensamento de núcleos e vasos intersticiais nos órgãos avaliados ou em qualquer outro tecido sujeito a mesma fisiopatologia. Assim, este método avalia indiretamente a magnitude do edema e da inflamação no tecido estudado. A demonstração indireta de maior edema placentário nos fetos do grupo da CEC simples, medida pela fração de área dos vasos intersticiais da placenta, pode estar relacionada à maior inflamação dos fetos deste grupo naquele órgão, apesar de não ter sido observada uma diferença significativa da fração de área dos núcleos celulares entre os grupos.

Na avaliação imuno-histoquímica do interstício placentário, o foco foi a expressão de moléculas de adesão (ICAM e VCAM) e dos receptores Toll-like (TLR). Estes agentes são geralmente expressos durante a fase inicial da interação neutrófilo/células endoteliais em modelos de inflamação relacionados à isquemia/reperfusão. Não foi possível apontar diferenças pró-inflamatórias entre os grupos de estudo, tanto em relação à expressão do receptor Toll-Like, quanto das moléculas de adesão vascular ou intercelular. Similarmente, o PCIR não promoveu diferenças destes agentes entre os grupos de estudo, quanto à avaliação do espaço perivascular.

Em relação aos marcadores inflamatórios séricos, as variáveis dependentes estudadas foram o Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α),

Interleucina 1(IL-1 β), Interleucina 6(IL-6) e Tromboxana, agentes pró-inflamatórios e Interleucina-10 (IL-10), uma citocina anti-inflamatória. O TNF- α é precursor da IL-1 β . Porém suas expressões séricas são subsequentes, com ínfima variação de tempo. Ambas são expressas muito precocemente após ativação dos neutrófilos, quer durante resposta inflamatória inata, quer no contexto da isquemia/reperfusão. O PCIR promoveu níveis séricos reduzidos de Tromboxana e de IL-1 β em relação aos demais grupos. Inferimos que este achado suporta o maior fluxo sanguíneo obtido na CEC fetal do grupo pré-condicionado, tendo como substrato comum o predomínio do Óxido Nítrico em relação às espécies reativas de oxigênio, com consequente bloqueio da inflamação⁶⁰. O bloqueio do processo inflamatório durante a interação neutrófilo-célula endotelial promove a diminuição da expressão das espécies reativas de oxigênio e maior liberação da enzima Óxido Nítrico Sintase, que catalisa a conversão da L-arginina em Óxido Nítrico. Mecanismo idêntico pode ser observado nas vias finais da cascata do ácido araquidônico. A maior disponibilidade do Óxido Nítrico, por sua vez, promove a síntese de prostaglandina E1 (vasodilatadora). Simultaneamente, o Óxido Nítrico inibe a síntese de Tromboxana pelas plaquetas. A vasodilatação por diminuição dos níveis de Tromboxana e elevação dos níveis de prostaglandina E1 suplantam a vasoconstrição relacionada aos valores elevados de prostaglandina E2 (vasoconstritora). Todo este contexto favorece um maior fluxo sanguíneo obtido durante a CEC dos fetos pré-condicionados. Não obstante, a possibilidade de minimizar a resposta inflamatória da CEC fetal com o pré-condicionamento isquêmico remoto não resultou em melhora da função placentária, apesar de reduzir a liberação destes agentes pró-inflamatórios. A interleucina-10, cuja

expressão fisiológica é mais tardia que interleucina-6, e o TNF- α não sofreram variações significativas decorrentes da aplicação do PCIR, embora tenha ocorrido uma clara tendência de elevação do Fator pró-inflamatório de Necrose Tumoral Alfa. Entretanto, a prostaglandina E-2, potente vasoconstrictor placentário, e a Interleucina IL-6 apresentaram uma elevação significativa nos fetos submetidos ao PCIR, após uma hora da CEC fetal. Estas alterações podem ter sobrepujado o efeito anti-inflamatório do PCIR, o que não impediu a disfunção placentária observada em ambos os grupos de estudo, pelo provável aumento da resistência vascular placentária e consequente diminuição do fluxo sanguíneo placentário.

Por outro lado, o metabolismo fetal está adaptado a uma tensão reduzida de oxigênio plasmático (saturação arterial fetal em torno de 70%), pois as trocas gasosas fetais são realizadas com o sangue venoso materno. Talvez o PCIR com quatro ciclos de isquemia de cinco minutos de duração não tenha sido suficiente para desencadear fatores humorais e neurogênicos protetores para suprimir a disfunção placentária. Estudos futuros com tempos maiores de isquemia da musculatura esquelética do membro fetal serão necessários para elucidar o papel específico do PCIR na resolução da disfunção placentária ou como um mitigador da lesão placentária.

5.6 Limitações do Estudo

Em primeiro lugar, inferências baseadas em resultados com animais não se traduzem necessariamente nas mesmas conclusões obtidas a partir de

estudos com seres humanos. No presente estudo, o PCIR foi seguido pela instalação da CEC e pelos 120 minutos de observação. Como a resposta precoce ao PCIR ocorre em até quatro horas após o estímulo isquêmico intermitente, os dados aqui apresentados não refletem, necessariamente, a máxima expressão da resposta precoce ao PCIR, especialmente no que diz respeito às citocinas analisadas, avaliadas cerca de três horas após a realização do PCIR nos fetos.

As ovelhas são frequentemente usadas como modelo experimental para estudos de cirurgia cardíaca fetal. De fato, a maioria dos estudos prévios utiliza fetos de ovelhas com idade gestacional em torno de 126 dias de gestação (termo: 148 dias). Este estudo foi realizado com fetos de aproximadamente 135 a 140 dias de gestação. No entanto, esta idade não está de acordo com a janela atualmente aceita para a terapia fetal efetiva no cenário clínico: de 21 a 30 semanas de gestação humana. Idealmente, futuros estudos da CEC fetal deverão ser contemplados em fetos mais prematuros (83-112 dias de gestação) para simular o tamanho e peso fetal de ovelhas com fetos humanos passíveis de intervenção cirúrgica pré-natal.

A presença de dois fetos na mesma ovelha, durante o experimento, poderia determinar um viés nos resultados pelas conexões inter-placentárias habitualmente vistas nos fetos ovinos. Idealmente, os resultados seriam mais fidedignos se procedessem de ovelhas com gestação única.

Outro aspecto relevante refere-se ao número limitado de animais em cada grupo e a investigação de múltiplas variáveis. Ambos os aspectos reduzem o poder deste estudo. No entanto, várias observações aqui obtidas

são consistentes e corroboram a hipótese de que o PCIR não oferece proteção contra a disfunção placentária induzida pela CEC fetal.

Em relação ao protocolo anestésico, a técnica anestésica utilizada durante a cirurgia também poderia influenciar a ação do PCIR. O PCIR induz ao efeito anti-inflamatório por mecanismos neuronais e humorais, existindo evidências científicas para ambos. A hipótese neuronal considera que substâncias produzidas no território remoto submetido a isquemia atuem localmente em vias neuronais aferentes. Estas ativam várias vias eferentes, induzindo ao efeito protetor. Estudos prévios tem salientado que um possível efeito mitigador do PCIR pelo propofol se deve ao mimetismo do PCIR pelo propofol. Kottenberg et al. compararam os efeitos do PCIR em pacientes submetidos à cirurgia de revascularização do miocárdio com CEC, anestesiados com isoflurane ou propofol.¹⁰² Ao contrário do agente anestésico volátil, a anestesia com propofol não demonstrou sinergismo com o PCIR. Apesar da indução anestésica dos animais objeto deste estudo ter incluído a administração de propofol no início do protocolo, este agente anestésico apresenta metabolismo rápido e curta duração na corrente sanguínea, o que provavelmente não afetaria a ação do PCIR nos fetos estudados.

5.7 Implicações Clínicas

A aplicação clínica da circulação extracorpórea fetal para tratar cardiopatias congênitas complexas de alta morbimortalidade pode se tornar realidade com o domínio de estratégias anestésicas e anti-inflamatórias que

mitiguem a disfunção placentária e a resposta do feto ao estresse cirúrgico. Muitos avanços sobre a cascata inflamatória na CEC fetal foram desvendados, mas muitas interações complexas nesse processo permanecem indefinidas. Os mecanismos dessa rede extremamente complicada implicam em tantas variáveis, incluindo ativação do complemento, liberação de endotoxinas, ativação de leucócitos, expressão de moléculas de adesão e liberação de muitas substâncias endógenas, incluindo radicais livres de oxigênio, metabólitos do ácido araquidônico, citocinas, fator de ativação plaquetária, Óxido Nítrico, endotelinas, dentre outros. Vale ressaltar que, deve-se sempre considerar as interações complexas entre esses agentes pró-inflamatórios. Portanto, há ainda muito o que esclarecer a respeito dos mecanismos que promovem a disfunção placentária durante e após a CEC fetal. Novos estudos em primatas não humanos e abordagens alternativas serão etapas necessárias para suprimir adequadamente a disfunção placentária e a resposta ao estresse fetal antes da aplicação clínica com sucesso da cirurgia cardíaca intra-uterina, especialmente em fetos com a forma mais grave da doença de Ebstein, associada à cardiomegalia importante e hipoplasia pulmonar.

5.8 Perspectivas de futuro

A aplicação do PCIR no membro traseiro de fetos ovinos foi demonstrada ser ineficiente durante a CEC. É essencial investigar outras modalidades de isquemia/reperfusão (duração, aplicação na mãe e feto) para avaliar melhor se essa estratégia tem a capacidade de melhorar os resultados

em fetos submetidos a CEC antes da translação para a prática clínica. A utilização do PCIR como modulador da inflamação deverá progredir para um novo modelo, preferencialmente em primatas não humanos, com gestação única para minimizar vieses de gestações múltiplas. O estímulo isquêmico desencadeador do PCIR pode ser mais prolongado e realizado tanto no organismo materno, quanto no fetal, com uma duração de observação pós estímulo de quatro horas, período em que se expressa plenamente o PCIR em sua resposta precoce.

Outro aspecto relevante para futuras pesquisas envolve um fator crucial que também desencadeia a resposta inflamatória à CEC. Trata-se da superfície estranha do circuito da CEC, devido à exposição do sangue a superfícies e condições não fisiológicas. Foi sugerido há mais de quatro décadas que a forração do circuito com heparina pode "melhorar a biocompatibilidade" da superfície estranha, devido aos efeitos de redução da ativação do complemento *in vitro*, da redução da adesão plaquetária, da inibição da ativação de granulócitos e da liberação de citocinas pró-inflamatórias. No entanto, ainda não está claro se esses efeitos podem levar a uma melhora da função placentária durante e após a CEC fetal. Algumas questões importantes ainda precisam ser respondidas. Embora tanto estudos experimentais¹⁰³ como clínicos¹⁰⁴ sugiram que os circuitos revestidos de heparina exerçam um efeito protetor sobre a função pulmonar, nenhum benefício significativo foi descrito na CEC fetal. Estudos experimentais serão fundamentais para se estabelecer a melhor estratégia da CEC fetal antes da translação para seres humanos.

Quanto à possibilidade de aplicação da robótica, o sucesso inicial observado em cirurgias cardíacas de adultos não foi realizado de forma ampla na cirurgia cardíaca pediátrica. Os principais obstáculos à aceitação generalizada de tal técnica incluem maior tempo de instalação e complexidade dos procedimentos, bem como o grande tamanho dos instrumentos em relação ao tamanho do paciente. Além disso, embora a principal vantagem dos sistemas robóticos seja a capacidade de minimizar o tamanho da incisão, a CEC ainda é necessária para a correção cirúrgica intra-cardíaca de determinadas cardiopatias congênitas complexas no feto. Intervenções fetais baseadas em cateteres, por outro lado, expandiram-se rapidamente, tanto na aplicação, quanto na complexidade dos procedimentos. No entanto, apesar do desenvolvimento de dispositivos sofisticados, os sistemas robóticos para auxiliar os procedimentos fetais não têm sido comumente aplicados. Atualmente, a aplicação da robótica em cirurgia cardíaca pediátrica se restringe à correção do canal arterial persistente e do anel vascular.^{105,106} Portanto, devido às dimensões dos instrumentos e à necessidade das portas de entrada relativamente distantes para evitar a interferência entre os braços robóticos, o uso deste sistema em fetos inviabilizaria sua aplicação na cirurgia cardíaca intra-uterina.

6-CONCLUSÕES

O pré-condicionamento isquêmico remoto fetal:

- 1- Preservou melhor a hemodinâmica fetal;
- 2- Promoveu maior fluxo sanguíneo durante a CEC fetal;
- 3- Não impediu a hipoperfusão tecidual fetal, evidenciada pelos níveis séricos elevados de Lactato e Bicarbonato de Sódio;
- 4- Não evitou a acidose mista desenvolvida nos fetos, durante e após a CEC fetal;
- 5- Limitou o edema pulmonar fetal e placentário;
- 6- Não modificou a expressão das moléculas de adesão nem do receptor *Toll-Like* nos tecidos pulmonar e placentário;
- 7- Promoveu a redução de alguns marcadores pró-inflamatórios (Tromboxana e Interleucina-1);
- 8- Não modificou os níveis séricos da Interleucina-10 e TNF- α ;
- 9- Não impediu a elevação dos níveis séricos de Interleucina-6 e Prostaglandina E2.

ANEXO A

MEDICINA
USP
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A CEUA da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 11/03/2015, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **180/14** intitulado: **“Avaliação do processo inflamatório induzido pela circulação extracorpórea em fetos de ovinos submetidos ao pré-condicionamento isquêmico”** que utilizará **30** animais da espécie **ovino**, apresentado pela Comissão Científica do INCOR e será utilizado para a defesa de tese do aluno **Marcelo Gentil Almeida Guedes**, tendo como orientador o Prof. Dr. Renato S. Assad.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a CEUA-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

Pesquisador (a) Responsável: Renato Samy Assad

CEUA-FMUSP, 11 de Março de 2015



Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Tabela 1- Valores do pH do sangue arterial e venoso dos fetos do grupo **Controle Negativo** distribuídos pelos momentos de coleta da amostra.

Animal	Acesso Fetal		Pré-CEC		15 min. CEC		30 min. CEC		60 min. CEC		120 min. CEC	
	Venoso	Arterial	Venoso	Arterial	Venoso	Arterial	Venoso	Arterial	Venoso	Arterial	Venoso	Arterial
20915	7,14	7,18	7,21	7,20	7,18	7,19	7,18	7,19	7,18	7,21	7,19	7,22
211015	7,19	7,21	7,12	7,15	7,12	7,15	7,12	7,15	7,11	7,14	7,12	7,14
60116	6,99	7,05	7,09	7,10	7,10	7,11	7,11	7,12	7,12	7,13	7,10	7,11
130116	7,17	7,23	7,18	7,22	7,17	7,21	7,16	7,21	7,18	7,21	7,16	7,20
200116	7,19	7,22	7,17	7,17	7,14	7,18	7,15	7,15	7,15	7,16	7,11	7,11
270116	7,22	7,22	7,16	7,22	7,17	7,23	7,19	7,25	7,20	7,25	7,18	7,23
MÉDIA	7,15	7,19	7,16	7,18	7,15	7,18	7,15	7,18	7,16	7,18	7,14	7,17
EP	0,03	0,03	0,02	0,02	0,01	0,02	0,01	0,02	0,01	0,02	0,02	0,02

pH: Potencial de hidrogênio; CEC: Circulação extracorpórea; EP: Erro Padrão

Tabela 2- Valores do pH do sangue arterial e venoso dos fetos do grupo **CEC** distribuídos pelos momentos de coleta da amostra.

Animal	Acesso Fetal		Pré-CEC		15 min. CEC		30 min. CEC		60 min. CEC		120 min. CEC	
	Venoso	Arterial	Venoso	Arterial	Venoso	Arterial	Venoso	Arterial	Venoso	Arterial	Venoso	Arterial
30216	7,24	7,22	7,22	7,25	7,18	7,19	7,15	7,18	7,15	7,17	7,15	7,17
40516	7,30	7,23	7,23	7,23	7,21	7,20	6,87	7,15	7,10	7,13	7,05	7,06
150616	7,08	7,10	7,04	7,12	7,03	7,05	6,97	6,98	6,93	6,96	6,87	6,88
220616	7,14	7,18	7,07	7,09	6,92	6,93	6,82	6,74	OF	OF	OF	OF
100816	7,17	7,18	7,11	7,09	7,02	7,09	6,98	7,01	6,92	6,97	6,91	6,81
231116	7,08	7,13	7,06	7,07	6,96	6,86	6,77	6,77	6,62	6,65	OF	OF
MÉDIA	7,17	7,17	7,12	7,14	7,05	7,05	6,93	6,97	6,94	6,98	7,00	6,98
EP	0,09	0,05	0,08	0,08	0,12	0,14	0,14	0,18	0,21	0,20	0,13	0,16

pH: Potencial de hidrogênio; CEC: Circulação extracorpórea; EP: Erro Padrão; OF: Óbito fetal

Tabela 3- Valores do pH do sangue arterial e venoso dos fetos do grupo **CEC + Pré-condicionamento isquêmico remoto** distribuídos pelos momentos de coleta da amostra.

Animal	Acesso Fetal		Pré-CEC		15 min. CEC		30 min. CEC		60 min. CEC		120 min. CEC	
	Venoso	Arterial	Venoso	Arterial	Venoso	Arterial	Venoso	Arterial	Venoso	Arterial	Venoso	Arterial
301116	7,33	7,16	7,18	7,13	7,01	7,06	6,96	6,94	6,95	6,96	6,87	6,89
310517	7,06	7,01	7,00	7,03	6,91	6,90	6,85	6,90	6,75	6,75	OF	OF
70617	7,14	7,13	7,03	7,06	7,01	7,01	6,96	6,98	6,97	6,96	6,93	6,88
210617	6,93	6,96	7,01	6,99	6,93	6,97	6,93	6,98	6,87	6,90	6,91	6,92
280617	7,22	7,17	7,14	7,09	7,00	6,97	6,87	6,91	6,63	6,66	OF	OF
50717	7,17	7,17	7,14	7,15	7,10	7,14	7,11	7,12	7,12	7,09	7,08	7,08
MÉDIA	7,14	7,10	7,08	7,07	6,99	7,01	6,95	6,97	6,88	6,89	6,95	6,94
EP	0,06	0,04	0,02	0,02	0,03	0,02	0,02	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03

pH: Potencial de hidrogênio; CEC: Circulação extracorpórea; EP: Erro Padrão;
OF: Óbito fetal; PCIR: Pré-condicionamento isquêmico remoto

Tabela 4- Valores da pressão parcial de oxigênio (pO_2) no sangue arterial e venoso dos fetos do grupo **Controle Negativo** distribuídos pelos momentos de coleta da amostra.

Animal	Acesso Fetal		Pré-CEC		15 min. CEC		30 min. CEC		60 min. CEC		120 min. CEC	
	Venosa	Arterial	Venosa	Arterial	Venosa	Arterial	Venosa	Arterial	Venosa	Arterial	Venosa	Arterial
20915	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
211015	17,5	24,9	15,3	23,4	13,7	22,5	14,5	21	11,5	19,9	11,6	22,8
60116	23,1	24,8	31,6	34,4	31,6	32,8	30,8	36,4	30,4	33,4	28,6	29,3
130116	18,1	28,3	21,9	29	20,6	25,8	17,8	23,3	16,7	22,4	13,7	19,7
200116	18,6	23,3	17,6	21,7	18,2	22,5	16	19,6	15,3	18,8	15,6	19
270116	13,8	18,4	15,1	32	16,3	25,2	15,7	26	16	24	13,8	22,4
MÉDIA	18,22	23,94	20,30	28,10	20,08	25,76	18,96	25,26	17,98	23,70	16,66	22,64
EP	1,35	1,47	2,81	2,22	2,82	1,72	2,74	2,73	2,95	2,37	2,79	1,66

CEC: Circulação extracorpórea; NO: Não obtido; EP: Erro Padrão

Tabela 5- Valores da pressão parcial de oxigênio (pO_2) no sangue arterial e venoso dos fetos do grupo **CEC** distribuídos pelos momentos de coleta da amostra.

Animal	Acesso Fetal		Pré-CEC		15 min. CEC		30 min. CEC		60 min. CEC		120 min. CEC	
	Venosa	Arterial	Venosa	Arterial	Venosa	Arterial	Venosa	Arterial	Venosa	Arterial	Venosa	Arterial
30216	28,6	30,2	15,3	23,3	10,7	16,7	11,3	19,1	9,5	18,2	10,1	17,9
40516	22,3	30,0	19,5	30,6	15,1	23,7	26,2	22,7	17,4	19,9	12,8	14,3
150616	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
220616	NO	NO	NO	NO	NO	NO	OF	OF	OF	OF	OF	OF
100816	19,1	25,9	17,7	23,0	14,8	18,6	14,8	17,1	14,4	17,2	20,1	16,4
231116	27,3	26,8	12,9	16,0	13,9	13,4	10,2	13,0	6,6	14,4	OF	OF
MÉDIA	24,33	28,23	16,35	23,23	13,63	18,10	15,63	17,98	11,98	17,43	14,33	16,20
EP	2,21	1,10	1,44	2,98	1,01	2,15	3,66	2,02	2,42	1,15	2,99	1,04

CEC: Circulação extracorpórea; NO: Não obtido; OF: Óbito fetal; EP: Erro Padrão

Tabela 6- Valores da pressão parcial de oxigênio (pO_2) no sangue arterial e venoso dos fetos do grupo **CEC + Pré-condicionamento isquêmico remoto** distribuídos pelos momentos de coleta da amostra.

Animal	Acesso Fetal		Pré-CEC		15 min. CEC		30 min. CEC		60 min. CEC		120 min. CEC	
	Venosa	Arterial	Venosa	Arterial	Venosa	Arterial	Venosa	Arterial	Venosa	Arterial	Venosa	Arterial
301116	16,3	14,6	16,4	14,5	9,8	14,4	13,5	16,1	11,1	16,3	11,9	14,4
310517	22,9	28,5	18,6	22	12	16	13,9	20,7	10,4	17	OF	OF
70617	21,1	26	19,2	22,4	17,8	20,4	20	23,3	18,2	21,8	17	18,5
210617	11,9	28	12,6	19,1	6,8	13,4	8,5	15,5	9,3	14,5	12,5	20,8
280617	17,5	25,1	19,1	27,7	12,4	13,5	13,3	15,3	8,2	15,9	OF	OF
50717	22,8	28,4	22,3	27,4	20,9	25,5	22,9	27	22,1	25,8	17,3	19,2
MÉDIA	18,75	25,10	18,03	22,18	13,28	17,20	15,35	19,65	13,22	18,55	14,68	18,23
EP	1,94	2,38	1,46	2,25	2,32	2,16	2,33	2,17	2,50	1,94	1,28	1,22

PCIR: Pré-condicionamento isquêmico remoto;

CEC: Circulação extracorpórea; OF: Óbito fetal; EP: Erro Padrão

Tabela 7- Valores da pressão parcial de dióxido de carbono (**pCO₂**) no sangue arterial e venoso dos fetos do grupo **Controle Negativo** distribuídos pelos momentos de coleta da amostra.

Animal	Acesso Fetal		Pré-CEC		15 min. CEC		30 min. CEC		60 min. CEC		120 min. CEC	
	Venosa	Arterial	Venosa	Arterial	Venosa	Arterial	Venosa	Arterial	Venosa	Arterial	Venosa	Arterial
20915	60,1	53,5	51,4	55,9	60,8	58,1	63,5	55,8	64,7	57,6	62,1	54,1
211015	59,8	49,4	61,2	63,2	66,6	63,2	71,2	60,1	66,7	63,4	68,1	58,4
60116	77,6	76,4	82,6	79,2	82,9	78,4	83,8	76,4	78,2	75,4	81,9	89
130116	72,7	65,2	67,5	63,7	67,9	70	77,2	69,4	61,7	70	78,7	74
200116	66,2	67,1	63	79,2	72,8	72,2	75,4	79,1	73,9	72,8	77,6	86,1
270116	55,8	67,1	81,5	20	75,4	65,7	77,6	64,2	77,6	66,4	82,3	71,6
MÉDIA	65,37	63,12	67,87	60,20	71,07	67,93	74,78	67,50	70,47	67,60	75,12	72,20
EP	3,44	4,05	4,97	8,90	3,15	2,92	2,80	3,74	2,87	2,66	3,34	5,77

CEC: Circulação extracorpórea; EP: Erro Padrão

Tabela 8- Valores da pressão parcial de dióxido de carbono (**pCO₂**) no sangue arterial e venoso dos fetos do grupo **CEC** distribuídos pelos momentos de coleta da amostra.

Animal	Acesso Fetal		Pré-CEC		15 min. CEC		30 min. CEC		60 min. CEC		120 min. CEC	
	Venosa	Arterial	Venosa	Arterial	Venosa	Arterial	Venosa	Arterial	Venosa	Arterial	Venosa	Arterial
30216	40,6	54,8	63,5	60,9	59,7	66,6	72,2	65,2	71,7	64,9	68,4	72,7
40516	50,7	51,3	43,6	50,8	41,8	52,4	62,3	54,4	71	62,7	79,4	73,5
150616	68,1	61,2	71,4	58,5	48	67,9	76,7	75,6	85,2	77,1	95,5	89,7
220616	55	49,3	62,5	54,3	71	70,4	78	92,5	OF	OF	OF	OF
100816	54,3	46,3	50	54,1	60,5	56,3	75	68,8	60	67,7	67,8	74,4
231116	45,7	50,7	58,3	57,9	71	75,1	90,9	88,6	118	99,2	OF	OF
MÉDIA	52,40	52,27	58,22	56,08	58,67	64,78	75,85	74,18	81,18	74,32	77,78	77,58
EP	3,85	2,11	4,09	1,50	4,85	3,54	3,78	5,91	10,03	6,69	6,48	4,06

CEC: Circulação extracorpórea; OF: Óbito fetal; EP: Erro Padrão

Tabela 9- Valores da pressão parcial de dióxido de carbono (pCO_2) no sangue arterial e venoso dos fetos do grupo **CEC + Pré-condicionamento isquêmico remoto** distribuídos pelos momentos de coleta da amostra.

Animal	Acesso Fetal		Pré-CEC		15 min. CEC		30 min. CEC		60 min. CEC		120 min. CEC	
	Venosa	Arterial	Venosa	Arterial	Venosa	Arterial	Venosa	Arterial	Venosa	Arterial	Venosa	Arterial
301116	27,7	47,9	39,3	55,1	67,5	59,4	67	67,4	70,7	66,5	86,5	78,3
310517	46,8	62,1	70,7	66,8	82	82,1	88,4	58,7	108	98,8	OF	OF
70617	42,5	39	59,5	50,8	59,3	62,4	60,8	59,4	64,9	61,2	77,9	78,2
210617	72,2	52,8	58,8	55,7	70	59,6	71	60,4	82,2	73,5	75,1	62,4
280617	38,7	37,9	44,3	42,1	54	55,7	76	66,4	122	103	OF	OF
50717	44,3	39,8	49,3	47,6	52,9	47,5	50,1	44,9	50,2	49,7	60	56
MÉDIA	45,37	46,58	53,65	53,02	64,28	61,12	68,88	59,53	83,00	75,45	74,88	68,73
EP	6,02	3,92	4,70	3,44	4,54	4,70	5,35	3,29	11,11	8,67	4,51	4,62

CEC: Circulação extracorpórea; OF: Óbito fetal; EP: Erro Padrão

Tabela 10- Valores da **saturação de oxigênio** no sangue arterial e venoso dos fetos do grupo **Controle Negativo** distribuídos pelos momentos de coleta da amostra.

Animal	Acesso Fetal		Pré-CEC		15 min. CEC		30 min. CEC		60 min. CEC		120 min. CEC	
	Venosa	Arterial	Venosa	Arterial	Venosa	Arterial	Venosa	Arterial	Venosa	Arterial	Venosa	Arterial
20915	48,7	66,5	70,2	77,5	61,8	76	63,5	78	62,2	78,4	57,2	83
211015	38,6	66,5	32,3	59,4	25,3	57,6	25	50,1	18,2	48,7	17,8	55
60116	31,8	37,2	62,9	69,1	64,1	72,6	60,9	70,1	59,3	66,6	52,1	55,4
130116	45,8	77	62,3	80,7	57,9	73,2	44,8	67,2	43,7	63,9	29,6	54,3
200116	52,1	70,2	51,5	61,8	47,3	66,1	39,5	51,1	38,4	52,4	33,5	45,7
270116	34,7	52,3	35,8	NO	42,3	73,4	38,9	75	39,5	72,5	29,2	66,5
MÉDIA	41,95	61,62	52,50	69,70	49,78	69,82	45,43	65,25	43,55	63,75	36,57	59,98
EP	3,32	5,89	6,34	3,82	5,99	2,79	5,95	4,88	6,54	4,67	6,14	5,34

CEC: Circulação extracorpórea; NO: Não obtido; EP: Erro Padrão

Tabela 11- Valores da **saturação de oxigênio** no sangue arterial e venoso dos fetos do grupo **CEC** distribuídos pelos momentos de coleta da amostra.

Animal	Acesso Fetal		Pré-CEC		15 min. CEC		30 min. CEC		60 min. CEC		120 min. CEC	
	Venosa	Arterial	Venosa	Arterial	Venosa	Arterial	Venosa	Arterial	Venosa	Arterial	Venosa	Arterial
30216	62,7	69,5	31,3	54,3	17	33,3	17,5	40,7	13,3	38,4	16	37,9
40516	69	79,3	65	88,3	51,2	73,6	61,6	68,7	46,9	59,5	25,5	34
150616	11	22,7	16,2	46,3	12,1	17,8	10,8	24	8,3	29,2	6,7	18,6
220616	33,2	47,6	21,1	32,2	18,3	29,7	14,7	16,3	OF	OF	OF	OF
100816	61,6	83	54,2	74,7	38,1	52,7	30,9	43,3	29,2	37,9	27,7	45
231116	80,2	84,3	33,5	44,3	23,5	26,2	8,7	16,4	13,1	24	OF	OF
MÉDIA	52,95	64,40	36,88	56,68	26,70	38,88	24,03	34,90	22,16	37,80	18,98	33,88
EP	10,52	10,02	7,77	8,54	6,11	8,40	8,16	8,27	7,12	6,06	4,82	5,58

CEC: Circulação extracorpórea; OF: Óbito fetal; EP: Erro Padrão

Tabela 12- Valores da **saturação de oxigênio** no sangue arterial e venoso dos fetos do grupo **CEC + Pré-condicionamento isquêmico** distribuídos pelos momentos de coleta da amostra.

Animal	Acesso Fetal		Pré-CEC		15 min. CEC		30 min. CEC		60 min. CEC		120 min. CEC	
	Venosa	Arterial	Venosa	Arterial	Venosa	Arterial	Venosa	Arterial	Venosa	Arterial	Venosa	Arterial
301116	45,5	66,1	44,2	61,5	13,3	35,2	26,6	35,7	15,9	34,5	17,1	26,3
310517	73,2	81,4	53,4	65,4	27,3	39,5	29,9	55,7	21,9	36,6	OF	OF
70617	67,2	79,8	53,8	66	47,5	56,5	51,7	64,6	46	58	32,3	39,2
210617	19,9	71,8	25,5	51,6	11,5	27,7	16,3	32,7	14,2	30,8	23,8	51,8
280617	73,2	87,2	72	86,3	35,6	40,4	31	39,1	15,7	31,2	OF	OF
50717	70,8	78,5	63,1	79,3	59,7	75,3	66,8	77,5	66,1	75,6	41,3	51
MÉDIA	58,30	77,47	52,00	68,35	32,48	45,77	37,05	50,88	29,97	44,45	28,63	42,08
EP	8,79	3,04	6,56	5,11	7,77	7,06	7,59	7,35	8,71	7,48	4,28	4,90

CEC: Circulação extracorpórea; OF: Óbito fetal; EP: Erro Padrão

Tabela 13 - Valores do **Bicarbonato de Sódio** no sangue arterial e venoso dos fetos do grupo **Controle Negativo** distribuídos pelos momentos de coleta da amostra.

Animal	Acesso Fetal		Pré-CEC		15 min. CEC		30 min. CEC		60 min. CEC		120 min. CEC	
	Venosa	Arterial	Venosa	Arterial	Venosa	Arterial	Venosa	Arterial	Venosa	Arterial	Venosa	Arterial
20915	15,9	16,9	17,6	17,9	17,8	18,1	18,8	17,9	18,8	19	18,3	18,6
211015	18,2	17,2	15,1	17,1	15,8	17,2	16,5	16,4	15,7	16,8	16	16
60116	12,3	14,6	17,5	17,6	18,2	18,3	18,9	18,7	18,7	18,9	18,7	20
130116	19,9	22,2	19,7	21,4	19,1	21,8	20,2	21,5	18,2	21,9	19,9	21,8
200116	20	21,6	18,1	21,1	18,3	20,4	19,1	19,8	19	19,3	17,5	18,7
270116	19	21,9	21,5	NO	20,8	22,7	22,5	23,4	23,1	24,3	22,8	24,1
MÉDIA	17,55	19,07	18,25	19,02	18,33	19,75	19,33	19,62	18,92	20,03	18,87	19,87
EP	1,22	1,32	0,89	0,84	0,67	0,91	0,80	1,03	0,97	1,08	0,95	1,15

CEC: Circulação extracorpórea; NO: Não obtido; EP: Erro Padrão

Tabela 14- Valores do **Bicarbonato de Sódio** no sangue arterial e venoso dos fetos do grupo **CEC** distribuídos pelos momentos de coleta da amostra.

Animal	Acesso Fetal		Pré-CEC		15 min. CEC		30 min. CEC		60 min. CEC		120 min. CEC	
	Venosa	Arterial	Venosa	Arterial	Venosa	Arterial	Venosa	Arterial	Venosa	Arterial	Venosa	Arterial
30216	16,4	19	20,4	21,5	18,1	20	18,5	19,1	18,1	18,4	17,5	19,9
40516	18,4	18,8	16,7	18,8	15	17,3	8	15,5	15,8	15,9	14,1	14,2
150616	13,7	13,3	12,5	14,4	10,2	12,7	10,6	11,2	9,8	10,6	8,6	8,8
220616	15,1	15,6	13,2	13,1	10,4	10,5	8,5	7,5	OF	OF	OF	OF
100816	16,1	15,3	13,1	13,1	11,6	13,5	11,4	11,9	8,6	10,7	9,1	7,3
231116	12,4	14,2	12,4	12,7	11,1	9,1	7,3	7,2	5,3	5,3	OF	OF
MÉDIA	15,35	16,58	14,72	15,60	12,73	13,85	10,72	12,07	11,52	12,18	12,33	12,55
EP	0,87	0,89	1,31	1,50	1,29	1,68	1,68	1,88	2,16	2,09	1,74	2,34

CEC: Circulação extracorpórea; OF: Óbito fetal; EP: Erro Padrão

Tabela 15 - Valores do **Bicarbonato de Sódio** no sangue arterial e venoso dos fetos do grupo **CEC + Pré-condicionamento isquêmico** distribuídos pelos momentos de coleta da amostra.

Animal	Acesso Fetal		Pré-CEC		15 min. CEC		30 min. CEC		60 min. CEC		120 min. CEC	
	Venosa	Arterial	Venosa	Arterial	Venosa	Arterial	Venosa	Arterial	Venosa	Arterial	Venosa	Arterial
301116	16,1	14	13,5	13,6	11,3	12,5	9,8	9,2	9,6	9,7	8,3	8,4
310517	11,8	12,3	12,7	13,5	11,7	11,4	10,2	9,3	8,8	8,3	OF	OF
70617	13,1	12,4	11,8	11,7	11,2	11,5	9,8	10,4	10,5	9,8	10,4	8,9
210617	9,4	9,1	10,8	10,1	9,2	9,8	9,8	10,2	8,7	9	9,6	9,1
280617	15	13,6	13,6	11,6	10,3	9,9	8,8	9,2	6,1	6,2	OF	OF
50717	14,5	13,7	14,2	14,5	13,6	14,2	13,4	13,1	13,7	12,8	13,7	13,3
MÉDIA	13,32	12,52	12,77	12,50	11,22	11,55	10,30	10,23	9,57	9,30	10,50	9,93
EP	0,99	0,74	0,52	0,67	0,60	0,68	0,65	0,61	1,02	0,88	0,94	0,93

CEC: Circulação extracorpórea; OF: Óbito fetal; EP: Erro Padrão

Tabela 16 - Valores do **Lactato** no sangue arterial e venoso dos fetos do grupo **Controle Negativo** distribuídos pelos momentos de coleta da amostra.

Animal	Acesso Fetal		Pré-CEC		15 min. CEC		30 min. CEC		60 min. CEC		120 min. CEC	
	Venosa	Arterial	Venosa	Arterial	Venosa	Arterial	Venosa	Arterial	Venosa	Arterial	Venosa	Arterial
20915	2,6	2,3	2,1	2,3	2,3	2,2	1,9	1,7	2	1,7	2,4	2,1
211015	1,5	1,4	2,1	2,5	2,3	2,6	2,5	2,5	2,3	2,5	2,4	2,4
60116	6,9	7	6,1	6	5,5	5,7	5	4,8	4,1	3,9	3,2	3,4
130116	3,3	2,7	3,3	2,9	3,5	3,4	3,6	3,6	2,9	3,3	3,5	3,4
200116	1,6	1,7	1,8	2,2	2	2,1	2,2	2,3	2,4	2,3	2,8	3,5
270116	1,9	1,7	3,3	NO	2,9	2,3	2,4	2,1	2,3	1,9	2,5	2,2
MÉDIA	2,97	2,80	3,12	3,18	3,08	3,05	2,93	2,83	2,67	2,60	2,80	2,83
EP	0,83	0,86	0,65	0,72	0,53	0,56	0,48	0,47	0,31	0,35	0,19	0,27

CEC: Circulação extracorpórea; NO: Não obtido; EP: Erro Padrão

Tabela 17- Valores do **Lactato** no sangue arterial e venoso dos fetos do grupo **CEC** distribuídos pelos momentos de coleta da amostra.

Animal	Acesso Fetal		Pré-CEC		15 min. CEC		30 min. CEC		60 min. CEC		120 min. CEC	
	Venosa	Arterial	Venosa	Arterial	Venosa	Arterial	Venosa	Arterial	Venosa	Arterial	Venosa	Arterial
30216	3,7	4,6	3,3	3,4	2,7	3,3	3,7	3,8	3,9	4,1	3,9	4,7
40516	1,7	1,7	1,8	1,8	2,8	2,1	2,7	3,2	3,6	3,4	4,6	4,3
150616	8,2	8,2	9,4	9,3	6,6	9,1	9,3	9,6	9,3	9,6	10,6	10,8
220616	3,5	3,2	5,4	4,9	7	7,3	7,9	8,3	OF	OF	OF	OF
100816	2	1,8	2,3	2,9	3,3	3	4,3	4,4	3,8	4,9	7,8	7,5
231116	0,5	1,2	3,5	3,3	5,1	5,3	9	8,6	11,5	11,5	OF	OF
MÉDIA	3,27	3,45	4,28	4,27	4,58	5,02	6,15	6,32	6,42	6,70	6,73	6,83
EP	1,10	1,08	1,14	1,09	0,79	1,12	1,19	1,15	1,52	1,48	1,26	1,23

CEC: Circulação extracorpórea; OF: Óbito fetal; EP: Erro Padrão

Tabela 18- Valores do **Lactato** no sangue arterial e venoso dos fetos do grupo **CEC + Pré-condicionamento isquêmico** distribuídos pelos momentos de coleta da amostra.

Animal	Acesso Fetal		Pré-CEC		15 min. CEC		30 min. CEC		60 min. CEC		120 min. CEC	
	Venosa	Arterial	Venosa	Arterial	Venosa	Arterial	Venosa	Arterial	Venosa	Arterial	Venosa	Arterial
301116	2,6	2,3	3	2,6	3,6	3,2	4,9	4,8	4,8	4,9	6,6	6,5
310517	1,8	2,3	3,7	3,9	4,8	5,1	6,4	5,1	7,9	7,6	OF	OF
70617	1,7	1,7	3	2,6	2,9	3,1	3,3	3,4	3,5	3,2	4,8	5
210617	7,8	8,6	7,1	7,4	7,8	6,6	7,8	7,4	9,2	9,2	9,7	9,5
280617	2,5	2,7	3,6	3,6	5	5	10,6	9,3	14,3	13,4	OF	OF
50717	2,2	1,9	2,8	3	4,4	4,1	4,6	4,7	4,4	4,7	4,8	4,8
MÉDIA	3,10	3,25	3,87	3,85	4,75	4,52	6,27	5,78	7,35	7,17	6,48	6,45
EP	0,95	1,08	0,66	0,74	0,69	0,54	1,07	0,88	1,65	1,53	0,94	0,89

CEC: Circulação extracorpórea; OF: Óbito fetal; EP: Erro Padrão

Tabela 19 - Valores da **frequência cardíaca** dos fetos do grupo **Controle Negativo** distribuídos por momentos da aferição.

Animal	Acesso Fetal	Pré-CEC	CEC (min.)				Pós-CEC (min.)		
			5	10	20	30	60	90	120
20915	120	120	120	120	120	120	120	120	120
211015	120	128	130	127	131	136	145	138	140
60116	100	140	125	124	130	125	120	112	112
130116	110	100	108	104	100	104	98	104	112
200116	104	160	140	136	110	100	100	100	104
270116	130	120	112	140	160	132	128	110	106
MÉDIA	114,00	128,00	122,50	125,17	125,17	119,50	118,50	114,00	115,67
EP	4,62	8,33	4,81	5,22	8,49	6,00	7,21	5,56	5,38

CEC: Circulação extracorpórea; EP: Erro Padrão

Tabela 20- Valores da **frequência cardíaca** dos fetos do grupo **CEC** distribuídos por momentos da aferição.

Animal	Acesso Fetal	Pré-CEC	CEC (min.)			Pós-CEC (min.)			
			5	10	20	30	60	90	120
30216	126	128	120	120	140	128	120	120	120
40516	110	96	60	68	112	108	112	108	108
150616	120	120	140	140	140	124	120	120	120
220616	100	132	90	112	140	OF	OF	OF	OF
100816	90	85	120	120	110	130	130	120	120
231116	90	120	120	120	80	120	90	OF	OF
MÉDIA	106,00	113,50	108,33	113,33	120,33	122,00	114,40	117,00	117,00
EP	6,22	7,65	11,67	9,83	9,94	3,90	6,73	3,00	3,00

CEC: Circulação extracorpórea; OF: Óbito fetal; EP: Erro Padrão

Tabela 21- Valores da **frequência cardíaca** dos fetos do grupo **CEC + Pré-condicionamento isquêmico** distribuídos por momentos da aferição

Animal	Acesso Fetal	Pré-CEC	CEC (min.)			Pós-CEC (min.)			
			5	10	20	30	60	90	120
301116	120	140	100	140	120	120	120	120	140
310517	140	138	90	126	132	120	70	OF	OF
70617	90	112	128	144	136	132	152	160	160
210617	138	140	140	136	140	144	160	136	120
280617	132	170	80	NO	140	180	90	OF	OF
50717	180	160	160	168	168	168	160	160	140
MÉDIA	133,33	143,33	116,33	142,80	139,33	144,00	125,33	144,00	140,00
EP	11,97	8,21	12,76	6,37	6,48	10,28	15,76	8,00	6,67

CEC: Circulação extracorpórea; NO: Não obtido; OF: Óbito fetal; EP: Erro Padrão

Tabela 22- Valores da **pressão arterial média** dos fetos do grupo **Controle Negativo** distribuídos por momentos da aferição.

Animal	Acesso Fetal	Pré-CEC	CEC (min.)			Pós-CEC (min.)			
			5	10	20	30	60	90	120
20915	61	54	53	52	51	50	53	54	53
211015	55	44	46	47	48	46	45	48	50
60116	49	56	47	48	47	44	44	45	43
130116	61	66	63	60	59	67	52	57	54
200116	33	35	33	30	28	27	23	24	24
270116	60	60	56	60	58	56	58	55	54
MÉDIA	53,17	52,50	49,67	49,50	48,50	48,33	45,83	47,17	46,33
EP	4,46	4,59	4,19	4,53	4,58	5,44	5,04	4,99	4,78

CEC: Circulação extracorpórea; EP: Erro Padrão

Tabela 23 - Valores da **pressão arterial média** dos fetos do grupo **CEC** distribuídos por momentos da aferição.

Animal	Acesso Fetal	Pré-CEC	CEC (min.)				Pós-CEC (min.)		
			5	10	20	30	60	90	120
30216	58	36	29	29	34	34	39	37	30
40516	57	52	45	46	49	49	48	43	45
150616	72	43	41	31	36	37	34	41	35
220616	69	46	33	38	36	NO	OF	OF	OF
100816	61	42	48	38	38	40	37	29	28
231116	56	49	49	73	28	36	24	OF	OF
MÉDIA	62,17	44,67	40,83	42,50	36,83	39,20	36,40	37,50	34,50
EP	2,75	2,30	3,35	6,58	2,81	2,63	3,88	3,10	3,80

CEC: Circulação extracorpórea; NO: Não obtido; OF: Óbito fetal; EP: Erro Padrão

Tabela 24 - Valores da **pressão arterial média** dos fetos do grupo **CEC + Pré-condicionamento isquêmico** distribuídos por momentos da aferição.

Animal	Acesso Fetal	Pré-CEC	CEC (min.)				Pós-CEC (min.)		
			5	10	20	30	60	90	120
301116	54	68	38	43	50	56	57	46	49
310517	55	48	42	36	33	32	30	OF	OF
70617	54	45	40	40	40	44	40	35	39
210617	51	61	53	50	45	54	47	50	50
280617	47	45	38	37	40	33	22	OF	OF
50717	61	51	46	51	45	46	46	42	42
MÉDIA	53,67	53,00	42,83	42,83	42,17	44,17	40,33	43,25	45,00
EP	1,89	3,86	2,37	2,63	2,39	4,13	5,16	2,61	2,19

CEC: Circulação extracorpórea; NO: Não obtido; OF: Óbito fetal; EP: Erro Padrão

Tabela 25 - Valores do **fluxo sanguíneo da CEC** do Grupo **CEC (Controle)** distribuídos por momentos da da aferição.

Animal	CEC (ml /min/kg peso fetal)					
	5	10	15	20	25	30
30216	80	67	63	78	61	55
40516	138	128	121	110	128	103
150616	150	120	79	68	90	64
220616	129	117	86	92	98	77
100816	122	115	NO	80	NO	107
231116	202	190	NO	250	NO	226
MÉDIA	136,98	122,83	87,20	113,03	94,29	105,32
EP	16,34	16,13	12,18	28,04	13,73	25,63

CEC: Circulação extracorpórea; NO: Não obtido; EP: Erro Padrão

Tabela 26 - Valores do **fluxo sanguíneo da CEC** do grupo **CEC + Pré-condicionamento isquêmico** distribuídos por momentos da aferição.

Animal	CEC (ml /min/kg peso fetal)					
	5	10	15	20	25	30
301116	238,89	233,33	236,11	277,78	246,53	250,00
310517	122,98	126,49	122,98	98,38	105,41	105,41
70617	105,11	117,12	126,13	96,10	129,13	156,16
210617	132,60	160,22	165,75	140,88	176,80	157,46
280617	283,51	273,20	350,52	335,05	381,44	376,29
50717	137,44	154,03	146,92	125,59	94,79	94,79
MÉDIA	170,09	177,40	191,40	178,96	189,02	190,02
EP	29,73	25,41	36,01	41,55	44,70	43,49

CEC: Circulação extracorpórea; EP: Erro Padrão

Tabela 27- Valores do percentual de **espessura da camada muscular das arteríolas brônquicas** no grupo **Controle Negativo**.

Animal	Basal (%)
20915	36,56
211015	29,33
60116	33,92
130116	33,11
200116	34,62
270116	30,96
MÉDIA	33,08
EP	1,06

Valores: Percentual; EP: Erro Padrão

Tabela 28- Valores do percentual de **espessura da camada muscular das arteríolas brônquicas** no grupo **CEC**.

Animal	Basal (%)
30216	33,29
40516	38,69
150616	38,33
220616	40,68
100816	43,48
231116	42,53
MÉDIA	39,50
EP	1,49

Valores: Percentual; EP: Erro Padrão

Tabela 29- Valores do percentual de **espessura da camada muscular das arteríolas brônquicas** no grupo **CEC + PCIR**.

Animal	Basal (%)
301116	38,71
310517	31,34
70617	32,36
210617	35,30
280617	38,28
50717	35,63
MÉDIA	35,27
EP	1,22

Valores: Percentual; EP: Erro Padrão

Tabela 30- Valores percentuais da **fração de área do septo interlobular dos pulmões** dos animais do grupo **Controle** e dos animais submetidos à circulação extracorpórea (**CEC**), com e sem pré-condicionamento isquêmico remoto (**PCIR**)

Animal	Controle	Animal	CEC	Animal	CEC + PCIR
20915	5,36	30216	11,13	301116	7,14
211015	8,63	40516	3,99	310517	24,17
60116	17,32	150616	25,83	70617	17,14
130116	2,32	220616	15,30	210617	17,14
200116	12,62	100816	6,90	280617	7,44
270116	19,88	231116	3,33	50717	16,37
MÉDIA	11,02	MÉDIA	11,08	MÉDIA	14,90
EP	2,79	EP	3,48	EP	2,67

Valores: Percentual; CEC: Circulação extracorpórea;
PCIR: Pré-condicionamento isquêmico remoto; EP: Erro Padrão

Tabela 31- Valores percentuais basais da **fração de área dos núcleos celulares da placenta** dos animais do grupo **Controle** e dos animais submetidos à circulação extracorpórea (**CEC**), com e sem pré-condicionamento isquêmico remoto (**PCIR**)

Animal	Controle	Animal	CEC	Animal	CEC + PCIR
20915	0,30	30216	0,37	301116	0,22
211015	0,33	40516	0,25	310517	0,22
60116	0,17	150616	0,22	70617	0,28
130116	0,21	220616	0,15	210617	0,26
200116	0,33	100816	0,31	280617	0,28
270116	0,17	231116	0,34	50717	0,28
MÉDIA	0,25	MÉDIA	0,27	MÉDIA	0,26
EP	0,03	EP	0,03	EP	0,01

Valores: Percentual; CEC: Circulação extracorpórea;
PCIR: Pré-condicionamento isquêmico remoto; EP: Erro Padrão

Tabela 32- Valores percentuais finais da **fração de área dos núcleos celulares da placenta** dos animais do grupo **Controle** e dos animais submetidos à circulação extracorpórea (**CEC**), com e sem pré-condicionamento isquêmico remoto (**PCIR**)

Animal	Controle	Animal	CEC	Animal	CEC + PCIR
20915	0,23	30216	0,36	301116	0,20
211015	0,21	40516	0,22	310517	0,24
60116	0,18	150616	0,18	70617	0,19
130116	0,21	220616	0,24	210617	0,20
200116	0,17	100816	0,19	280617	0,31
270116	0,26	231116	0,24	50717	0,26
MÉDIA	0,21	MÉDIA	0,24	MÉDIA	0,23
EP	0,01	EP	0,03	EP	0,02

Valores: Percentual; CEC: Circulação extracorpórea;
PCIR: Pré-condicionamento isquêmico remoto; EP: Erro Padrão

Tabela 33- Valores percentuais basais da **fração de área dos vasos intersticiais da placenta** dos animais do grupo **Controle** e dos animais submetidos à circulação extracorpórea (**CEC**), com e sem pré-condicionamento isquêmico remoto (**PCIR**)

Animal	Controle	Animal	CEC	Animal	CEC + PCIR
20915	0,19	30216	0,04	301116	0,08
211015	0,16	40516	0,08	310517	0,08
60116	0,20	150616	0,08	70617	0,07
130116	0,09	220616	0,05	210617	0,10
200116	0,09	100816	0,08	280617	0,10
270116	0,13	231116	0,03	50717	0,09
MÉDIA	0,14	MÉDIA	0,06	MÉDIA	0,09
EP	0,02	EP	0,01	EP	0,00

Valores: Percentual; CEC: Circulação extracorpórea;
PCIR: Pré-condicionamento isquêmico remoto; EP: Erro Padrão

Tabela 34- Valores percentuais finais da **fração de área dos vasos intersticiais da placenta** dos animais do grupo **Controle** e dos animais submetidos à circulação extracorpórea (**CEC**), com e sem pré-condicionamento isquêmico remoto (**PCIR**)

Animal	Controle	Animal	CEC	Animal	CEC + PCIR
20915	0,17	30216	0,05	301116	0,15
211015	0,22	40516	0,20	310517	0,10
60116	0,09	150616	0,07	70617	0,12
130116	0,11	220616	0,11	210617	0,13
200116	0,16	100816	0,13	280617	0,06
270116	0,12	231116	0,08	50717	0,24
MÉDIA	0,15	MÉDIA	0,11	MÉDIA	0,13
EP	0,02	EP	0,02	EP	0,02

Valores: Percentual; CEC: Circulação extracorpórea;
PCIR: Pré-condicionamento isquêmico remoto; EP: Erro Padrão

Tabela 35- Valores da **Interleucina-1** dos fetos do grupo **Controle Negativo**, aferidos por ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA).

Animal	Acesso Fetal	CEC	Pós-CEC	
		15 minutos	30 minutos	60 minutos
20915	68,51	67,36	54,72	61,82
211015	70,63	78,86	73,93	75,11
60116	76,72	74,68	80,77	75,50
130116	83,76	72,36	74,69	81,96
200116	73,17	77,04	79,73	96,77
270116	80,68	80,23	73,74	77,36
MÉDIA	75,58	75,09	72,93	78,09
EP	2,41	1,93	3,85	4,64

Valores: Picogramas por mililitro; CEC: Circulação extracorpórea; EP: Erro Padrão

Tabela 36- Valores da **Interleucina-1** dos fetos do grupo **CEC**, aferidos por ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA).

Animal	Acesso Fetal	CEC	Pós-CEC	
		15 minutos	30 minutos	60 minutos
30216	68,38	74,16	70,21	72,18
40516	67,29	72,60	70,91	77,01
150616	90,90	77,05	64,92	84,60
220616	97,62	96,00	106,06	
100816	77,97	79,34	95,93	108,53
231116	98,10	93,99	95,61	106,23
MÉDIA	83,38	82,19	83,94	89,71
EP*	5,74	4,17	7,05	7,49

Valores: Picogramas por mililitro; CEC: Circulação extracorpórea; EP: Erro Padrão

Tabela 37- Valores da **Interleucina-1** dos fetos do grupo **CEC + PCIR**, aferidos por ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA).

Animal	Acesso Fetal	CEC	Pós-CEC	
		15 minutos	30 minutos	60 minutos
301116	41,70	41,56	37,64	39,22
310517	38,96	35,17	34,69	30,84
70617	41,96	64,02	57,93	55,27
210617	48,54	57,92	49,60	50,41
280617	47,31	40,76	42,30	60,32
50717	37,09	45,90	39,90	45,58
MÉDIA	42,59	47,55	43,67	46,94
EP*	1,85	4,53	3,52	4,40

Valores: Picogramas por mililitro; CEC: Circulação extracorpórea; EP: Erro Padrão

Tabela 38- Valores da **Interleucina-6** dos fetos do grupo **Controle Negativo**, aferidos por ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA).

Animal	Acesso Fetal	CEC	Pós-CEC	
		15 minutos	30 minutos	60 minutos
20915	78,13	78,13	78,13	78,13
211015	78,13	78,13	78,13	78,13
60116	78,13	78,13	78,13	78,13
130116	78,13	78,13	78,13	78,13
200116	78,13	78,13	78,13	78,13
270116	78,13	78,13	78,13	78,13
MÉDIA	78,13	78,13	78,13	78,13
EP	0,00	0,00	0,00	0,00

Valores: Picogramas por mililitro; CEC: Circulação extracorpórea; EP: Erro Padrão

Tabela 39- Valores da **Interleucina-6** dos fetos do grupo **CEC** aferidos por ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA).

Animal	Acesso Fetal	CEC	Pós-CEC	
		15 minutos	30 minutos	60 minutos
30216	78,13	78,13	78,13	78,13
40516	78,13	78,13	78,13	78,13
150616	78,13	78,13	78,13	84,08
220616	78,13	78,13	78,13	NO
100816	78,13	78,13	78,13	78,13
231116	78,13	78,13	109,43	151,02
MÉDIA	78,13	78,13	83,34	93,89
EP	0,00	0,00	5,22	14,33

Valores: Picogramas por mililitro; CEC: Circulação extracorpórea; NO: Não obtido; EP: Erro Padrão

Tabela 40- Valores da **Interleucina-6** dos fetos do grupo **CEC + PCIR** aferidos por ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA).

Animal	Acesso Fetal	CEC	Pós-CEC	
		15 minutos	30 minutos	60 minutos
301116	78,13	78,13	78,13	83,75
310517	78,13	78,13	706,22	78,13
70617	78,13	78,13	78,13	1198,34
210617	78,13	78,13	287,35	78,13
280617	78,13	78,13	78,13	261,76
50717	410,71	78,13	78,13	78,13
MÉDIA	133,56	78,13	217,68	296,37
EP	55,43	0,00	103,51	182,83

Valores: Picogramas por mililitro; CEC: Circulação extracorpórea; EP: Erro Padrão

Tabela 41- Valores da **Interleucina-10** dos fetos do grupo **Controle Negativo** aferidos por ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA).

Animal	Acesso Fetal	CEC	Pós-CEC (min.)	
		15 minutos	30 minutos	60 minutos
20915	80,00	80,00	80,00	80,00
211015	69,85	66,42	80,00	56,97
60116	80,00	80,00	80,00	80,00
130116	80,00	80,00	80,00	80,00
200116	80,00	80,00	80,00	80,00
270116	80,00	80,00	80,00	80,00
MÉDIA	78,31	77,74	80,00	76,16
EP*	1,69	2,26	0,00	3,84

Valores: Picogramas por mililitro; CEC: Circulação extracorpórea; EP: Erro Padrão

Tabela 42- Valores da **Interleucina-10** dos fetos do grupo **CEC**, aferidos por ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA).

Animal	Acesso Fetal	CEC	Pós-CEC	
		15 minutos	30 minutos	60 minutos
30216	79,46	80,00	77,62	79,98
40516	80,00	80,00	80,00	80,00
150616	80,00	80,00	80,00	80,00
220616	75,18	32,37	19,01	NO
100816	80,00	80,00	80,00	80,00
231116	64,23	24,36	28,97	24,10
MÉDIA	76,48	62,79	60,93	68,82
EP*	2,57	10,93	11,76	11,18

Valores: Picogramas por mililitro; CEC: Circulação extracorpórea; NO: Não obtido; EP: Erro Padrão

Tabela 43- Valores da **Interleucina-10** dos fetos do grupo **CEC + PCIR** aferidos por ensaio de imunoabsorção enzimática – ELISA e distribuídos pelos momentos de coleta do sangue fetal.

Animal	Acesso Fetal	CEC	Pós-CEC	
		15 minutos	30 minutos	60 minutos
301116	24,16	14,23	17,91	17,23
310517	80,00	80,00	80,00	80,00
70617	80,00	80,00	80,00	80,00
210617	61,87	37,60	41,20	50,04
280617	80,00	80,00	80,00	77,42
50717	80,00	80,00	80,00	80,00
MÉDIA	67,67	61,97	63,18	64,11
EP*	9,19	11,80	11,05	10,54

Valores: Picogramas por mililitro; CEC: Circulação extracorpórea; EP: Erro Padrão

Tabela 44- Valores do **Fator de Necrose Tumoral Alfa** dos fetos do grupo **Controle Negativo** aferidos por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA).

Animal	Acesso Fetal	CEC	Pós-CEC	
		15 minutos	30 minutos	60 minutos
20915	15,63	15,63	15,63	15,63
211015	15,63	22,24	15,63	15,63
60116	15,63	15,63	15,63	18,27
130116	15,63	15,63	15,63	15,63
200116	15,63	15,63	15,63	15,63
270116	15,63	15,63	15,63	15,63
MÉDIA	15,63	16,73	15,63	16,07
EP	0,00	1,10	0,00	0,44

Valores: Picogramas por mililitro; CEC: Circulação extracorpórea; EP: Erro Padrão

Tabela 45- Valores do **Fator de Necrose Tumoral Alfa** dos fetos do grupo **CEC** aferidos por ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA).

Animal	Acesso Fetal	CEC	Pós-CEC	
		15 minutos	30 minutos	60 minutos
30216	15,63	15,63	15,63	15,63
40516	15,63	15,63	15,63	15,63
150616	15,63	15,63	15,63	15,63
220616	15,63	15,63	15,63	NO
100816	15,63	15,63	15,63	15,63
231116	15,63	15,63	15,63	29,88
MÉDIA	15,63	15,63	15,63	18,48
EP*	0,00	0,00	0,00	2,85

Valores: Picogramas por mililitro; CEC: Circulação extracorpórea; NO: Não obtido; EP: Erro Padrão

Tabela 46- Valores do **Fator de Necrose Tumoral Alfa** dos fetos do grupo **CEC + PCIR** aferidos por ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA).

Animal	Acesso Fetal	CEC	Pós-CEC	
		15 minutos	30 minutos	60 minutos
301116	15,63	15,63	16,53	19,48
310517	15,63	15,63	15,63	15,63
70617	18,07	15,63	15,63	15,63
210617	15,63	302,91	279,63	203,56
280617	15,63	15,63	15,63	20,33
50717	15,63	15,63	15,63	15,63
MÉDIA	16,03	63,51	59,78	48,37
EP	0,41	47,88	43,97	31,05

Valores: Picogramas por mililitro; CEC: Circulação extracorpórea; EP: Erro Padrão

Tabela 47- Valores do **Prostaglandina** dos fetos do grupo **Controle Negativo** aferidos por ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA).

Animal	Acesso Fetal	CEC	Pós-CEC	
		15 minutos	30 minutos	60 minutos
20915	315,48	654,01	650,10	928,32
211015	310,94	259,68	430,26	398,53
60116	728,82	1155,20	953,06	1074,51
130116	304,30	558,32	387,86	591,22
200116	225,43	363,24	405,06	610,75
270116	533,87	420,05	262,31	521,85
MÉDIA	403,14	568,42	514,78	687,53
EP	77,61	130,53	101,56	105,49

Valores: Picogramas por mililitro; CEC: Circulação extracorpórea; EP: Erro Padrão

Tabela 48- Valores do **Prostaglandina** dos fetos do grupo **CEC** aferidos por ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA).

Animal	Acesso Fetal	CEC	Pós-CEC	
		15 minutos	30 minutos	60 minutos
30216	455,20	789,31	467,79	422,25
40516	80,31	88,27	156,99	123,53
150616	717,46	456,83	324,41	394,13
220616	630,15	541,76	406,03	NO
100816	667,38	512,00	494,17	343,24
231116	375,64	267,29	435,16	989,38
MÉDIA	487,69	442,58	380,76	454,51
EP	97,46	98,55	50,75	143,65

Valores: Picogramas por mililitro; CEC: Circulação extracorpórea; NO: Não obtido; EP: Erro Padrão

Tabela 49- Valores do **Prostaglandina** dos fetos do grupo **CEC + PCIR** aferidos por ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA).

Animal	Acesso Fetal	CEC	Pós-CEC	
		15 minutos	30 minutos	60 minutos
301116	NO	NO	NO	NO
310517	519,41	1482,97	1358,03	5365,97
70617	629,15	1193,20	49,22	852,07
210617	182,77	604,59	423,36	547,60
280617	447,80	362,15	504,45	707,07
50717	433,82	609,87	477,13	468,29
MÉDIA	442,59	850,56	562,44	1588,20
EP*	73,59	209,08	215,21	946,75

Valores: Picogramas por mililitro; CEC: Circulação extracorpórea; NO: Não obtido; EP: Erro Padrão

Tabela 50- Valores do **Tromboxana** dos fetos do grupo **Controle Negativo** aferidos por ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA).

Animal	Acesso Fetal	CEC	Pós-CEC	
		15 minutos	30 minutos	60 minutos
20915	23741,70	892,25	2005,03	1751,98
211015	484,70	5194,50	5384,07	15092,60
60116	365,05	2073,53	454,00	9377,14
130116	1211,73	14397,50	5484,80	15480,90
200116	209,46	196,08	543,40	265,10
270116	577,84	13486,60	268,22	18209,12
MÉDIA	4431,75	6040,08	2356,59	10029,47
EP	3864,54	2597,42	1005,71	3090,55

Valores: Picogramas por mililitro; CEC: Circulação extracorpórea; EP: Erro Padrão

Tabela 51- Valores do **Tromboxana** dos fetos do grupo **CEC** aferidos por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA).

Animal	Acesso Fetal	CEC	Pós-CEC	
		15 minutos	30 minutos	60 minutos
30216	1140,70	1699,20	1698,30	1197,97
40516	633,60	477,09	342,01	9458,10
150616	262,47	174,30	238,40	8107,40
220616	109,75	157,10	NO	NO
100816	3981,80	1199,70	1302,80	1621,10
231116	3524,60	252,74	262,70	260,62
MÉDIA	1608,82	660,02	768,84	4129,04
EP	695,97	262,00	305,67	1924,47

Valores: Picogramas por mililitro; CEC: Circulação extracorpórea; NO: Não obtido; EP: Erro Padrão

Tabela 52- Valores do **Tromboxana** dos fetos do grupo **CEC + PCIR** aferidos por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA).

Animal	Acesso Fetal	CEC	Pós-CEC	
		15 minutos	30 minutos	60 minutos
301116	15544,20	2016,50	1020,30	3278,99
310517		1443,50	2520,20	2752,00
70617	7637,01	588,12	736,05	680,80
210617	1091,58	1419,90	685,00	738,70
280617	617,50	209,27	376,50	408,16
50717	175,70	474,30	276,23	761,76
MÉDIA	5013,20	1025,27	935,71	1436,74
EP	2965,54	287,15	335,07	506,49

Valores: Picogramas por mililitro; CEC: Circulação extracorpórea; EP: Erro Padrão

Tabela 53 - Valores percentuais basais e finais da **molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1)** no interstício placentário do grupo **Controle Negativo**, aferidos por imuno-histoquímica.

Animal	ICAM (%)	
	Inicial	Final
20915	4,65	3,58
211015	4,18	3,49
60116	3,98	4,35
130116	3,98	4,03
200116	4,12	4,06
270116	4,45	3,40
MÉDIA	4,23	3,82
EP	0,11	0,16

Valores: Percentual; EP: Erro Padrão

Tabela 54 - Valores percentuais basais e finais da **molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1)** no interstício placentário do grupo **CEC**, aferidos por imuno-histoquímica.

Animal	ICAM-1 (%)	
	Inicial	Final
30216	3,94	3,63
40516	4,89	3,96
150616	3,14	4,09
220616	3,33	3,94
100816	3,03	3,13
231116	2,68	3,02
MÉDIA	3,50	3,63
EP	0,33	0,19

Valores: Percentual; EP: Erro Padrão

Tabela 55 - Valores percentuais basais e finais da **molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1)** no interstício placentário do grupo **CEC + PCIR**, aferidos por imuno-histoquímica.

Animal	ICAM-1 (%)	
	Inicial	Final
301116	3,59	3,81
310517	3,28	2,97
70617	2,95	3,97
210617	2,72	3,48
280617	3,21	3,46
50717	3,46	3,15
MÉDIA	3,20	3,48
EP	0,13	0,16

Valores: Percentual; EP: Erro Padrão

Tabela 56- Valores percentuais basais e finais da **molécula de adesão vascular (VCAM-1)** no interstício placentário do grupo **Controle Negativo**, aferidos por imuno-histoquímica.

Animal	VCAM-1 (%)	
	Inicial	Final
20915	5,21	3,65
211015	3,18	3,70
60116	4,03	3,69
130116	4,31	3,52
200116	2,90	3,56
270116	3,21	3,13
MÉDIA	3,81	3,54
EP	0,36	0,09

Valores: Percentual; EP: Erro Padrão

Tabela 57- Valores percentuais basais e finais da **molécula de adesão vascular (VCAM-1)** no interstício placentário do grupo **Controle CEC**, aferidos por imuno-histoquímica.

Animal	VCAM-1 (%)	
	Inicial	Final
30216	4,32	4,07
40516	3,57	3,60
150616	3,51	3,96
220616	3,58	4,52
100816	3,04	3,94
231116	3,16	3,75
MÉDIA	3,53	3,97
EP	0,18	0,13

Valores: Percentual; EP: Erro Padrão

Tabela 58- Valores percentuais basais e finais da **molécula de adesão vascular (VCAM-1)** no interstício placentário do grupo **Controle CEC + PCIR**, aferidos por imuno-histoquímica.

Animal	VCAM-1 (%)	
	Inicial	Final
301116	3,34	3,50
310517	3,41	3,91
70617	3,50	3,49
210617	3,38	3,53
280617	2,99	2,98
50717	3,22	3,19
MÉDIA	3,31	3,43
EP	0,07	0,13

Valores: Percentual; EP: Erro Padrão

Tabela 59- Valores percentuais basais e finais do receptor ***Toll-Like-4*** no interstício placentário dos animais do grupo **Controle Negativo**, aferidos por imuno-histoquímica.

Animal	Receptor <i>Toll-Like 4</i> (%)	
	Inicial	Final
20915	3,75	3,75
211015	3,90	3,55
60116	3,73	3,30
130116	3,42	13,94
200116	3,96	2,81
270116	4,50	4,37
MÉDIA	3,88	5,29
EP	0,15	1,74

Valores: Percentual; EP: Erro Padrão

Tabela 60- Valores percentuais basais e finais do receptor ***Toll-Like-4*** no interstício placentário dos animais do grupo **CEC**, aferidos por imuno-histoquímica.

Animal	Receptor <i>Toll-Like 4</i> (%)	
	Inicial	Final
30216	3,56	3,66
40516	4,08	3,42
150616	3,62	3,04
220616	3,24	3,70
100816	3,87	4,21
231116	3,01	3,37
MÉDIA	3,56	3,57
EP	0,16	0,16

Valores: Percentual; EP: Erro Padrão

Tabela 61- Valores percentuais basais e finais do receptor ***Toll-Like-4*** no interstício placentário dos animais do grupo **CEC + PCIR**, aferidos por imuno-histoquímica.

Animal	Receptor <i>Toll-Like 4</i> (%)	
	Inicial	Final
301116	2,35	3,27
310517	3,05	3,52
70617	2,98	2,67
210617	3,13	3,47
280617	2,81	2,86
50717	3,91	3,93
MÉDIA	3,04	3,29
EP	0,21	0,19

Valores: Percentual; EP: Erro Padrão

Tabela 62- Valores percentuais basais e finais da **molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1)** na vasculatura placentária do grupo **Controle Negativo**, aferidos por imuno-histoquímica.

Animal	ICAM-1 (%)	
	Inicial	Final
20915	3,99	9,36
211015	8,42	7,36
60116	6,17	11,41
130116	6,21	7,45
200116	7,91	6,32
270116	5,87	8,05
MÉDIA	6,43	8,32
EP	0,65	0,74

Valores: Percentual; EP: Erro Padrão

Tabela 63- Valores percentuais basais e finais da **molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1)** na vasculatura placentária do grupo **CEC**, aferidos por imuno-histoquímica.

Animal	ICAM-1 (%)	
	Inicial	Final
30216	8,41	7,77
40516	11,49	7,52
150616	12,57	10,27
220616	11,19	14,53
100816	11,43	9,88
231116	10,97	11,13
MÉDIA	11,01	10,18
EP	0,57	1,05

Valores: Percentual; EP: Erro Padrão

Tabela 64- Valores percentuais basais e finais da **molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1)** na vasculatura placentária do grupo **CEC + PCIR**, aferidos por imuno-histoquímica.

Animal	ICAM-1 (%)	
	Inicial	Final
301116	10,07	13,93
310517	8,24	10,29
70617	6,02	12,08
210617	8,09	8,65
280617	8,02	7,94
50717	9,47	13,00
MÉDIA	8,32	10,98
EP	0,57	0,99

Valores: Percentual; EP: Erro Padrão

Tabela 65- Valores percentuais basais e finais da **molécula de adesão vascular (VCAM-1)** na vasculatura placentária do grupo **Controle Negativo**, aferidos por imuno-histoquímica.

Animal	VCAM-1 (%)	
	Inicial	Final
20915	9,80	14,75
211015	11,78	10,42
60116	9,18	11,13
130116	8,88	11,41
200116	9,77	8,86
270116	12,30	10,86
MÉDIA	10,29	11,24
EP	0,58	0,79

Valores: Percentual; EP: Erro Padrão

Tabela 66- Valores percentuais basais e finais da **molécula de adesão vascular (VCAM-1)** na vasculatura placentária do grupo **CEC**, aferidos por imuno-histoquímica.

Animal	VCAM-1 (%)	
	Inicial	Final
30216	10,03	11,69
40516	7,74	11,26
150616	10,56	12,09
220616	12,81	10,43
100816	11,83	9,27
231116	7,67	10,87
MÉDIA	10,11	10,94
EP	0,86	0,41

Valores: Percentual; EP: Erro Padrão

Tabela 67- Valores percentuais basais e finais da **molécula de adesão vascular (VCAM-1)** na vasculatura placentária do grupo **CEC + PCIR**, aferidos por imuno-histoquímica.

Animal	VCAM-1 (%)	
	Inicial	Final
301116	12,73	9,97
310517	8,13	9,26
70617	9,50	8,00
210617	7,97	7,05
280617	13,53	14,61
50717	12,66	9,83
MÉDIA	10,75	9,79
EP	1,02	1,07

Valores: Percentual; EP: Erro Padrão

Tabela 68- Valores percentuais basais e finais do receptor ***Toll-Like-4*** na vasculatura placentária dos animais do grupo **Controle Negativo**, aferidos por imuno-histoquímica.

Animal	Receptor <i>Toll-Like 4</i> (%)	
	Inicial	Final
20915	11,07	7,94
211015	14,29	11,55
60116	10,99	14,27
130116	9,23	10,04
200116	8,93	7,95
270116	6,34	9,03
MÉDIA	10,14	10,13
EP	1,09	1,00

Valores: Percentual; EP: Erro Padrão

Tabela 69- Valores percentuais basais e finais do receptor ***Toll-Like 4*** na vasculatura placentária dos animais do grupo **CEC**, aferidos por imunohistoquímica.

Animal	Receptor <i>Toll-Like 4</i> (%)	
	Inicial	Final
30216	8,95	9,72
40516	11,57	8,24
150616	11,17	8,29
220616	7,89	13,33
100816	11,63	13,52
231116	11,04	17,41
MÉDIA	10,38	11,75
EP	0,64	1,48

Valores: Percentual; EP: Erro Padrão

Tabela 70- Valores percentuais basais e finais do receptor ***Toll-Like 4*** na vasculatura placentária dos animais do grupo **CEC + PCIR**, aferidos por imunohistoquímica.

Animal	Receptor <i>Toll-Like 4</i> (%)	
	Inicial	Final
301116	7,54	11,98
310517	8,91	12,16
70617	7,67	9,79
210617	11,46	11,36
280617	13,39	12,38
50717	14,17	12,67
MÉDIA	10,52	11,72
EP	1,18	0,43

Valores: Percentual; EP: Erro Padrão

Tabela 71- Valores percentuais da **molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1)** nos pulmões dos animais do grupo **Controle** e dos animais submetidos à circulação extracorpórea (**CEC**), com e sem pré-condicionamento isquêmico remoto (**PCIR**), aferidos por imuno-histoquímica.

Animal	Controle	Animal	CEC	Animal	CEC + PCIR
20915	10,21	30216	4,29	301116	3,87
211015	5,30	40516	3,20	310517	2,07
60116	6,21	150616	3,64	70617	1,56
130116	9,32	220616	7,93	210617	NO
200116	10,62	100816	6,84	280617	9,20
270116	2,45	231116	5,00	50717	10,92
MÉDIA	7,35	MÉDIA	5,15	MÉDIA	5,52
EP	3,23	EP	0,76	EP	1,91

Valores: Percentual; CEC: Circulação extracorpórea;
PCIR: Pré-condicionamento isquêmico remoto;
NO: Não obtido; EP: Erro Padrão

Tabela 72- Valores percentuais da **molécula de adesão vascular-1 (VCAM-1)** nos pulmões dos animais do grupo **Controle** e dos animais submetidos à circulação extracorpórea (**CEC**), com e sem pré-condicionamento isquêmico remoto (**PCIR**), aferidos por imuno-histoquímica.

Animal	Controle	Animal	CEC	Animal	CEC + PCIR
20915	10,84	30216	9,44	301116	10,10
211015	9,84	40516	8,25	310517	11,31
60116	10,70	150616	9,50	70617	9,02
130116	9,68	220616	11,22	210617	8,91
200116	9,95	100816	9,50	280617	9,99
270116	11,13	231116	9,26	50717	8,36
MÉDIA	10,36	MÉDIA	9,53	MÉDIA	9,61
EP	0,25	EP	0,39	EP	0,43

Valores: Percentual; CEC: Circulação extracorpórea;
PCIR: Pré-condicionamento isquêmico remoto; EP: Erro Padrão

Tabela 73- Valores percentuais do Receptor ***Toll-Like-4*** nos pulmões dos animais do grupo **Controle** e dos animais submetidos à circulação extracorpórea (**CEC**), com e sem pré-condicionamento isquêmico remoto (**PCIR**), aferidos por imuno-histoquímica.

Animal	Controle	Animal	CEC	Animal	CEC + PCIR
20915	8,88	30216	10,12	301116	11,29
211015	10,47	40516	10,99	310517	10,55
60116	10,43	150616	10,05	70617	9,39
130116	8,70	220616	10,55	210617	10,56
200116	9,76	100816	9,82	280617	9,70
270116	10,36	231116	10,08	50717	11,50
MÉDIA	9,77	MÉDIA	10,27	MÉDIA	10,50
EP	0,33	EP	0,17	EP	0,34

Valores: Percentual; CEC: Circulação extracorpórea;
PCIR: Pré-condicionamento isquêmico remoto; EP: Erro Padrão

8-REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- van der Linde D, Konings EE, Slager MA, Witsenburg M, Helbing WA, Takkenberg JJ, et al. Birth Prevalence of Congenital Heart Disease. *J Am Coll Cardiol* 2011; 58(21):2241-7.
- 2- Dolk H, Loane M, Garne E, for the European Surveillance of Congenital Anomalies (EUROCAT) Working Group. Congenital heart defects in Europe: prevalence and perinatal mortality, 2000 to 2005. *Circulation* 2011; 123:841–9.
- 3- Oster EM, Lee KA, Riehle-Colarusso T, Shin M, Correa A. Temporal trends in survival among infants with critical congenital heart defects. *Pediatrics* 2013; 131(5):e1502-8.
- 4- Oster EM, Kim HC, Kusano SA, Cragan DJ. A Population-Based Study of the Association of Prenatal Diagnosis With Survival Rate for Infants With Congenital Heart Defects. *Am J Cardiol* 2014; 113:1036e1040.
- 5- Hoffman JL. Incidence of congenital heart disease: I: Postnatal incidence. *Pediatr Cardiol*, 1995 ;16(3):103-13.
- 6- Pinto Júnior VC, Daher CV, Sallum FS, Jatene MB, Croti UA. Situação das cirurgias cardíacas congênitas no Brasil. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 2004; 19(2): III-VI.
- 7- Assad RS. Fetal cardiac surgery: a reality in the 90's? *Arq Bras Cardiol*. 1991; 56(6):425-7.
- 8- Sabik JF, Assad RS, Hanley FL. Halothane as an anesthetic for fetal surgery. *J Pediatr Surg*. 1993; 28(4):542-6
- 9- Assad RS, Lee FY, Hanley FL. Placental compliance during fetal extracorporeal circulation. *J Appl Physiol* 1985; 90(5):1882-6.

- 10- Diretrizes das Indicações da Ecocardiografia. Arq Bras Cardiol 2009; 93(6 Supl. 3):e265-e302.
- 11- Small M, Copel JA. Indications for fetal echocardiography. Pediatr Cardiol 2004; 25:210-222.
- 12- Yuan SM. Fetal cardiac interventions: an update of therapeutic options. Rev Bras Cir Cardiovasc. 2014; 29(3):388-95.
- 13- Assad RS, Jatene MB, Moreira LF, Sales PC, Costa R, Hanley FL, et al. Fetal heart block: a new experimental model to assess fetal pacing. Pacing Clin Electrophysiol. 1994; 17(7):1256-63.
- 14- Assad RS, Aiello VD, Jatene MB, Costa R, Hanley FL, Jatene AD. Cryosurgical ablation of fetal atrioventricular node: new model to treat fetal malignant tachyarrhythmias. Ann Thorac Surg. 1995; 60(6 Suppl):S629-32.
- 15- Assad RS, Zielinsky P, Kalil R, Lima G, Aramayo A, Santos A, et al. New lead for in utero pacing for fetal congenital heart block. J Thorac Cardiovasc Surg. 2003; 126(1):300-2.
- 16- Assad RS, Thomaz PG, Valente AS, Costa R, Marcial MB, Oliveira SA. Avaliação experimental de novo eletrodo para implante de marca-passo em fetos. Rev Bras Cir Cardiovasc 2006; 21(3):272-282.
- 17- Hartge DR, Weichert J, Krapp M, Germer U, Gembruch U, Axt-Flidner R. Results of early fetal echocardiography and cumulative detection rate of congenital heart disease. Cardiol Young. 2011; 21(5):505-17.
- 18- Bakiler AR, Ozer EA, Kanik A, Kanit H, Aktas FN. Accuracy of prenatal diagnosis of congenital heart disease with fetal echocardiography. Fetal Diagn Ther. 2007; 22(4):241-4.

-
- 19- Chew C, Stone S, Donath SM, Penny DJ. Impact of antenatal screening on the presentation of infants with congenital heart disease to a cardiology unit. *J Paediatr Child Health*. 2006; 42(11):704-8.
- 20- McBrien A, Sands A, Craig B, Dornan J, Casey F. Major congenital heart disease: antenatal detection, patient characteristics and outcomes. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2009; 22(2):101-5.
- 21 - Riera-Kinkel C. The third wave of cardiac surgery. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2016; 54(5):602-11.
- 22- Crispi F, Gratacós E. Fetal cardiac function: Technical considerations, potential research and clinical applications. *Fetal Diagn Ther*. 2012; 32(1-2):47-64.
- 23- American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart Disease and Stroke Statistics—2017 Update A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2017; 135:e146–e603.
- 24- Schleicha JM, Abdullac T, Summers R, Houyel L. An overview of cardiac morphogenesis. *Archives of Cardiovascular Disease*. 2013; 106:612-623.
- 25- Epstein A J. Cardiac Development and Implications for Heart Disease. *N Engl J Med* 2010; 363:1638-47.
- 26- Arcilla A R. Role of intracardiac streaming upon early cardiac development. *Cardiovascular and respiratory physiology in the fetus and neonate. Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd*. 1986; 133:33-45.

-
- 27- Bical O, Gallix P, Toussaint M, Hero M, Karam J, Sidi D, et al. Intrauterine creation and repair of pulmonary artery stenosis in the fetal lamb. Weight and ultrastructural changes of the ventricles. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1987; 93:761-6.
- 28- Bical O, Gallix P, Toussaint M, Landais P, Gaillard D, Karam J, et al. Intrauterine versus postnatal repair of created pulmonary artery stenosis in the lamb. Morphologic comparison. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1990; 99(4):685-90.
- 29- Turley K, Vlahakes GJ, Harrison MR, Messina L, Hanley F, Uhlig PN, et al. Intrauterine cardiothoracic surgery: the fetal lamb model. *Ann Thorac Surg*. 1982; 34(4):422-6.
- 30- Vlahakes GJ, Turley K, Uhlig PN, Verrier ED. Experimental model of congenital right ventricular hypertrophy created by pulmonary artery banding in utero. *Surg Forum* 1981; 32:233.
- 31- McElhinney DB, Tworetzky W, Lock JE. Current Status of Fetal Cardiac Intervention. *Circulation*. 2010; 121(10):1256-63.
- 32- Royston D. The inflammatory response and extracorporeal circulation. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 1997; 1:341-54.
- 33- Boyle EM, Pohlman TH, Johnson MC, Verrier ED. Endothelial cell injury in cardiovascular surgery: the systemic inflammatory response. *Ann Thorac Surg* 1997; 63:277-84.
- 34- Hall RI, Smith MS, Rocker G. The systemic inflammatory response to cardiopulmonary bypass: pathophysiological, therapeutic, and pharmacological considerations. *Anesth Analg*. 1997; 85:766-82.

-
- 35- Wan S, LeClerc JL, Vincent JL. Inflammatory response to cardiopulmonary bypass. Mechanisms involved and possible therapeutic strategies. *Chest* 1997; 112:676-92.
- 36- Slate RK, Richter RC, Rudolph AM, Turley K. Cardiopulmonary bypass in fetal lambs: a technique for intrauterine cardiac surgery. *Circulation* 1984; 70(Supl 2):285
- 37- Richter RC, Slate RK, Rudolph AM, Turley K. Fetal blood flow during hypothermic cardiopulmonary bypass in utero. *J Cardiovasc Surg* 1985; 26:86.
- 38- Bradley SM, Verrier ED, Duncan BW, Longaker MT, Turley K, Harrison MR, et al. Cardiopulmonary bypass in the fetal lamb: Effect of sodium Nitroprusside. *Circulation* 1989; 80(Supl 2): 220.
- 39- Bradley SM, Hanley FL, Duncan BW. Regional myocardial blood flows during cardiopulmonary bypass in the fetal lamb. *Surg Forum*. 1990; 41:203-6.
- 40- Rudolph AM. Distribution and regulation of blood flow in the fetal and neonatal lamb. *Circ Res* 1985; 57:811-821.
- 41- Reddy VM, McElhinney DB, Rajasinghe HA, Rodriguez JL, Hanley FL. Cytokine response to fetal cardiac bypass. *J Matern Fetal Invest*. 1998; 8:46-49.
- 42- V Brix-Christensen. The systemic inflammatory response after Cardiac Surgery with cardiopulmonary bypass in children. *Acta Anesthesiol Scand*. 2001; 45(6):671-9.
- 43- Assad RS, Hanley FL. Artificial placenta - a need for fetal surgery? *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1998; 115(5):1021-2.

-
- 44- Sabik JF, Heinemann MK, Assad RS, Hanley FL. High-dose steroids prevent placental dysfunction after fetal cardiac bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1994; 107(1):116-24.
- 45- Sabik JF, Assad RS, Hanley FL. Prostaglandin synthesis inhibition prevents placental dysfunction after fetal cardiac bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1992; 103(4):733-41.
- 46- Assad RS, Lee FY, Bergner K, Hanley FL. Extracorporeal circulation in the isolated in situ lamb placenta: hemodynamic characteristics. *J Appl Physiol* 1992; 72(6):2176-80.
- 47- Lee FY, Assad RS, Ohare RE, Hanley FL. Cardiopulmonary Bypass in the Isolated In-situ Lamb Placenta - Hemodynamic Characteristics. *Circulation* 1990; 82(4),151.
- 48- Reddy VM, Liddicoat JR, Klein JR, McElhinney DB, Wampler RK, Hanley FL. Fetal cardiac bypass using an in-line axial flow pump to minimize extracorporeal surface and avoid priming volume. *Ann Thorac Surg.* 1996; 62(2):393-400.
- 49- Sebastian VA, Ferro G, Kagawa H, Nasirov T, Maeda K, Ferrier WT, et al. Fetal cardiac intervention: improved results of fetal cardiac bypass in immature fetuses using the Tiny Pump device. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2013; 145(6):1460-4.
- 50- Day JR, Taylor KM. The systemic inflammatory response syndrome and cardiopulmonary bypass. *Int J Surg.* 2005; 3(2):129-140.

- 51- Wang S, Krawiec C, Patel S, Kunselman AR, Song J, Lei F, et al. Laboratory evaluation of hemolysis and systemic inflammatory response in neonatal nonpulsatile and pulsatile extracorporeal life support systems. *Artif Organs*. 2015; 39(9):774–81.
- 52- Rungatscher A, Tessari M, Stranieri C, Solani E, Linardi D, Milani E, et al. Oxygenator is the main responsible for leukocyte activation in experimental model of extracorporeal circulation: a cautionary tale. *Mediators Inflamm*. 2015; 2015:1-7.
- 53- Mildner RJ, Taub N, Vyas JR, Killer HM, Firmin RK, Field DJ, et al. Cytokine imbalance in infants receiving extracorporeal membrane oxygenation for respiratory failure. *Biol Neonate*. 2005; 88(4):321–7.
- 54- McIlwain RB, Timpa JG, Kurundkar AR, Holt DW, Kelly DR, Hartman YE, et al. Plasma concentrations of inflammatory cytokines rise rapidly during ECMO-related SIRS due to the release of preformed stores in the intestine. *Lab Invest*. 2010; 90(1):128–39.
- 55- Golej J, Winter P, Schöffmann G, Kahlbacher H, Stoll E, Boigner H, et al. Impact of extracorporeal membrane oxygenation modality on cytokine release during rescue from infant hypoxia. *Shock*. 2003; 20(2):110–5.
- 56- Shi J, Chen Q, Yu W, Shen J, Gong J, He C, et al. Continuous renal replacement therapy reduces the systemic and pulmonary inflammation induced by venovenous extracorporeal membrane oxygenation in a porcine model. *Artif Organs*. 2014; 38(3):215-23.

- 57- He C, Yang S, Yu W, Chen Q, Shen J, Hu Y , et al. Effects of continuous renal replacement therapy on intestinal mucosal barrier function during extracorporeal membrane oxygenation in a porcine model. *J Cardiothorac Surg*. 2014; 9:72.
- 58- Yimin H, Wenkui Y, Jialiang S, Qiyi C, Juanhong S, Zhiliang L, et al. Effects of continuous renal replacement therapy on renal inflammatory cytokines during extracorporeal membrane oxygenation in a porcine model. *J Cardiothorac Surg*. 2013; 8:113.
- 59- Shen J, Yu W, Chen Q, Shi J, Hu Y, Zhang J, et al. Continuous renal replacement therapy (CRRT) attenuates myocardial inflammation and mitochondrial injury induced by venovenous extracorporeal membrane oxygenation (VV ECMO) in a healthy piglet model. *Inflammation*. 2013; 36(5):1186–93.
- 60- Neary P, Redmond HP. Ischaemia–reperfusion injury and the systemic inflammatory response syndrome. In *Ischemia–Reperfusion Injury*, Grace PA, Mathie RT (eds). Blackwell Science: London, 1999; 123-136.
- 61- Rothlein R, Dustin ML, Marlin SD, Springer TA. A human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) distinct from LFA-1. *Journal of Immunology*. 1986; 137(4):1270-74.
- 62- Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol*. 2000; 190(3):255-66.

-
- 63- Cheung MM, Kharbanda RK, Konstantinov IE, Shimizu M, Frndova H, Li J, et al. Randomized controlled trial of the effects of remote ischemic preconditioning on children undergoing cardiac surgery: First clinical application in humans. *J Am Coll Cardiol*. 2006; 47(11):2277-82.
- 64- Hausenloy DJ, Mwamure PK, Venugopal V. Effect of remote ischaemic preconditioning on myocardial injury in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery: A randomised controlled trial. *Lancet*. 2007; 370:575-579 .
- 65- Fellahi JL, Gue X, Richomme X. Short- and long-term prognostic value of postoperative cardiac troponin I concentration in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *Anesthesiology*. 2003; 99:270-274.
- 66- Kathiresan S, Servoss SJ, Newell JB. Cardiac troponin T elevation after coronary artery bypass grafting is associated with increased one-year mortality. *Am J Cardiol*. 2004; 94:879-881.
- 67- Steen H, Giannitsis E, Futterer S. Cardiac troponin T at 96hours after acute myocardial infarction correlates with infarct size and cardiac function. *J Am Coll Cardiol*. 2006; 48:2192-2194.
- 68- Vasile VC, Babuin L, Giannitsis E. Relationship of MRI-determined infarct size and cTnl measurements in patients with ST-elevation myocardial infarction. *Clin Chem*. 2008; 54:617-619.
- 69- Kharbanda RK, Nielsen TT, Redington AN. Translation of remote ischemic preconditioning into clinical practice. *Lancet*. 2009; 374(9700):1557-65.

- 70- Shimizu M, Tropak M, Diaz RJ, Suto F, Surendra H, Kuzmin E, et al. Transient limb ischaemia remotely preconditions through a humoral mechanism acting directly on the myocardium: evidence suggesting cross-species protection. *Clin Sci (Lond)*. 2009; 117(5):191-200.
- 71- Shimizu M, Saxena P, Konstantinov IE, Cherepanov V, Cheung MM, Wearden P, et al. Remote ischemic preconditioning decreases adhesion and selectively modifies functional responses of human neutrophils. *J Surg Res*. 2010; 158(1):155-61.
- 72- Costa JF, Fontes-Carvalho R, Leite-Moreira AF. Myocardial remote ischemic preconditioning: from pathophysiology to clinical application. *Rev Port Cardiol*. 2013; 32(11):893-904.
- 73- Aulakh AS, Randhawa PK, Singh N, Jaggi AS. Neurogenic pathways in remote ischemic preconditioning induced cardioprotection: Evidences and possible mechanisms. *Korean J Physiol Pharmacol*. 2017; 21(2):145-152.
- 74- Lim SY, Yellon DM, Hausenloy DJ. The neural and humoral pathways in remote limb ischemic preconditioning. *Basic Res Cardiol*, 2010; 105:651-655.
- 75- Mastitskaya S, Marina N, Gourine A, Gilbey MP, Spyer KM, Teschemacher AG, et al. Cardioprotection evoked by remote ischaemic preconditioning is critically dependent on the activity of vagal pre-ganglionic neurones. *Cardiovasc Res*. 2012; 95(4):487-94.
- 76- Loukogeorgakis SP, Panagiotidou AT, Broadhead MW. Remote ischemic preconditioning provides early and late protection against endothelial ischemia-reperfusion injury in humans: Role of the autonomic nervous system. *J Am Coll Cardiol*. 2005; 46:450-456.

- 77- Weinbrenner C, Nelles M, Herzog N, Sárváry L, Strasser RH. Remote preconditioning by infrarenal occlusion of the aorta protects the heart from infarction: a newly identified non-neuronal but PKC-dependent pathway. *Cardiovasc Res*. 2002; 55(3):590-601.
- 78- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: A delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. 1986; 74:1124-1136
- 79- Rabinovitch M, Gamble W, Nadas AS, Miettinen OS, Reid L. Rat pulmonary circulation after chronic hypoxia: hemodynamic and structural features. *Am J Physiol*. 1979; 236(6):H818-27.
- 80- Liu XB, Zhou CB, Chen JM, Cen JZ, Xu G, Zhuang J. A fetal goat model of cardiopulmonary bypass with cardioplegic arrest and hemodynamic assessment. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2011; 142:1562-6.
- 81- Assad RS, Lee FY, Sabik J, Mackenzie S, Hanley FL. Tolerance of Placenta to Normothermic Umbilical Circulatory Arrest. *J Matern Fetal Invest*, 1992; 2(3):145-150.
- 82- Mak KK, Gude NM, Walters WA, Boura AL. Effects of vasoactive autacoids on the human umbilical-fetal placental vasculature. *Br J Obstet Gynaecol*. 1984; 91(2):99-106.
- 83- Sand A, Andersson E, Fried G. Nitric oxide donors mediate vasodilation in human placental arteries partly through a direct effect on potassium channels. *Placenta*. 2006; 27(2-3):181-90.
- 84- Zhou C, Zhuang J, Zhang X, Zhang J. Changes in atrial natriuretic peptide levels during cardiac bypass in the fetal goat. *Artif Organs*. 2008; 32(12):956-61.

-
- 85- McCarthy AL, Woolfson RG, Evans BJ, Davies DR, Raju SK, Poston L. Functional characteristics of small placental arteries. *Am J Obstet Gynecol.* 1994; 170(3):945-51.
- 86- Kingdom JC, Burrell SJ, Kaufmann P. Pathology and clinical implications of abnormal umbilical artery Doppler waveforms. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 1997; 9(4):271-86.
- 87- Valdés G, Corthorn J, Bharadwaj MS, Joyner J, Schneider D, Brosnihan KB. Utero-placental expression of angiotensin-(1-7) and ACE2 in the pregnant guinea-pig. *Reprod Biol Endocrinol.* 2013; 11:5-12.
- 88- Zhou CB, Zhuang J, Chen JM, Zhang XH, Lui RC. Decrease in inflammatory response does not prevent placental dysfunction after fetal cardiac bypass in goats. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2012; 143(2):445-50.
- 89- Greeley WJ, Bushman GA, Kong DL, Oldham HN, Peterson MB. Effects of cardiopulmonary bypass on eicosanoid metabolism during pediatric cardiovascular surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1988; 95:842-9.
- 90- Takatani S, Hoshi H, Tajima K, Ohuchi K, Nakamura M, Asama J, et al. Feasibility of a miniature centrifugal rotary blood pump for low-flow circulation in children and infants. *ASAIO J.* 2005; 51:557-62.
- 91- Hausenloy DJ, Yellon DM. Remote ischaemic preconditioning: underlying mechanisms and clinical application. *Cardiovascular Research* 2008; 79(3):377-86.
- 92- Hepponstall M, Ignjatovic V, Binos S, Monagle P, Jones B, Cheung MH, et al. Remote ischemic preconditioning (RIPC) modifies plasma proteome in humans. *PLoS One.* 2012; 7(11):e48284

-
- 93- B. Tota, A.M. Quintieri, T. Angelone. The emerging role of nitrite as an endogenous modulator and therapeutic agent of cardiovascular function. *Curr Med Chem* 2010; 17:1915-25.
- 94- Xiao L, Lu R, Hu CP, Deng HW, Li YJ. Delayed cardioprotection by intestinal preconditioning is mediated by calcitonin gene-related peptide. *Eur J Pharmacol* 2001; 427:131–135.
- 95- Petrishchev NN, Vlasov TD, Sipovsky VG, Kurapeev DI, Galagudza MM. Does nitric oxide generation contribute to the mechanism of remote ischemic preconditioning? *Pathophysiology* 2001; 7:271-274.
- 96- Rassaf T, Totzeck M, Hendgen-Cotta UB, Shiva S, Heusch G, Kelm M. Circulating nitrite contributes to cardioprotection by remote ischemic preconditioning. *Circ Res.* 2014; 114(10):1601-10.
- 97- Yellon DM, Downey JM. Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. *Physiol Rev* 2003; 83:1113–1151.
- 98- Rodeberg DA, Chaet MS, Bass RC, Arkovitz MS, Garcia VF. Nitric oxide: an overview. *Am J Surg.* 1995;170(3):292-303.
- 99- Fenton KN, Heinemann MK, Hanley FL. Exclusion of the placenta during fetal cardiac bypass augments systemic flow and provides important information about the mechanism of placental injury. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993; 105:502-12.
- 100- Hawkins JA, Clark SM, Shaddy RE, Gay WA Jr. Fetal cardiac bypass: improved placental function with moderately high flow rates. *Ann Thorac Surg* 1994; 57:293-7.

-
- 101- Bradley SM, Hanley FL, Duncan BW, Jennings RW, Jester JA, Harrison MR, et al. Fetal cardiac bypass alters regional blood flows, arterial blood gases, and hemodynamics in sheep. *Am J Physiol* 1992; 263:H919-28.
- 102- Kottenberg E, Musiolik J, Thielmann M, Jakob H, Peters J, Heusch G. Interference of propofol with signal transducer and activator of transcription 5 activation and cardioprotection by remote ischemic preconditioning during coronary artery bypass grafting. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2014; 147(1):376-82.
- 103- Redmond JM, Gillinov AM, Stuart RS, Zehr KJ, Winkelstein JA, Herskowitz A, et al. Heparin-coated bypass circuits reduce pulmonary injury. *Ann Thorac Surg* 1993; 56:474-79.
- 104- Ranucci M, Cirri S, Conti D, Ditta A, Boncilli A, Frigiola A, et al. Beneficial effects of Duraflo II heparin-coated circuits on postperfusion lung dysfunction. *Ann Thorac Surg* 1996; 61(1):76-81.
- 105- Cannon JW, Howe RD, Dupont PE, Triedman JK, Marx GR, del Nido PJ. Application of robotics in congenital cardiac surgery. *Semin Thorac Cardiovasc Surg Pediatr Card Surg Annu.* 2003; 6:72-83.
- 106- Sinha CK, Haddad M. Robot-assisted surgery in children: current status. *J Robot Surg.* 2008; 1(4):243-6.