

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA

VALDANO MATEUS CORREIA OSÓRIO MANUEL

**Expressão miocárdica tecidual de mRNA e o índice neutrófilos-linfócitos
pré-operatório em crianças com cardiopatia congênita submetidas à
correção cirúrgica**

São Paulo

2024



VALDANO MATEUS CORREIA OSÓRIO MANUEL

**Expressão miocárdica tecidual de mRNA e o índice neutrófilos-linfócitos
pré-operatório em crianças com cardiopatia congênita submetidas à
correção cirúrgica**

Versão Original

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. Marcelo Biscegli Jatene

São Paulo

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Manuel, Valdano Mateus Correia Osório
Expressão miocárdica tecidual de mRNA e o índice
neutrófilos-linfócitos pré-operatório em crianças com
cardiopatias congênitas submetidas à correção cirúrgica /
Valdano Mateus Correia Osório Manuel; Marcelo Biscegli
Jatene, orientador. -- São Paulo, 2024.

Tese (Doutorado) -- Programa de Cirurgia Torácica e
Cardiovascular. Faculdade de Medicina da Universidade de
São Paulo, 2024.

1.Índice neutrófilos-linfócitos 2.mRNA 3.Biomarcadores
4.Cirurgia cardíaca 5.Tetralogia de Fallot 6.Comunicação
interventricular I.Jatene, Marcelo Biscegli, orient. II.Título

USP/FM/DBD-013/24

Responsável: Daniela Amaral Barbosa, CRB-8 7533

*À minha amada mãe, Preciosa Correia Bizerra Ginge Chifuche,
por ter investido tudo e mais alguma coisa para que eu me tornasse uma
pessoa útil para a sociedade.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por me orientar sempre em TUDO: situações e tomadas de decisões difíceis; especialmente, pelos *insights* na condução dessa pesquisa.

A meu Orientador, Prof. Dr. Marcelo Biscegli Jatene, primeiro, por ter me aceitado como aluno, segundo, por ter aceitado o desafio de estudarmos um assunto não tão comum para a maioria dos cirurgiões e, em terceiro, pela paciência durante todas as fases da pesquisa.

Ao Dr. Leonardo Augusto Miana, que, além de coorientar a pesquisa, abraçou essa linha de pesquisa; pela cumplicidade e parceria durante todo esse período.

Ao Prof. Dr. José Eduardo Krieger, por ter abraçado o projeto e pelo suporte intelectual, e por ter coordenado toda a parte da pesquisa laboratorial.

Às colegas do Laboratório de Cardiologia Genética e Molecular, principalmente, às Dras. Miriam Helena Fonseca Alaniz e Mariana de Carvalho, por todo o suporte técnico e científico.

Aos Drs. Gabriel Carrillo Hernan, Davi Tenório, Celestino Bado, Matheus Meirelles, João Paulo Mota Telles, Luciana Patrick Amato, Aida Luiza Ribeiro Turquetto, Juliano Gomes Penha, Natália Fernandes, Maria Raquel Brigoni Massoti, Carla Tanamati, Luiz Fernando Caneo, pela aquisição dos dados ou por facilitarem a aquisição desses e seu tratamento.

Aos Drs. Adilson de Oliveira e Feliciano Paquissi, pelas diversas discussões em torno do tema e a suas contribuições intelectuais.

À enfermeira Rosana do GOPA, pela parceria na identificação dos pacientes.

Ao Dr. Vasco Sabino da Silva; à Ministra da Saúde de Angola, Dra. Sílvia Lutucuta, e ao Dr. Carlos Alberto Masseca, pelas diversas dispensas e pelo apoio moral e financeiro para fazer algumas disciplinas e realizar a pesquisa.

À minha família, Aurora, Rosa, Esmeralda, Alberto, Quésia, Queiser e o Quiami, pelo amor e suporte incondicional de sempre.

Aos meus amigos e colegas, pelas coberturas, que, mesmo estando ausente da vida de vocês, sempre estiveram de prontidão.

À minha noiva, Sandra Gomes, pela paciência, pelo amor, por suportar a ausência, pelos desabafos, e por assistir às aulas comigo e muito mais.

Finalmente, aos pacientes e familiares, por aceitarem participar dessa pesquisa que busca dar resposta a questões ainda não estudadas. Muito obrigado.

*“Se eu tivesse oito horas para derrubar uma árvore,
passaria seis afiando o meu machado.”*

Abraham Lincoln

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

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

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

Universidade de São Paulo. *Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP: parte IV (Vancouver) / Sistema Integrado de Bibliotecas da USP*; Vânia Martins Bueno de Oliveira Funaro, coordenadora; Maria Claudia Pestana; Maria Cristina Cavarette Dziabas; Eliana Maria Garcia; Maria Fatima dos Santos, Maria Marta Nascimento; Suely Campos Cardoso. 3a ed. ed. amp. mod. São Paulo: SIBI/USP. 2016. (Caderno de estudos).

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

RESUMO

Manuel VMCO. Expressão miocárdica tecidual de mRNA e o índice neutrófilos-linfócitos pré-operatório em crianças com cardiopatia congênita submetidas à correção cirúrgica [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2024.

Introdução: O índice neutrófilos-linfócitos (INL) tem sido apresentado como um biomarcador de baixo custo e de fácil acesso, podendo prever morbidade e mortalidade em crianças cianóticas submetidas à cirurgia cardíaca. O mecanismo de regulação do INL ainda é desconhecido. Que seja do nosso conhecimento, não há estudos demonstrando a regulação do INL nessa população. **Objetivo:** Comparar e correlacionar o mRNA TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 em biópsia do miocárdio com o INL em sangue periférico de pacientes com tetralogia de Fallot (TF) e com comunicação interventricular (CIV). **Metodologia:** Estudo translacional realizado no Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (São Paulo, Brasil) que incluiu 10 crianças com TF e 10 com CIV maiores de 1 mês e menores de 2 anos de idade. O INL foi calculado a partir do hemograma realizado 24h antes da cirurgia. A expressão do mRNA TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 foi analisada em biópsias do átrio direito antes do início da circulação extracorpórea. Foram excluídos todos os pacientes com TF com saturação de O₂ (SaO₂) >90%, TF ou CIV que não foram submetidos à correção total, às reoperações e às CIVs com hipertensão pulmonar fixa, pacientes com suspeita ou confirmação de infecção, ou que tenham qualquer doença imunológica ou síndrome genética comprovada. **Resultados:** O INL foi mais alto nos pacientes com TF em comparação aos pacientes com CIV [TF: 0.46 (AIQ: 0.90); CIV: 0.28 (AIQ: 0.17); p=0.02] e observou-se correlação positiva entre os níveis de INL e de SaO₂ (r=0.44; p=0.001). Os pacientes com TF em comparação aos pacientes com CIV tiveram maior tempo de ventilação mecânica [TF: 24h (AIQ: 93); CIV: 5.5 (AIQ: 8); p<0.001], maior uso de drogas vasoativas [TF: 2 (AIQ: 1.75); CIV: 0 (AIQ: 1); p=0.01], mais tempo na unidade de cuidados intensivos [TF: 5.5 (AIQ: 1); CIV: 0 (AIQ: 1); p=0.02] e mais tempo de internação hospitalar [TF: 18 (AIQ: 17.5); CIV: 8.5 (IQR: 2.5); p<0.001]. Relativamente ao mRNA, a diferença entre os grupos foi a menor expressão da IL-10-mRNA no grupo TF (p=0.03). Em relação à correlação, foi positiva entre a IL-10-mRNA e a SaO₂ (r=0.40; p=0.07), e negativa com o INL (r=-0.27; p>0.05). **Conclusão:** Pacientes com TF tiveram INL pré-operatório mais alto e tiveram pior prognóstico. Não houve diferença entre os grupos em relação à expressão do mRNA TNF- α , IL-1 β e IL-6. Houve maior expressão do mRNA L-10 no grupo TF.

Descritores: Índice neutrófilos-linfócitos. mRNA; Biomarcadores. Cirurgia cardíaca. Tetralogia de Fallot. Comunicação interventricular.

ABSTRACT

Manuel VMCO. Myocardial tissue expression. of mRNA and preoperative neutrophil-lymphocyte ratio in children undergoing congenital heart surgery [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2024.

Introduction: The neutrophil-lymphocyte ratio (NLR) has been presented as a low-cost and easily accessible biomarker that can predict morbidity and mortality in cyanotic children undergoing cardiac surgery. The regulation mechanism of NLR is still unknown. To our knowledge, there are no studies demonstrating the regulation of NLR in this population. **Objective:** To compare and correlate cytokine-mRNA TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-10 in myocardial biopsy with NLR in peripheral blood from patients with tetralogy of Fallot (ToF) and ventricular septal defect (VSD). **Method:** Translational study carried out at Instituto do Coração, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (São Paulo, Brazil), which included 10 children with ToF and 10 with VSD older than 1 month and younger than 2 years old. The NLR was calculated from the blood count performed 24 hours before surgery. The expression of the cytokine-mRNA TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-10 was analyzed in biopsies of the right atrium before the cardiopulmonary bypass. All patients with ToF with O₂ saturation (SaO₂) >90%, ToF or VSD who did not undergo total correction, reoperations and VSDs with fixed pulmonary hypertension, patients with suspected or confirmed infection, or who had any proven genetic immunological or syndromic disease. **Results:** NLR was higher in patients with ToF compared to patients with VSD [ToF: 0.46 (IQR: 0.90); VSD: 0.28 (IQR: 0.17); p=0.02] and a moderate positive correlation was observed between NLR and SaO₂ levels (r=0.44; p=0.001). Patients with ToF compared to patients with VSD had a longer duration of mechanical ventilation [ToF: 24h (IQR: 93); CIV: 5.5 (IQR: 8); p<0.001], greater use of vasoactive drugs [ToF: 2 (IQR: 1.75); VSD: 0 (IQR: 1); p=0.01], long intensive care unit length of stay [ToF: 5.5 (IQR: 1); VSD: 0 (IQR: 1); p=0.02] and longer hospital length of stay [ToF: 18 (IQR: 17.5); VSD: 8.5 (IQR: 2.5); p<0.001]. Regarding cytokine-mRNA, the difference between groups was the lower expression of IL-10-mRNA in the TF group (p=0.03). Regarding the correlation, it was moderately positive between IL-10-mRNA and SaO₂ (r=0.40; p=0.07) and weakly negative with INL (r=-0.27; p>0.05). **Conclusion:** Patients with TF had higher preoperative NLR and had worse prognosis. There was no difference between groups regarding the expression of pro-inflammatory cytokine-mRNA. The anti-inflammatory cytokine-mRNA (IL-10) was less expressed in the ToF group.

Descriptors: Neutrophil-lymphocyte ratio. mRNA. Biomarkers. Cardiac surgery. Tetralogy of Fallot. Ventricular septal defect.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Demonstração do cálculo amostral	23
Figura 2 -	Fluxograma para a seleção dos 20 pacientes incluídos na análise final	31
Figura 3 -	Gráfico de regressão linear simples ajustada para INL e a SaO ₂ com $r = 0.44$ ($p=0.002$).....	34
Figura 4 -	Expressão tecidual miocárdica de mRNA do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α).....	35
Figura 5 -	Mostra uma correlação negativa entre a IL-1-mRNA e o INL ($p>0.05$).....	35
Figura 6 -	Correlação entre o nível de SaO ₂ com a expressão tecidual do mRNA	36
Figura 7 -	Representação esquemática do provável mecanismo de regulação pré-operatória do INL em pacientes cianóticos submetidos à correção cirúrgica	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Características basal dos 10 pacientes com TF e dos 10 com CIV submetidos à correção cirúrgica.....	32
Tabela 2 -	Dados intraoperatórios dos 10 pacientes com TF e dos 10 com CIV submetidos à correção cirúrgica.....	32
Tabela 3 -	Dados pós-operatório dos 10 pacientes com TF e dos 10 com CIV submetidos à correção cirúrgica.....	33

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

α	Alfa
β	Beta
AIQ ou IQR	Amplitude Interquartil ou Interquartil Range
CC	cardiopatia Congênita
CEC	Circulação Extracorpórea
CIV	Comunicação Interventricular
DVA	Drogas Vasoativas
ECMO	<i>Extracorporeal Membrane Oxigenation</i>
IL	Interleucina
InCor HCFMUSP	Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
INL	Índice Neutrófilos-Linfócitos
IRA	Insuficiência Renal Aguda
miRNA	Micro Ácido Ribonucleico
mRNA	Ácido Ribonucleico Mensageiro
PIIIP	Peptídeo Pró-Colágeno Tipo III do Terminal Amino
SaO ₂	Nível de Saturação de Oxigênio
SBCCV	Sociedade Brasileira de Cirurgia Cardiovascular
SBCEC	Sociedade Brasileira de Circulação Extra Corpórea
SBDC	Síndrome de Baixo Débito Cardíaco
SRIS	Síndrome de Resposta Inflamatória Sistêmica
TF	Tetralogia de Fallot
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VIS	<i>Vasoactive Inotropic Score</i>
VM	Ventilação Mecânica

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	HIPÓTESE.....	18
3	OBJETIVOS	20
3.1	OBJETIVO GERAL.....	20
3.2	OBJETIVO ESPECÍFICO	20
4	METODOLOGIA	22
4.1	LOCAL DO ESTUDO	22
4.2	TIPO DE ESTUDO	22
4.3	POPULAÇÃO DE ESTUDO	22
4.4	TAMANHO AMOSTRAL.....	22
4.5	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	23
4.6	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	23
4.7	IMPLICAÇÕES ÉTICAS	24
4.8	COLETA DE DADOS	24
4.9	VARIÁVEIS DE ESTUDO	24
4.10	DETALHES TÉCNICOS.....	25
5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	29
6	RESULTADOS.....	31
7	DISCUSSÃO	39
8	CONCLUSÃO	44
9	LIMITAÇÕES.....	46
10	FINANCIAMENTO	48
11	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	50
	REFERÊNCIAS.....	52
	ANEXOS.....	57
	ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	57
	ANEXO B - APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA	59
	ANEXO C - DECLARAÇÃO DE CUSTOS	62

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O processo inflamatório está presente em todos os procedimentos cirúrgicos e é parte da resposta fisiológica ao trauma¹⁻⁵. No entanto, em cirurgias de grande porte, como as com circulação extracorpórea (CEC), pela conversão de fluxo pulsátil para laminar, cardioplegia fria, trauma cirúrgico, endotoxemia, lesão de isquemia-reperfusão, estresse oxidativo, hipotermia e ativação de células por contato pelo circuito extracorpóreo. Cascatas inflamatórias redundantes e sobrepostas amplificam a resposta inicial para produzir uma resposta inflamatória sistêmica, esta resposta inflamatória pode ser exacerbada, tornando-se patológica e ocasionando complicações no pós-operatório⁶⁻¹⁰.

A resposta inflamatória após a CEC é multifatorial, e pode tornar-se generalizada e descontrolada, levando à síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SRIS)^{6,10}. A fase “precoc” é iniciada pelo contato do sangue com células não endoteliais do circuito de CEC e, no final, envolve constituintes humorais e celulares do sistema imunológico. A fase “tardia” que perpetua as cascatas inflamatórias é caracterizada por lesão de isquemia-reperfusão, endotoxemia, coagulopatia e reações do complexo heparina-protamina^{10, 11}. A ligação entre inflamação, coagulação e fibrinolítica cascatas é complexa, e pode ser parcialmente explicada pela fase aguda com reações durante a CEC semelhantes às observadas na sepse¹⁰⁻¹². Outro link pode ser o fator nuclear kappa B (NFκB), onipresente e fator de transcrição indutível que está implicado durante todas as fases da resposta, mas desempenha um papel central na regulação de genes pró-inflamatórios durante a reação de fase aguda⁶⁻¹².

Alguns fatores de risco para a exacerbação da resposta inflamatória já são bem conhecidos, como a hipóxia extrema, tempo de CEC prolongado, tempo de isquemia miocárdica longo, disfunção hepática pré-operatória, condição inflamatória pré-operatória (leucocitose maior que 15.000) e baixo peso^{9,13}. Esta exacerbação da resposta inflamatória tem efeito deletério no coração (inotropismo negativo), pulmão (insuficiência respiratória), rim (insuficiência ou injúria renal aguda), fígado (insuficiência hepática) e vasos (disfunção endotelial), podendo evoluir com disfunção múltipla de órgãos, aumentando o tempo de ventilação mecânica (VM), o uso de terapia de substituição renal, o uso de drogas vasoativas, o tempo de estadia na unidade de terapia intensiva (UTI) e o tempo total de internação hospitalar, impactando, consequentemente, na mortalidade e no custo da cirurgia⁵. Poder identificar precocemente os pacientes com maior risco de exacerbação da resposta inflamatória é, com certeza, de grande valia.

Em pacientes com cardiopatia congênita (CC), o shunt direito-esquerdo, e, portanto, cianose, têm sido apontados como um fator de risco independente para desenvolvimento de SRIS em cirurgias com CEC⁹⁻¹⁴. Alguns estudos têm demonstrado associação entre mediadores inflamatórios, e aumento da morbidade e mortalidade em pacientes cianóticos quando comparados com os acianóticos¹⁴⁻¹⁷. Biomarcadores altamente específicos e com alto custo, como as citocinas, o microRNA (miRNA), o mRNA (RNA mensageiro), peptídeo pro-colágeno tipo III do terminal amino (PIIIP) e peptídeo natriurético do tipo B (BNP)/proBNP N-terminal, já foram medidos no pré e/ou pós-operatório de CC e demonstraram ter associação com pior desfecho¹⁴⁻²².

Em um estudo feito com biópsia de miocárdio de átrio e ventrículo direito comparando a concentração de citocina de 7 pacientes com tetralogia de Fallot (TF) e de 8 com comunicação interventricular (CIV), foi observado que a TNF- α , IL-1 β , e a IL-6 estavam aumentadas nos pacientes com TF¹⁵.

Os pacientes submetidos à CEC demonstraram expressão aumentada de mRNA de leucócitos não apenas para citocinas pró-inflamatórias, CAMs (isto é, molécula de adesão celular endotelial plaquetária – PECAM), mas, também, para IL-10 e hemeoxigenase-1²³. Alterações ao nível do mRNA em monócitos de pacientes submetidos a CABG também foram avaliados revelando regulação positiva dos genes IL-6 e IL-8, com pico no final do procedimento e caindo para valores basais 24 horas de pós-operatório em outro estudo²⁴.

Nos últimos cinco anos, foi demonstrado o valor prognóstico do índice neutrófilos-linfócitos (INL) pré e pós-operatório em crianças submetidas à cirurgia cardíaca congênita, foi constatado que pacientes com o INL aumentado tiveram pior prognóstico, principalmente os pacientes cianóticos. O INL é definido como uma razão entre a contagem absoluta dos neutrófilos e a contagem total dos linfócitos. A maioria dos estudos é retrospectiva e incluiu apenas pacientes cianóticos^{14,18-22,25-27}. Um dos maiores incluiu 141 pacientes cianóticos submetidos à cirurgia de Glenn com o uso da CEC, foi avaliado o INL pré-operatório como biomarcador prognóstico e foi observado que um INL elevado (>2) estava associado a piores resultados em pacientes com fisiologia de VS submetidos à cirurgia de Glenn bidirecional¹⁸. Um dos poucos estudos prospectivos incluiu apenas 47 crianças com diferentes cardiopatias congênitas e o INL foi analisado no pré e no pós-operatório demonstrando associação com desfechos desfavoráveis²¹. Resultados similares em relação à mortalidade, à síndrome de baixo débito cardíaco, à insuficiência hepática, à insuficiência renal, à vasoplegia, a complicações pulmonares e a outras variáveis, mas notando-se a diferença no valor do INL, foram observados em diferentes estudos^{14,18-22}.

Esse biomarcador, além de barato e de fácil acesso, parece promissor, porém o seu mecanismo de regulação/patogenia ainda é desconhecido^{14,18-22}. Todos os estudos prévios reportaram apenas o seu potencial como um biomarcador e não explicam o provável mecanismo de regulação/patogenia desse, além de que seria muito difícil pela natureza do desenho desses. Até o momento, não existem estudos publicados buscando demonstrar o mecanismo de regulação do INL pré-operatório em pacientes com CC. Por isso, nos propusemos a estudar o comportamento desse biomarcador dos dois grupos de CC, TF e CIV, submetidos à correção total comparando o INL pré-operatório e analisando a sua correlação com a expressão do mRNA do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-1 beta (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6) e a interleucina-10 (IL-10) no miocárdio desses pacientes. Sabemos que o mecanismo é complexo, porém esse é o primeiro passo dado nessa direção.

2 HIPÓTESE

2 HIPÓTESE

A nossa hipótese é que existe correlação entre o INL pré-operatório em sangue periférico e o mRNA TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10, e que existe maior expressão desses biomarcadores inflamatórios nos pacientes com TF comparando com os pacientes com CIV.

3 OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Correlacionar e comparar a expressão do mRNA TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 em biópsia de miocárdio, e o índice neutrófilos-linfócitos pré-operatório em sangue periférico como biomarcadores prognósticos em pacientes com TF e pacientes com CIV submetidos à correção cirúrgica.

3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Analisar a associação entre o INL pré-operatório e desfechos clínicos pós-operatórios como o tempo de ventilação mecânica, uso de drogas vasoativas, insuficiência renal aguda, síndrome de baixo débito, tempo de permanência em UTI, tempo de permanência hospitalar e mortalidade.

4 METODOLOGIA

4 METODOLOGIA

4.1 LOCAL DO ESTUDO

O estudo foi realizado no Serviço de Cirurgia Cardiovascular Infantil da Divisão de Cirurgia Cardiovascular, e no Laboratório de Cardiologia Molecular e Genética, ambos do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (InCor HCFMUSP), São Paulo, SP - Brasil.

4.2 TIPO DE ESTUDO

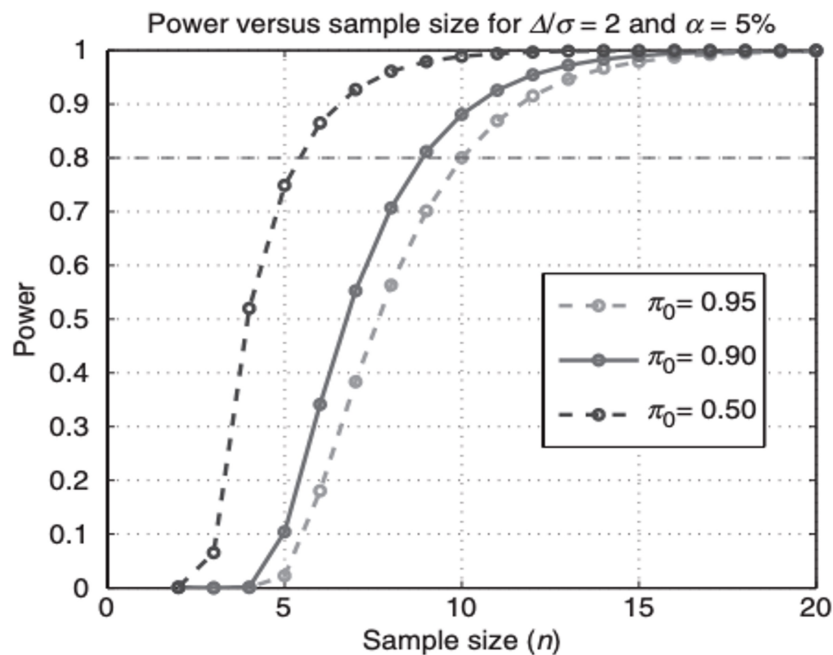
Pesquisa translacional prospectiva observacional.

4.3 POPULAÇÃO DE ESTUDO

Pacientes cianóticos com diagnóstico de tetralogia de Fallot (TF) e os pacientes acianóticos com diagnóstico de comunicação interventricular (CIV) que foram submetidos à correção cirúrgica.

4.4 TAMANHO AMOSTRAL

O tamanho e o poder estatístico da amostra foram definidos baseando-se no “Quick calculation for sample size while controlling false discovery rate with application to microarray analysis” que foi voltado para biologia molecular e não em desfechos clínicos, porque foi usado o microarray, que é uma ferramenta de laboratório usada para detectar a expressão de milhares de genes ao mesmo tempo²³, em que se define que, para se detectar diferenças entre dois grupos de, pelo menos, 2 vezes na expressão do gene e uma taxa de genes não diferencialmente expressos com confiabilidade de 95% e com um poder estatístico desejado de 80% (d de Cohen de 0.8) com um erro alfa de 0.05, seriam necessários 09 pacientes em cada um dos grupos (Figura 1).

Figura 1 - Demonstração do cálculo amostral

Fonte: Liu P, Hwang JT, 2007²⁸.

4.5 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Todos os pacientes independentemente do gênero ou raça e com idades entre 01 e 24 meses de vida cujo diagnóstico é TF ou CIV e que foram submetidos à cirurgia corretiva no período de estudo.

4.6 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

1. Pacientes com diagnóstico de TF ou de CIV com idades menores que 30 dias ou maiores que 24 meses;
2. Pacientes com diagnóstico de TF ou CIV que foram submetidos à correção total, porém com cirurgia cardíaca prévia (reoperação);
3. Pacientes com diagnóstico morfológico de TF, porém sem episódios de cianose descritos ou referidos e com a saturação acima de 90% medida por oximetria de pulso (Fallots rosados);
4. Pacientes com TF ou CIV que não seriam submetidos à correção total;
5. Pacientes com CIV e hipertensão pulmonar fixa;

6. Todos os pacientes com suspeita ou comprovação de qualquer tipo de infecção ou em uso de antibiótico;
7. Todos os pacientes que precisaram de ECMO no pré-operatório;
8. Pacientes submetidos à intubação oro ou nasotraqueal antes da cirurgia.
9. Pacientes que não tiveram um hemograma pré-operatório feito em até 24h antes da cirurgia;
10. Pacientes com alguma doença imunológica comprovada ou tomando imunossupressor;
11. Qualquer paciente com síndrome genética comprovada.

4.7 IMPLICAÇÕES ÉTICAS

1. Só foram incluídos na pesquisa os pacientes que concordaram essa, após prévia explicação, e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo A);
2. Foram preservados os dados confidenciais dos pacientes, não sendo permitida a identificação desses em nenhuma das etapas da investigação;
3. O trabalho só teve início após a aprovação pela Comissão Científica e pelo Comitê de Ética da Instituição (SDC: 5188/20/217 - Anexo B).

4.8 COLETA DE DADOS

Foram feitas biópsias de modo prospectivo e de forma consecutiva e sequencial nos pacientes que cumpriram os critérios de inclusão, de acordo com a programação cirúrgica do período de estudo. As biópsias foram realizadas antes do início da CEC para evitar um fator inflamatório de confusão (síntese de biomarcadores inflamatório), desse modo, tivemos o miocárdio em condições inflamatórias similares às do momento da coleta do sangue para a realização do INL. De modo retrospectivo, coletamos no prontuário eletrônico os dados demográficos, clínicos e dados referente ao hemograma 24 horas antes da cirurgia.

4.9 VARIÁVEIS DE ESTUDO

As variáveis pré-operatórias foram: idade (meses), sexo, peso (kg) no momento da cirurgia, saturação de oxigênio (%), e contagem total de neutrófilos e linfócitos obtidos pelas amostras de sangue periférico coletadas na véspera da cirurgia, para o cálculo do INL.

As variáveis intraoperatórias foram: tempo de CEC, tempo de isquemia miocárdica, outros procedimentos associados realizados na mesma cirurgia, lactato na sala operatória e a quantidade de drogas vasoativas calculada pelo *vasoactive inotropic score* (VIS).

A biópsia foi feita no átrio direito após confecção de sutura em bolsa para canulação (antes da entrada em CEC).

No pós-operatório, observamos: tempo (em horas) de ventilação mecânica (VM), dias de uso de drogas vasoativas (DVA), VIS 24h, insuficiência renal aguda (IRA), síndrome de baixo débito, tempo total de permanência na unidade de terapia intensiva (UTI), tempo total de permanência hospitalar (tempo de internação) e o seguimento até a alta ou em 30 dias.

Foi analisada a expressão gênica tecidual das TNF- α -mRNA, IL-1 β -mRNA de IL-6-mRNA e da IL-10-mRNA.

O desfecho primário foi: comparar e correlacionar a atividade inflamatória pelo mRNA em biópsia do miocárdio e o INL no sangue periférico (buscando entender o mecanismo de regulação o INL).

Os desfechos secundários foram: tempo VM, VIS score, IRA, tempo de internação na UTI pós-operatória, tempo total de permanência hospitalar e dados do seguimento.

4.10 DETALHES TÉCNICOS

Manejo anestésico: Foi feito de acordo com a rotina do serviço que está descrita no Manual de Rotinas de Conduas em Anestesia Cardíaca Pediátrica do Incor - HCFMUSP²⁹.

Circulação Extracorpórea (CEC): Foi feita de acordo com as diretrizes publicadas no “The Brazilian Society for Cardiovascular Surgery (SBCCV) and Brazilian Society for Extracorporeal Circulation (SBCEC) Standards and Guidelines for Perfusion Practice” que é a rotina do serviço³⁰.

Cirurgia: Todas as cirurgias foram realizadas por 04 cirurgiões seniores do serviço. O acesso foi por esternotomia mediana e com a instalação do circuito de CEC.

Cardioplegia: A proteção miocárdica foi feita de forma anterógrada usando a solução de Del Nido a 4° C na raiz da aorta em todos os pacientes.

Biópsia: Após anestesia geral e balanceada, intubação orotraqueal, assepsia e antissepsia, e a colocação de campos estéreis, foi realizada a incisão, esternotomia e a revisão cuidadosa da hemostasia. Em seguida, foi feita a timectomia parcial ou total conforme necessidade para abordagem do coração. Foi feita a pericardiotomia como de rotina e fixação do pericárdio com pontos separados no campo cirúrgico para melhor exposição. Foi feita uma sutura em bolsa na aurícula do átrio direito e feita a heparinização do paciente conforme o peso (1 mg/kg) utilizando o cateter central, sem puncionar o átrio direito. Foi realizado o clampeamento lateral da aurícula e, em seguida, uma biópsia nos limites da sutura em bolsa (2-3 mm). O sangramento era evitado apertando o torniquete na sutura em bolsa. As biópsias foram realizadas antes do início da CEC para evitar um fator inflamatório de confusão (síntese de biomarcadores inflamatório), desse modo, tivemos o miocárdio em condições inflamatórias similares às do momento da coleta do sangue para a realização do INL.

O fragmento da biópsia era separado e colocado em um frasco com a solução tampão e enviado para o laboratório (LGCM). Enquanto estivesse no centro cirúrgico, era conservado em temperatura ambiente, no laboratório, era conservada em uma temperatura de 4° Celsius por 24 horas e, depois, no ultrafreezer, a -80° Celsius para armazenamento.

Extração de RNA e qPCR em tempo real após transcrição reversa (qRT-PCR): Os fragmentos de biópsia do átrio direito foram coletados em frasco com RNAlater (*Thermo Fisher Scientific*, MA, EUA) e armazenados em ultrafreezer -80°C até o momento da extração de RNA. O RNA total foi extraído com Trizol (*Thermo Fisher Scientific*, MA, EUA) e transcrito reversamente em cDNA usando kit de síntese de cDNA (*Thermo Fisher Scientific*, MA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Os níveis de expressão de mRNA-alvo foram quantificados usando qRT-PCR com reagentes SYBR Green (*Thermo Fisher Scientific*, MA, EUA) e primers específicos para IL-1 β , IL-10, IL-6, TNF- α e ciclofilina. Todas as amostras foram analisadas em triplicata. O gene da ciclofilina foi utilizado para normalizar os resultados e os níveis de expressão gênica foram calculados de acordo com o método de $\Delta\Delta CT$. O mRNA foi expresso em unidades arbitrárias relativas à expressão do controle. A amostra foi normalizada para o controle igual a 1.

Definição de variáveis:

Índice neutrófilos-linfócitos (INL): Definido como uma razão entre a contagem absoluta dos neutrófilos e a contagem total dos linfócitos.

Hipoxia: Definida como saturação de oxigênio aferida com oximetria de pulso menor ou igual a 90%.

IRA: foi definida de acordo com a definição da *Acute Kidney Injury Network* (AKIN group). Um aumento no nível de creatinina sérica em relação ao valor basal pode ser usado para classificar a IRA de acordo com o grau de aumento (I, II ou III).

SBDC: foi considerada uma condição clínica causada por uma diminuição transitória da perfusão sistêmica secundária à disfunção miocárdica.

O tempo de VM: foi definido como o tempo (horas) entre a intubação orotraqueal e a extubação. Os critérios para extubação dependeram do quadro clínico do paciente.

Mortalidade operatória: Foi definida como todos os óbitos, independentemente da causa, ocorridos durante a internação ou em até 30 dias após a cirurgia se a alta for antes deste período.

Seguimento: Durante a internação ou até após 30 dias da cirurgia se a alta for antes deste período.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

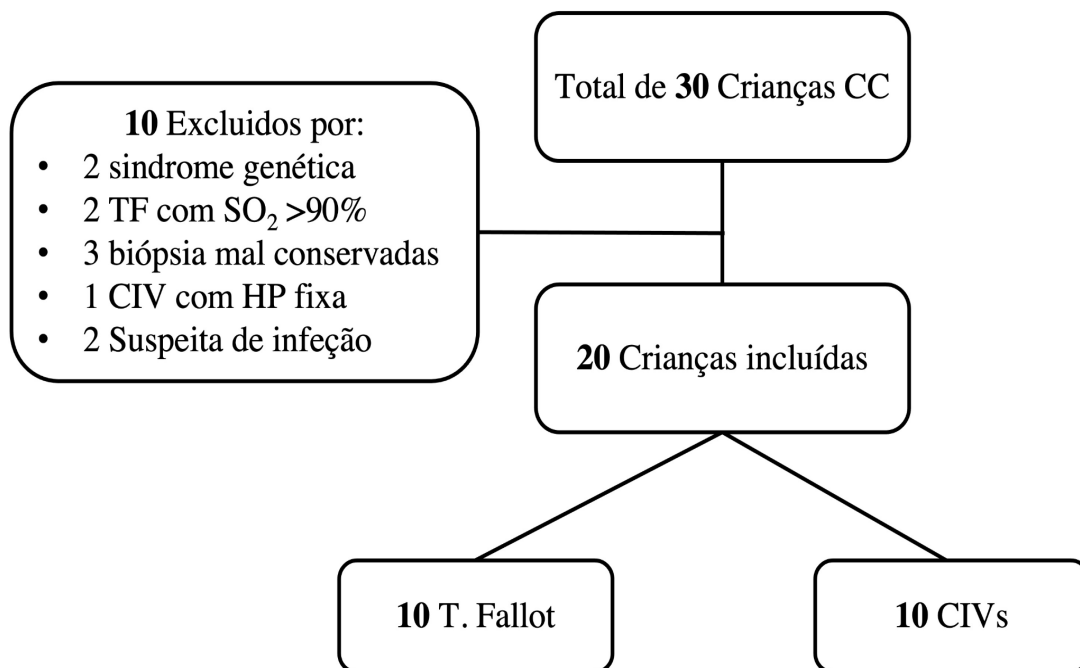
Foi feita estatística descritiva padrão. As variáveis numéricas contínuas estão apresentadas em média (desvio padrão) ou mediana e amplitude interquartil (AIQ), de acordo com testes de normalidade. O teste de Mann-Whitney ou t de Student foi utilizado para analisar diferenças entre os grupos, conforme apropriado. Foi feita a regressão linear para ver o comportamento do INL em relação a SaO₂ e à idade. Foi aplicado o modelo de regressão linear para analisar a correlação entre o INL e SaO₂, assim como, a expressão tecidual do IL-1 β , IL-10, IL-6 e TNF- α -mRNA, usando a correlação de Spearman. Os dados foram analisados usando o software IBM SPSS 23.0 (IBM Corp., Armonk, NY, EUA). O gene da ciclofilina foi utilizado para normalizar os resultados e os níveis de expressão gênica foram calculados de acordo com o método de $\Delta\Delta CT$ que é o método de quantificação relativa mais frequentemente encontrado em pacotes de software populares para experimentos qPCR. O mRNA foi expresso em unidades arbitrárias relativas à expressão do controle. A amostra foi normalizada para o controle 1.

6 RESULTADOS

6 RESULTADOS

Foram recrutados um total de 30 pacientes e 20 (10 TF e 10 CIV) foram selecionados para a análise final por preencherem todos os critérios previamente estabelecidos, assim como, pela qualidade das amostras (Figura 2).

Figura 2 - Fluxograma para a seleção dos 20 pacientes incluídos na análise final



Fonte: Produção do autor.

As características demográficas dos 20 pacientes estão apresentadas na Tabela 1. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas em relação ao nível do INL [TF 0.46 (AIQ 0.90); CIV 0.28 (AIQ 0.17); $p = 0.02$] e a SaO_2 [TF 86.2 (± 6.4); CIV 97.7 (± 1.5); $p < 0.001$]. Em todas outras variáveis, não houve diferença entre os grupos.

Tabela 1 - Características basal dos 10 pacientes com TF e dos 10 com CIV submetidos à correção cirúrgica

Variáveis	TF, n = 10	CIV, n = 10	Valor de p
Idade, meses	8.3 ($\pm$ 4.4)	11.8 ($\pm$ 7.3)	0.22
Gênero, feminino (%)	4 (40)	8 (80)	0.17
Peso, Kg	6.8 ($\pm$ 2.0)	6.8 ($\pm$ 1.9)	0.95
Saturação de O ₂ , %	86.2 ($\pm$ 6.4)	97.7 ($\pm$ 1.5)	< 0.001*
Total de neutrófilos	3239.2 ($\pm$ 1732.5)	2268.2 ($\pm$ 1452.6)	0.19
Total de linfócitos	5592.6 ($\pm$ 2575.0)	7977.8 ($\pm$ 3452.0)	0.10
INL	0.46 (AIQ 0.90)	0.28 (AIQ 0.17)	0.02**

*Teste t de student

**Teste de Mann-Whitney

As variáveis com distribuição normal estão apresentadas em média e desvio padrão.

As variáveis com distribuição assimétrica estão apresentadas em mediana e intervalo interquartil.

AIQ = amplitude interquartil; CIV = comunicação interventricular; INL = índice neutrófilos-linfócitos; TF = tetralogia de Fallot. Os resultados numéricos estão expressos em média e DP.

Em relação ao intraoperatório, os grupos diferenciam-se apenas em relação ao tempo médio de circulação extracorpórea [TF 152.8 ($\pm$ 41.3); CIV 116.6 ($\pm$ 30.1); p = 0.04], como se pode observar na Tabela 2.

Tabela 2 - Dados intraoperatórios dos 10 pacientes com TF e dos 10 com CIV submetidos à correção cirúrgica

Variáveis	TF, n = 10	CIV, n = 10	Valor de p
Lactato em SO, mg/dL	14.9 ($\pm$ 8.3)	11.1 ($\pm$ 5.6)	0.25
VIS em SO	13.11 ($\pm$ 8.8)	7.6 ($\pm$ 4.3)	0.10
Tempo de CEC, min	152.8 ($\pm$ 41.3)	116.6 ($\pm$ 30.1)	0.04*
Tempo de isquemia miocárdica, min	100.6 ($\pm$ 39.7)	79.6 ($\pm$ 28.4)	0.19

*Teste t de student

As variáveis com distribuição normal estão apresentadas em média e desvio padrão.

CEC = circulação extracorpórea; CIV = comunicação interventricular; SO = sala operatória; TF = Tetralogia de Fallot; VIS = vasoactive-inotropic score.

No que se refere à avaliação pós-operatória, os pacientes com TF ficaram mais dias em uso de drogas vasoativas [TF 2 (AIQ: 1.75); CIV 0 (AIQ: 1); $p = 0.01$], tempo maior de VM [TF 24h (AIQ: 93); CIV 5.5 (AIQ: 8); $p = <0.001$], maior tempo de permanência na UTI [TF 5.5 (AIQ: 1); CIV 0 (AIQ: 1); $p = 0.02$] e tempo total de internação hospitalar maior [TF 18 (AIQ: 17.5); CIV 8.5 (AIQ: 2.5); $p < 0.001$], Tabela 3.

Tabela 3 - Dados pós-operatório dos 10 pacientes com TF e dos 10 com CIV submetidos à correção cirúrgica

Variáveis	TF, n = 10	CIV, n = 10	Valor de p
VIS em 24h	7.25 (AIQ: 14)	4.45 (AIQ: 7)	0.06
Tempo com DVA, dias	2 (AIQ: 1.75)	0 (AIQ: 1)	0.01*
IRA	3 (30%)	0	0.21
SBDC	3 (30%)	0	0.21
Tempo de VM, horas	24 (AIQ: 93)	5.5 (AIQ: 8)	< 0.001*
Tempo de UTI, dias	5.5 (AIQ: 1)	2 (AIQ: 0.75)	0.02*
Tempo total de internação, dias	18 (AIQ: 17.5)	8.5 (AIQ: 2.5)	< 0.001*
Mortalidade	1 (10%)	0	1.0

*Teste de Mann-Whitney

As variáveis com distribuição normal estão apresentadas em média e desvio padrão.

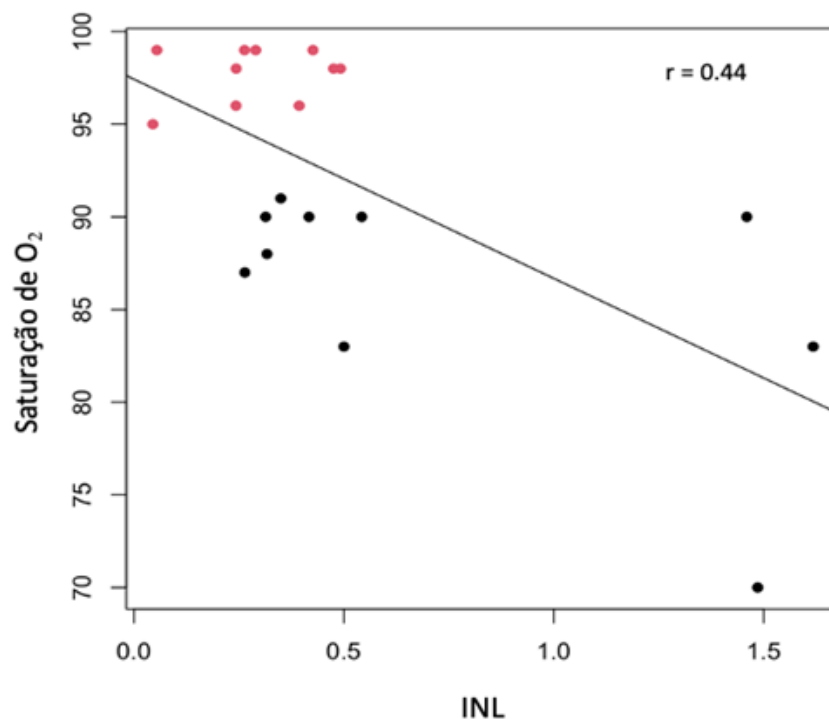
As variáveis com distribuição assimétrica estão apresentadas em mediana e intervalo interquartil.

AIQ = amplitude interquartil; CIV = comunicação interventricular; DVA = droga vasoativa; IRA = insuficiência renal aguda; SBDC = síndrome de baixo débito cardíaco; SO = sala operatória; TF = tetralogia de Fallot; UTI = unidade de terapia intensiva; VIS = vasoactive-inotropic score; VM = ventilação mecânica.

Quando fizemos a regressão linear tendo como variável dependente a SaO_2 e a independente o INL, observamos uma relação que, quanto mais baixa é a SaO_2 , mais alto é o INL ($p = 0.002$), com uma correlação positiva $r = 0.40$.

Essa relação se manteve a mesma depois que ajustamos para a idade, SaO_2 e o INL ($p = 0.002$), mantendo a força da correlação, $r = 0.44$; Figura 3.

Figura 3 - Gráfico de regressão linear simples ajustada para INL e a SaO₂ com $r = 0.44$ ($p=0.002$)



Fonte: Produção do autor.

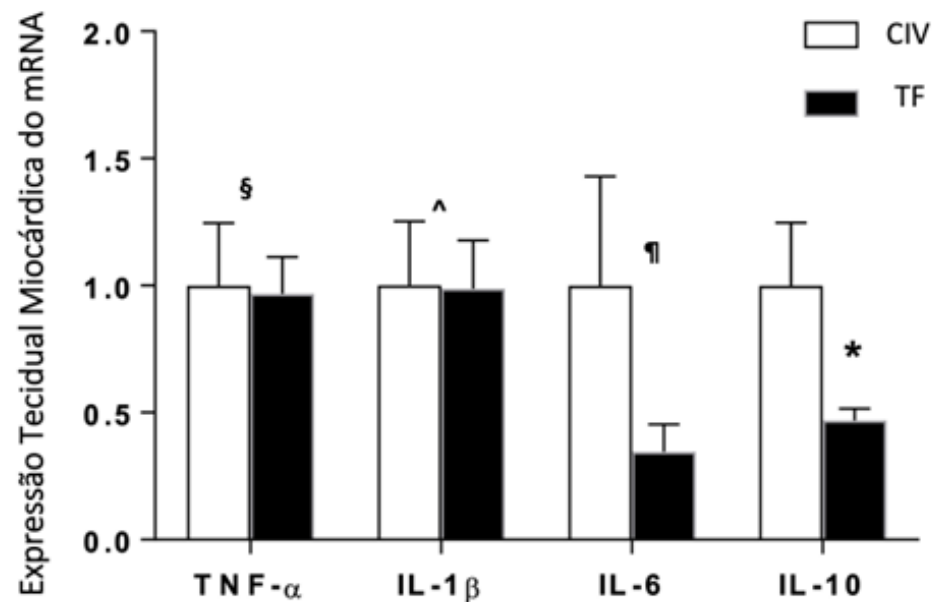
INL: índice neutrófilos-linfócitos e SaO₂: Saturação de oxigênio.

Nota: Pontos vermelhos: Comunicação interventricular e pontos pretos: Tetralogia de Fallot

Análise da expressão miocárdica do mRNA:

Expressão do mRNA no átrio direito: A TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 foram detetados em todos os pacientes com TF. Por outro lado, nas CIVs, a IL-1 β foi detetada em 8 de 10, a TNF- α em 9 de 10, a IL-6 em 9 de 10 e a IL-10 em todos os pacientes.

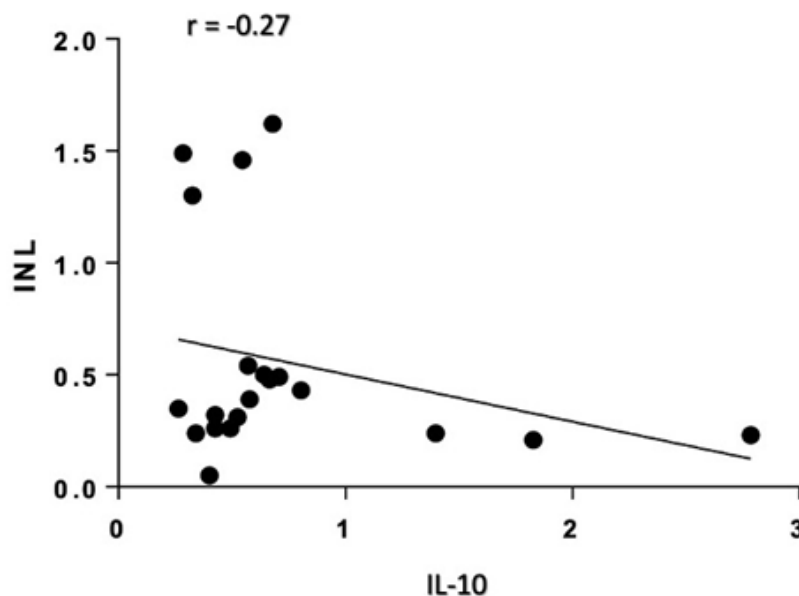
A expressão tecidual do mRNA TNF- α , IL-1 β e IL-6-mRNA foram semelhantes em ambos os grupos com $p>0.05$ (Figura 4). Em contraste, a expressão do mRNA IL-10 foi menor nos pacientes com TF ($p= 0.03$).

Figura 4 - Expressão tecidual miocárdica de mRNA do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)

Fonte: Produção do autor.

Nota: mRNA de interleucina-1-beta (IL-1 β), mRNA de IL-6 e mRNA de IL-10 analisados no miocárdio do átrio direito antes circulação extracorpórea em crianças com tetralogia de Fallot (barra preta) e comunicação interventricular (barra branca). As barras expressam a intensidade do mRNA. §: p=0,79; ^: p=0,76; ¶: p=0,21; *: p=0,03.

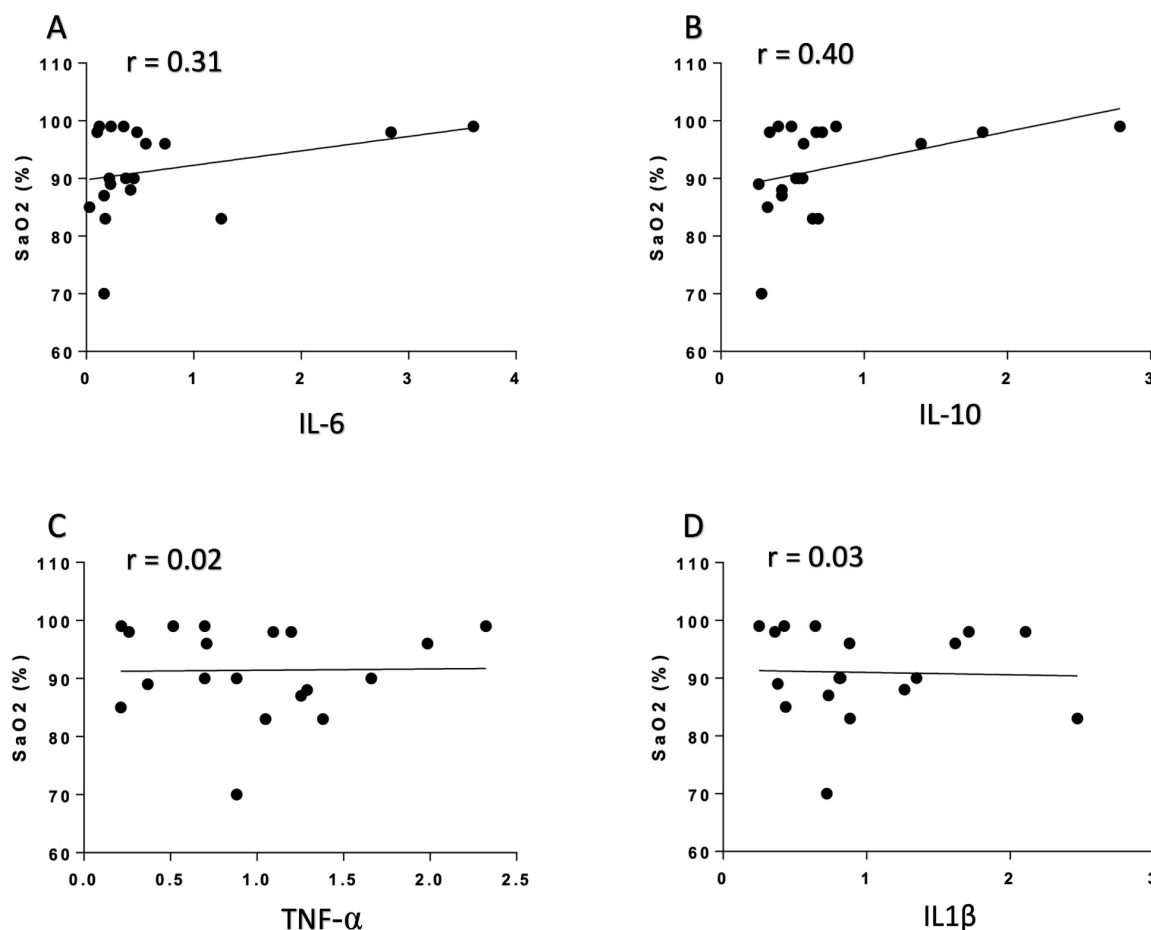
As expressões teciduais das concentrações de IL-10 ($r = -0.27$) andaram em sentido contrário ao INL; ou seja, quanto maior a expressão do mRNA IL-10 no miocárdio, menor a expressão do INL no sangue periférico (efeito protetor), e, conseqüentemente, o paciente é menos inflamado (Figura 5).

Figura 5 - Mostra uma correlação negativa entre a IL-1-mRNA e o INL ($p > 0.05$)

Fonte: Produção do autor.

Quando correlacionamos o nível de SaO_2 com a expressão tecidual do mRNA, percebemos que houve uma correlação positiva entre SaO_2 e a IL-10 ($r = 0.40$; $p=0.07$). Por outro lado, não foi observada correlação entre SaO_2 e o mRNA TNF- α ($r = 0.02$, $p>0.05$) e a IL-1 β ($r = 0.03$, $p>0.05$), como demonstrada na Figura 6.

Figura 6 - Correlação entre o nível de SaO_2 com a expressão tecidual do mRNA

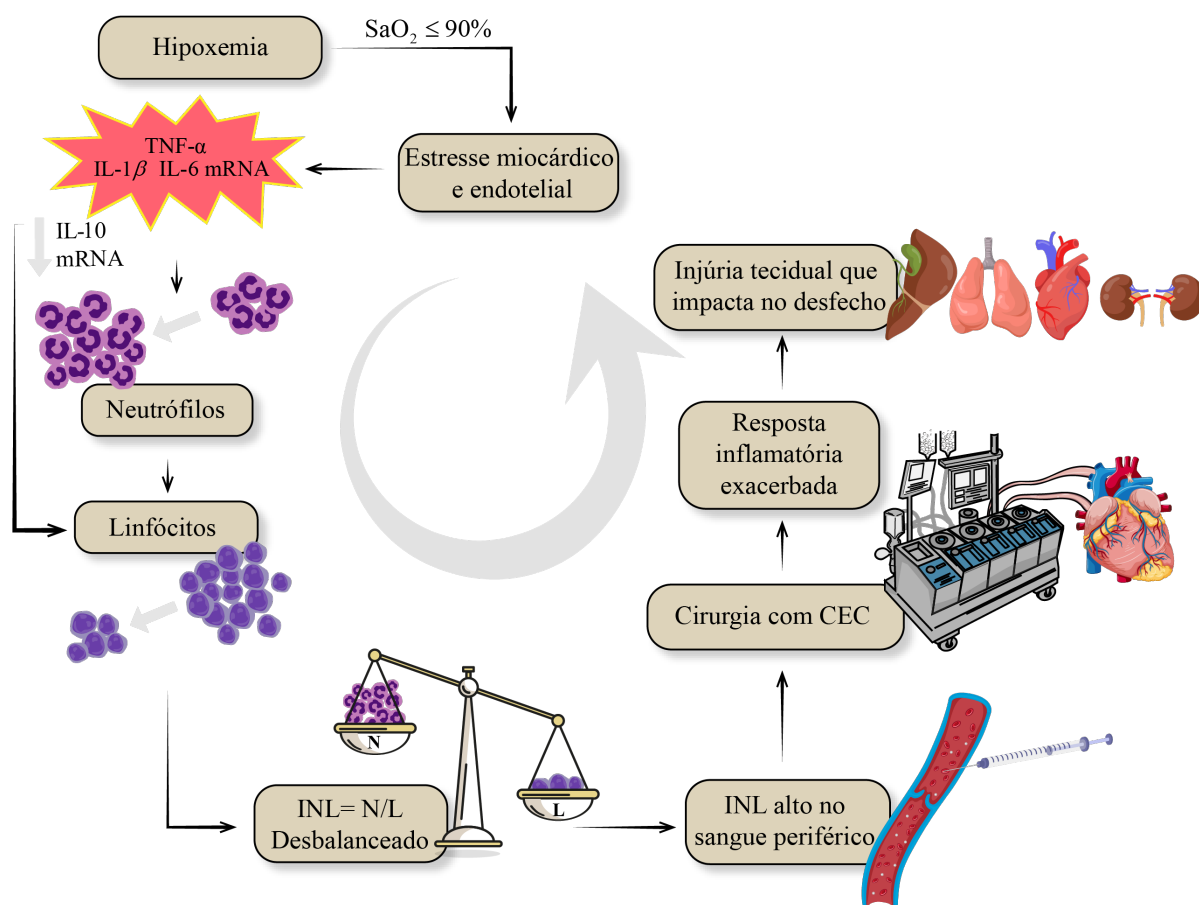


Fonte: Produção do autor.

Nota: **A** - Demonstra correlação positiva entre a expressão da IL-6-mRNA em pacientes menos cianóticos um comportamento anti-inflamatório do IL-6 (normalmente é um pró-inflamatório), sendo mais alta nos pacientes nos acianóticos e no inverso nos cianóticos ($r = 0.31$). **B** - Mostra um comportamento anti-inflamatório como esperado (0.40). **C** e **D** - Mostram uma ausência de correlação entre a SaO_2 e as expressões gênicas de TNF- α , IL-1 β ($r = 0.02$ e 0.03 , respectivamente).

Com esses dados, podemos sugerir uma provável patogenia proposta por nós (Figura 7).

Figura 7 - Representação esquemática do provável mecanismo de regulação pré-operatória do INL em pacientes cianóticos submetidos à correção cirúrgica



Fonte: Produção do autor.

Nota: Utilizamos como modelo pacientes com Tetralogia de Fallot e os resultados do presente estudo. A hipoxemia induz ao estresse sistêmico envolvendo o miocárdio e o endotélio desses pacientes. Esse estresse, por sua vez, ativa a cascata inflamatória que foi possível perceber pela expressão dos mRNAs de $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$, que, por sua vez, estimula a síntese de neutrófilos, aumentando sua concentração na circulação periférica. Por outro lado, existe uma baixa expressão do mRNA $IL-10$ e isso inibe a síntese de linfócitos, diminuindo sua concentração dessas células na circulação periférica. Tudo isso leva a um desequilíbrio na relação neutrófilos-linfócitos, que pode ser facilmente calculado pelo INL, deixando o paciente cronicamente inflamado. O estresse cirúrgico associado ao uso da circulação extracorpórea (contato do sangue com uma superfície não endotelizada) induz em todos os pacientes uma resposta inflamatória fisiológica, porém, nos pacientes cronicamente inflamados como os cianóticos, essa resposta pode ser exacerbada. A resposta inflamatória exacerbada causa dano tecidual no coração (inotropismo negativo), pulmão (insuficiência respiratória), rim (insuficiência ou lesão renal aguda), fígado (insuficiência hepática) e vasos (disfunção endotelial), e pode evoluir com disfunção de múltiplos órgãos, aumentando o tempo de ventilação mecânica, o uso de terapia renal substitutiva, o uso de drogas vasoativas, o tempo de permanência na unidade de terapia intensiva e hospitalar, impactando, consequentemente, na mortalidade e no custo da cirurgia. CEC: circulação extracorpórea; CIV: comunicação interventricular; $IL-1\beta$ - interleucina-1-beta; $IL-6$: interleucina-6 e $IL-10$: interleucina-10; INL: Índice neutrófilo-linfócitos; SaO_2 : saturação de O_2 ; TF: tetralogia de Fallot; $TNF-\alpha$: tumor necrosis factor alpha (fator de necrose tumoral alfa).

7 DISCUSSÃO

7 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que os pacientes com TF têm INL mais alto e tiveram pior prognóstico. Esses pacientes usaram mais drogas vasoativas, tiveram um tempo de ventilação mecânica prolongado, tempo prolongado de permanência na UTI e, consequentemente, um tempo de permanência hospitalar maior.

O INL é definido como uma razão entre a contagem absoluta dos neutrófilos e a contagem total dos linfócitos, e é um biomarcador inflamatório de baixo custo e fácil de ser calculado que pode nos reportar o estado inflamatório pré-operatório do paciente que será submetido à cirurgia cardíaca congênita. Esse biomarcador vem sendo apresentado como eficaz em prever morbidade e mortalidade já com dezenas de estudos demonstrando resultados similares^{25,31-35}. O INL foi amplamente usado durante a pandemia da COVID-19 como um biomarcador prognóstico, inclusive foi demonstrada a sua correlação com a IL-10³⁶⁻⁴⁰.

Muitos biomarcadores mais sensíveis e específicos já foram apresentados como biomarcadores prognósticos para cirurgia cardíaca pediátrica, como as citocinas, o microRNA (miRNA), o mRNA (RNA mensageiro), o peptídeo pro-colágeno tipo III do terminal amino (PIIIP) e o peptídeo natriurético do tipo B (BNP)/proBNP N-terminal que demonstraram ter associação e/ou correlação com maus desfechos^{14-16, 20, 23, 24}. Embora sejam muito específicos, têm menos disponibilidade/acesso e são muito caros. Há a necessidade de se buscar por biomarcadores prognósticos mais baratos e de ampla disponibilidade como o INL.

Em estudos prévios, o poder prognóstico do INL foi posto à prova como nesse estudo retrospectivo que envolveu uma análise de uma coorte de 141 crianças submetidas ao procedimento de Glenn bidirecional entre janeiro de 2011 e dezembro de 2017 em dois centros. O INL pré-operatório foi calculado a partir do último hemograma antes da cirurgia. De acordo com o nível de INL, os pacientes foram divididos em três grupos, sendo o grupo I (INL < 1), grupo II (INL entre 1 e 2) e grupo III (INL > 2). O desfecho primário foi o tempo total de internação hospitalar (LOS), e os desfechos secundários foram o tempo de ventilação mecânica (VM), tempo de permanência na unidade de terapia intensiva (UTI), disfunção ventricular, complicações e mortalidade em médio prazo. O INL pré-operatória maior que 2 foi associada a maior tempo de ventilação mecânica ($p = 0.03$), maior tempo de permanência na UTI ($p = 0.02$) e maior tempo de internação hospitalar ($p = 0.00$) em pacientes com fisiologia univentricular submetidos ao procedimento de Glenn bidirecional¹⁸. Outro estudo que pareou 30 crianças cianóticas *versus* 30 crianças acianóticas comparou o nível de expressão do INL em ambos grupos e concluiu que os pacientes cianóticos eram mais inflamados, ou seja, tinham

maior expressão do INL⁴¹. Tendo em vista vários outros estudos com resultados similares e estudando outras variáveis, pensamos, então, que estamos diante de um potencial biomarcador prognóstico para a cirurgia cardíaca pediátrica, porém, algumas perguntas continuam sem resposta em relação a esse biomarcador como: “Qual é o provável mecanismo de regulação do INL?”, “Esse mecanismo é mutável?” e “Por que pacientes com o mesmo diagnóstico podem apresentar níveis diferentes de INL na ausência de um processo infeccioso?”. A verdade é que, dos diferentes estudos publicados até ao momento, a maioria é observacional e retrospectiva, e não responde a essas questões^{26,27}.

Houve necessidade de desenharmos o presente estudo com objetivo de entender o provável mecanismo regulador do INL comparando pacientes com TF e pacientes com CIV. Pensamos que este seja o primeiro passo antes de respondermos às outras questões. Este é o primeiro estudo que busca explicar se o que observamos no pré-operatório em sangue periférico reflete alguma coisa que esteja acontecendo em nível do miocárdio, deste modo, começamos a trilhar os caminhos do provável mecanismo de regulação da balança entre os neutrófilos e os linfócitos. Com os resultados do presente estudo, podemos perceber que o estresse miocárdico causado pela cianose/isquemia ($\text{SaO}_2 < 90\%$) estimula a síntese do mRNA TNF- α , IL-1 β e a IL-6 nos pacientes com TF, porém percebemos também que as expressões dos mesmos mRNA não são diferentes no grupo CIV. O ponto de desequilíbrio entre os dois grupos foi a baixa expressão da IL-10-mRNA nos pacientes com TF; assim como já reportado em estudo anterior¹⁶. Não temos a resposta de qual célula é responsável pela síntese dessas mRNAs, se são os cardiomiócitos, fibroblastos ou outra célula. Esse desequilíbrio é expresso nos subtipos de leucócitos medidos pelo hemograma, nos neutrófilos e nos linfócitos (INL). Os pacientes cianóticos têm inflamação crônica por causa do estresse miocárdico constante e contínuo^{16,42}. A IL-10 endógena, produzida em condição normais, inibe a produção de citocinas pró-inflamatória, o que protege o miocárdio quando submetido à situação de isquemia¹⁶. A presença da IL-10 nesses pacientes suprime o recrutamento de neutrófilos que causam dano tecidual; por outro lado, a sua ausência se reflete no aumento da quantidade de neutrófilos⁴³⁻⁴⁶. Tudo isso desequilibra a balança INL, como demonstrado no presente estudo na Figura 4, em que os 4 pacientes com o INL mais alto expressaram menos a mRNA IL-10 e tinham a $\text{SaO}_2 < 85\%$.

Há mais de 20 anos, foi demonstrado, em um estudo que incluiu 16 camundongos, 8 com déficit de IL-10 e 8 com a síntese normal de IL-10⁴⁷. Neste estudo, todos os camundongos foram submetidos à isquemia cardíaca ocluindo a artéria coronária interventricular anterior por 30 minutos seguida de reperfusão por 24 horas. O resultado foi 6 mortes dos 8 camundongos com déficit de IL-10, e, por outro lado, todos os camundongos com síntese normal de IL-10

sobreviveram à reperfusão de 24 horas ($p < 0.001$). Aqui fica demonstrado o papel regulador da IL-10 na resposta inflamatória à isquemia/cianose miocárdica como demonstrado em outros estudos em camundongos e cachorros⁴⁷⁻⁴⁹. Linfócitos produtores de IL-10 contribuem para o delicado equilíbrio entre inflamação e imunorregulação, e, portanto, são considerados como uma espécie de “células reguladoras”^{48,49}. O equilíbrio entre a quantidade total de neutrófilos e linfócitos traduz menos inflamação. Pacientes com TF têm uma concentração menor de linfócitos comparando com a CV⁴¹. Contrariamente ao que encontramos, em um outro estudo feito com biópsia de miocárdio do átrio e do ventrículo direito, os autores compararam a concentração de citocinas de 7 pacientes com TF e de 8 com CIV; e foi demonstrado que a TNF- α ($p < 0.02$), IL-1 β ($p < 0.05$), e a IL-6 ($p < 0.01$) estavam aumentadas nos pacientes com TF, e não houve diferença em relação à concentração da IL-10¹⁵. Quais são as semelhanças entre os dois estudos? Os dois analisaram biópsia de miocárdio de dois grupos de pacientes; pacientes com TF e pacientes com CIV submetidos à correção total. Por outro lado, os estudos diferiam-se no seguinte: 1. O presente estudo foi baseado na análise da qRT-PCR (expressão mRNA com o prime para TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10) da biópsia de átrio direito realizada antes do início da CEC que comparou e correlacionou com o INL. No entanto, no estudo de Qing et al.¹⁵, a análise foi feita pelo método ELISA (concentração da citocina) de biópsia de ventrículo direito que foi realizada já em CEC e em hipotermia profunda, esses dois últimos fatores por si só já induzem a uma resposta inflamatória pelo contato com a superfície não endotelizada da CEC, tudo isso pode justificar essa diferença por causa da menor expressão do mRNA IL-10 no grupo TF demonstrado no nosso estudo. Nesse mesmo grupo de pesquisa^{15,16}, foi realizado outro estudo (1 ano antes deste) com 20 pacientes, 10 com TF e 10 acianóticos (diferentes diagnósticos), em que foi comparada à concentração de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias em sangue venoso analisado pelo método de ELISA. Os autores observaram maior concentração da IL-6 e menor concentração de IL-10 no grupo TF e correlacionado com o nível de SaO₂, ou seja, quanto mais cianótico, menor era a concentração da IL-6 e da IL-10. Os nossos resultados demonstram uma menor expressão do mRNA IL-10 no miocárdio de pacientes com TF pode gerar um desequilíbrio na balança inflamatória, tendo como consequência uma resposta inflamatória exacerbada ao trauma cirúrgico e à exposição à CEC cursando com injúria cardíaca, renal, hepática e pulmonar, podendo levar à mortalidade.

No presente estudo, mRNA IL-10 se mostrou como um aparente regulador do INL pré-operatório nos pacientes com cardiopatia congênita submetidos à cirurgia corretiva (Figura 7). Quanto menor a SaO₂, maior é este desbalace, e, conseqüentemente, é maior o nível INL pré-operatório, ou seja, mais inflamado é o paciente. O inverso também foi observado no presente

estudo; quanto maior a SaO₂, menor é este desbalace, e, conseqüentemente, é menor o nível INL pré-operatório, ou seja, menos inflamado é o paciente. Embora a correlação não tenha sido forte, o que pode ser justificado pelo fato da diferença entre os mRNA e o INL não ser maior que duas vezes, pois, para o cálculo amostral, consideramos que houvesse uma diferença maior ou igual a duas vezes entre os dois biomarcadores, apesar disso, o comportamento da il-10 mRNA guardou relação com o nível de SaO₂ e o nível de INL. Resultado similar já foi demonstrado em um estudo que incluiu 20 pacientes, 10 cianóticos e 10 acianóticos, quando correlacionado o nível de SaO₂ com a concentração de IL-10. Quanto mais cianótico, menor a concentração da IL-10, resultado similar ao encontrado no presente estudo¹⁶.

Os pacientes cianóticos que forem submetidos à cirurgia cardíaca com o uso da CEC irão experimentar a mesma resposta inflamatória após a CEC como todos os outros só que os com INL mais alto aparentemente têm mais chance de que essa resposta seja generalizada e descontrolada, levando à SRIS podendo impactar no desfecho. A resposta inflamatória é dada em duas fases: a fase “precoce” é iniciada pelo contato do sangue com células não endoteliais do circuito de CEC e, no final, envolve constituintes humorais e celulares do sistema imunológico. A fase “tardia” que perpetua as cascatas inflamatórias é caracterizada por lesão de isquemia-reperfusão, endotoxemia, coagulopatia e reações do complexo heparina-protamina^{10, 11}. A ligação entre inflamação, coagulação e fibrinolítica cascatas é complexa, e pode ser parcialmente explicada pela fase aguda reações durante a CEC semelhantes às observadas na sepse¹⁰⁻¹². Outro link pode ser o fator nuclear kappa B (NFκB), um onipresente e fator de transcrição indutível que está implicado durante todas as fases da resposta, mas desempenha um papel central na regulação de genes pró-inflamatórios durante a reação de fase aguda⁶⁻¹². Poder prever quais pacientes apresentam um risco maior de ter essa resposta exacerbada ao estresse cirúrgico, e a exposição a CEC de forma simples e barata é de grande importância clínica. Várias perguntas continuam em aberto em relação ao assunto, INL como biomarcador prognóstico.

8 CONCLUSÃO

8 CONCLUSÃO

Os pacientes com tetralogia de Fallot tiveram nível mais alto do INL pré-operatório e também pior prognóstico. Os pacientes com tetralogia de Fallot tiveram menor expressão da mRNA IL-10, que guardou relação com a saturação de O₂ e o nível de INL.

9 LIMITAÇÕES

Uma das limitações deste estudo foi o tamanho da amostra, ela foi calculada baseada na expressão gênica tecidual do mRNA e não baseado no INL, esse fato limitou as conclusões. Além disso, uma comparação e correlação com os mesmos mRNA no sangue periférico teria agregado muito mais valor e dado mais robustez.

10 FINANCIAMENTO

10 FINANCIAMENTO

O estudo foi custeado pelo Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular (LGCM);
Declaração no Anexo C.

11 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

11 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Como uma das limitações deste estudo foi o tamanho da amostra, que foi calculada baseada na expressão gênica tecidual do mRNA e não baseado no INL, limitando nossas conclusões, pretendemos dar andamento ao trabalho que deu início a essa Tese. A intenção é dar continuidade ao estudo com um Projeto de Pós-Doutorado intitulado: Correlação entre a Expressão do mRNA e o Índice Neutrófilos-Linfócitos em sangue periférico de crianças com tetralogia de Fallot.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

1. Heo RH, Wang MK, Meyre PB, Birchenough L, Park L, Vuong K, Devereaux PJ, Blum S, Lindahl B, Stone G, Conen D. Associations of inflammatory biomarkers with the risk of morbidity and mortality after cardiac surgery: a systematic review and meta-analysis. *Can J Cardiol*. 2023 Nov;39(11):1686-1694.
2. Dobson GP. Trauma of major surgery: a global problem that is not going away. *Int J Surg*. 2020 Sep;81:47-54.
3. Kohl BA, Deutschman CS. The inflammatory response to surgery and trauma. *Curr Opin Crit Care*. 2006 Aug;12(4):325-32.
4. Lord JM, Midwinter MJ, Chen YF, Belli A, Brohi K, Kovacs EJ, Koenderman L, Kubes P, Lilford RJ. The systemic immune response to trauma: an overview of pathophysiology and treatment. *Lancet*. 2014 Oct 18;384(9952):1455-65.
5. Kant S, Banerjee D, Sabe SA, Sellke F, Feng J. Microvascular dysfunction following cardiopulmonary bypass plays a central role in postoperative organ dysfunction. *Front Med (Lausanne)*. 2023 Feb 14;10:1110532.
6. Güvener M, Korun O, Demirtürk OS. Risk factors for systemic inflammatory response after congenital cardiac surgery. *J Card Surg*. 2015 Jan;30(1):92-6.
7. Soares LC, Ribas D, Spring R, Silva JM, Miyague NI. Clinical profile of systemic inflammatory response after pediatric cardiac surgery with cardiopulmonary bypass. *Arq Bras Cardiol*. 2010 Jan;94(1):127-33.
8. Allan CK, Newburger JW, McGrath E, Elder J, Psoinos C, Laussen PC, del Nido PJ, Wypij D, McGowan FX Jr. The relationship between inflammatory activation and clinical outcome after infant cardiopulmonary bypass. *Anesth Analg*. 2010 Nov;111(5):1244-51.
9. Levy JH, Tanaka KA. Inflammatory response to cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg*. 2003 Feb;75(2):S715-20.
10. Banerjee D, Feng J and Sellke FW. Strategies to attenuate maladaptive inflammatory response associated with cardiopulmonary bypass. *Front. Surg*. 2024 11:1224068. doi: 10.3389/fsurg.2024.1224068
11. Squicciarro E, Stasi A, Lorusso R, Paparella D. Narrative review of the systemic inflammatory reaction to cardiac surgery and cardiopulmonary bypass. *Artif Organs*. 2022 Apr;46(4):568-77.
12. Cate JW, van der Poll T, Levi M, ten Cate H, van Deventer SJ. Cytokines: triggers of clinical thrombotic disease. *Thromb Haemost*. (1997) 78(1):415-9.
13. Guvener M, Korun O, Demirturk OS. Risk factors for systemic inflammatory response after congenital cardiac surgery. *J Card Surg*. 2015;30(1):92-6.

14. Bhatia M, Moochhala S. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. *J Pathol* 2004;202(2) 145-56.
15. Qing M, Schumacher K, Heise R, Wöltje M, Vazquez-Jimenez JF, Richter T, Arranda-Carrero M, Hess J, von Bernuth G, Seghaye MC. Intramyocardial synthesis of pro- and anti-inflammatory cytokines in infants with congenital cardiac defects. *J Am Coll Cardiol*. 2003 Jun 18;41(12):2266-74.
16. Hövels-Gürich HH, Schumacher K, Vazquez-Jimenez JF, Qing M, Hüffmeier U, Buding B, Messmer BJ, von Bernuth G, Seghaye MC. Cytokine balance in infants undergoing cardiac operation. *Ann Thorac Surg*. 2002 Feb;73(2):601-8.
17. Gao C, Zhao D, Wang J, Liu P, Xu B. Clinical significance and correlation of microRNA-21 expression and the neutrophil-lymphocyte ratio in patients with acute myocardial infarction. *Clinics (São Paulo)*. 2019 Nov 7;74:e1237.
18. Manuel V, Miana LA, Guerreiro GP, Tenório DF, Turquetto A, Penha JG, Massoti MR, Tanamati C, Junior APF, Caneco LF, Jatene FB, Jatene MB. Prognostic value of the preoperative neutrophil-lymphocyte ratio in patients undergoing the bidirectional Glenn procedure. *J Card Surg*. 2020 Feb;35(2):328-34.
19. Savluk OF, Guzelmeric F, Yavuz Y, Ukil F, Yilmaz A, Cevirme D, Tuncer E, Hatemi AC, Ceyran H. Neutrophil-lymphocyte ratio as a mortality predictor for Norwood stage I operations. *Gen Thorac Cardiovasc Surg*. 2019 Aug;67(8):669-76.
20. Nagy O, Baráth S, Ujfalusi A. The role of microRNAs in congenital heart disease. *EJIFCC*. 2019;30(2):165-78.
21. Zloto K, Tirosh-Wagner T, Bolkier Y, Bar-Yosef O, Vardi A, Mishali D, Paret G, Nevo-Caspi Y. MiRNA-208a as a sensitive early biomarker for the postoperative course following congenital heart defect surgery. *Pediatr Cardiol*. 2018;39(8):1565-71.
22. Sugimoto M, Kuwata S, Kurishima C, Kim JH, Iwamoto Y, Senzaki H. Cardiac biomarkers in children with congenital heart disease. *World J Pediatr*. 2015;11(4):309-15.
23. Okubo N, Hatori N, Ochi M, Tanaka S. Comparison of m-RNA expression for inflammatory mediators in leukocytes between on-pump and off-pump coronary artery bypass grafting. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*. 2003;9(1):43-9.
24. Zimmermann AK, Simon P, Seeburger J. Cytokine gene expression in monocytes of patients undergoing cardiopulmonary bypass surgery evaluated by real-time PCR. *J Cell Mol Med*. 2003;7(2):146-56.
25. Xu H, Sun Y, Zhang S. The relationship between neutrophil to lymphocyte ratio and clinical outcome in pediatric patients after cardiopulmonary bypass surgery: a retrospective study. *Front Pediatr*. 2019 Jul 31;7:308.
26. Iliopoulos I, Alder MN, Cooper DS, Villarreal EG, Loomba R, Sahay RD, Fei L, Steele PE, Flores S. Pre-operative neutrophil-lymphocyte ratio predicts low cardiac output in children after cardiac surgery. *Cardiol Young*. 2020 Apr;30(4):521-5.

27. Wu X, Luo Q, Su Z, Li Y, Wang H, Yuan S, Yan F. Prognostic value of preoperative absolute lymphocyte count in children with Tetralogy of Fallot. *J Am Heart Assoc*. 2021 Jun;10(11):e019098.
28. Liu P, Hwang JT. Quick calculation for sample size while controlling false discovery rate with application to microarray analysis. *Bioinformatics*. 2007 Mar 15;23(6):739-46.
29. Gatto CST, Galas FRBG, Auler Júnior JOC. *Conduas em anestesia cardíaca pediátrica Incor - HCFMUSP. Manual de Rotinas*. São Paulo: Editora dos Editores. 2020. 120p.
30. Caneo LF, Matte G, Groom R, Neirotti RA, Pêgo-Fernandes PM, Mejia JAC, Figueira FAMDS, Carvalho Filho ÉB, Costa FMD, Chalegre ST, Kalil RAK, Almeida RMS. The Brazilian Society for Cardiovascular Surgery (SBCCV) and Brazilian Society for Extracorporeal Circulation (SBCEC) Standards and Guidelines for Perfusion Practice. *Braz J Cardiovasc Surg*. 2019 Mar-Apr;34(2):239-60.
31. Manuel V, Miana LA, Jatene MB. Neutrophil-lymphocyte ratio in congenital heart surgery: what is known and what is new? *World J Pediatr Congenit Heart Surg*. 2022 Mar;13(2):208-16.
32. Ołasińska-Wiśniewska A, Urbanowicz TK, Gładki MM, Bobkowski W, Zalas D, Jemielity M. The beneficial role of simple inflammatory blood indices in pediatric cardiology. *Adv Clin Exp Med*. 2023 Sep;32(9):1041-8.
33. Matsushita FY, Krebs VLJ, de Carvalho WB. Identifying two distinct subphenotypes of patent ductus arteriosus in preterm infants using machine learning. *Eur J Pediatr*. 2023 May;182(5):2173-9.
34. Yakuwa K, Miyaji K, Kitamura T, Miyamoto T, Ono M, Kaneko Y. Neutrophil-to-lymphocyte ratio is prognostic factor of prolonged pleural effusion after pediatric cardiac surgery. *JRSM Cardiovasc Dis*. 2021 Apr 19;10:20480040211009438.
35. Lu L, Zhang H, Dauphars DJ, He YW. A Potential Role of Interleukin 10 in COVID-19 Pathogenesis. *Trends Immunol*. 2021 Jan;42(1):3-5.
36. Lu L, Zhang H, Dauphars DJ, He YW. A potential role of interleukin 10 in COVID-19 pathogenesis. *Trends Immunol*. 2021;42(1):3-5.
37. Li X, Liu C, Mao Z, Xiao M, Wang L, Qi S, Zhou F. Predictive values of neutrophil-to-lymphocyte ratio on disease severity and mortality in COVID-19 patients: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care*. 2020 Nov 16;24(1):647.
38. Chan AS, Rout A. Use of Neutrophil-to-lymphocyte and platelet-to-lymphocyte ratios in COVID-19. *J Clin Med Res*. 2020 Jul;12(7):448-53.
39. Jimeno S, Ventura PS, Castellano JM, García-Adasme SI, Miranda M, Touza P, Lllana I, López-Escobar A. Prognostic implications of neutrophil-lymphocyte ratio in COVID-19. *Eur J Clin Invest*. 2021 Jan;51(1):e13404.

40. Liu Y, Du X, Chen J, Jin Y, Peng L, Wang HHX, Luo M, Chen L, Zhao Y. Neutrophil-to-lymphocyte ratio as an independent risk factor for mortality in hospitalized patients with COVID-19. *J Infect.* 2020 Jul;81(1):e6-e12.
41. Manuel V, Miana LA, Solla DJF, Fernandes N, Carrillo G, Jatene MB. Preoperative level of neutrophil-lymphocyte ratio: comparison between cyanotic and acyanotic congenital heart disease. *J Card Surg.* 2021 Apr;36(4):1376-80.
42. Sethi G, Sung B, Aggarwal BB. TNF: a master switch for inflammation to cancer. *Front Biosci.* 2008 May 1;13:5094-107.
43. Briasoulis A, Androulakis E, Christophides T, Tousoulis D. The role of inflammation and cell death in the pathogenesis, progression and treatment of heart failure. *Heart Fail Rev.* 2016 Mar;21(2):169-76.
44. Frangogiannis NG. Regulation of the inflammatory response in cardiac repair. *Circ Res.* 2012 Jan 6;110(1):159-73.
45. Frangogiannis NG. The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodeling. *Nat Rev Cardiol.* 2014 May;11(5):255-65.
46. Ouyang W, Rutz S, Crellin NK, Valdez PA, Hymowitz SG. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annu Rev Immunol.* 2011;29:71-109.
47. Galeone A, Grano M, Brunetti G. Tumor necrosis factor family members and myocardial ischemia-reperfusion injury: State of the Art and Therapeutic Implications. *Int J Mol Sci.* 2023 Feb 27;24(5):4606.
48. Bierer J, Stanzel R, Henderson M, Sett S, Sapp J, Andreou P, Marshall JS, Horne D. Novel inflammatory mediator profile observed during pediatric heart surgery with cardiopulmonary bypass and continuous ultrafiltration. *J Transl Med.* 2023 Jul 5;21(1):439.
49. Yao Y, Simard AR, Shi FD, Hao J. IL-10-producing lymphocytes in inflammatory disease. *Int Rev Immunol.* 2013 Jun;32(3):324-36.

ANEXOS

ANEXO A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

1

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DA PESQUISA

Título da pesquisa - Correlação entre o mRNA em biópsia de miocárdio e o índice neutrófilos-linfócitos pré-operatório em sangue periférico como marcadores de prognóstico em pacientes com cardiopatia congênita cianótica versus acianótica submetidos à correção cirúrgica (**ESTUDO PREVISÃO**)

Pesquisador principal - Prof. Dr. Marcelo Biscegli Jatene

Pesquisador Executante: Dr. Valdano Mateus Correia Osório Manuel

Departamento/Instituto - Serviço de Cirurgia Cardiovascular Infantil.

O seu filho(a) está sendo convidado(a) a participar de um estudo intitulado **Correlação entre o miRNA em biópsia de miocárdio e o índice neutrófilos-linfócitos pré-operatório em sangue periférico como marcadores de prognóstico em pacientes com cardiopatia congênita cianótica versus acianótica submetidos à correção cirúrgica**. É através das pesquisas clínicas que ocorrem os avanços na medicina, e a sua participação é de fundamental importância.

O objetivo desta pesquisa é tentar entender se existe correlação (a relação que existe) entre um parâmetro (medida) de baixo custo para medir a inflamação chamado de índice neutrófilos-linfócitos [(INL), neutrófilos e linfócitos são células de defesa do organismo que são medidas no hemograma] que será calculado através do hemograma de rotina pré-operatória de sangue periférico (sangue da veia do braço ou da perna) versus o miRNA (um material genético que regula a resposta inflamatória) este será medido em biópsia de aurícula do átrio direito, que é uma das "cavidades" do coração, em crianças com idades entre 1 e 12 meses de idade.

Caso a/o senhora/senhor permita que seu filho(a) participe da pesquisa, será feita uma biópsia (procedimento cirúrgico no qual se colhe uma amostra "pedaço de 5-10 mg" de tecido do coração para posterior estudo em laboratório) da aurícula do átrio direito antes da entrada em circulação extracorpórea (circulação do sangue pela máquina). Este procedimento será realizado no mesmo ato cirúrgico da correção da anomalia cardíaca e desta forma não aumentaria o tempo cirúrgico, pois se trata de um procedimento rápido que não aumenta o risco e que muitas vezes é realizado também em cirurgias de rotina.

Como rotina, já ocorre no pré-operatório a coleta de sangue para exames do seu filho(a). Ele(a) poderá experimentar um certo grau de desconforto, mas o estudo proposto avaliará o resultado do exame de rotina, não haverá coleta de mais sangue antes da cirurgia por causa da pesquisa.

Na cirurgia, já sob efeito da anestesia geral (dormindo para a realização da cirurgia), será coletada uma amostra de sangue para armazenamento no Biorrepositório (coleção de material biológico humano, coletado e armazenado ao longo da execução de um projeto de pesquisa específico) do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do Incor. A quantidade de sangue coletado será bem pequena (3-4 ml) e não são esperados efeitos colaterais por esta coleta.

Em relação à biópsia, o seu filho não experimentará nenhum tipo de desconforto. O fragmento (pedaço de tecido do coração) de átrio direito coletado não fará falta e nem atrapalhará o funcionamento do coração. A retirada deste fragmento do átrio direito (aurícula) é rotineira para alguns cirurgiões, porém no caso de participar da pesquisa esta remoção será sempre realizada. Não são esperados riscos

Nome resumido do projeto: PREVISÃO	Confidencial
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido versão 1.0 de Dezembro de 2019	
Nome do Pesquisador Principal - Prof. Dr. Marcelo Biscegli Jatene Hospital Das Clínicas Da Faculdade De Medicina Da USP	Rubrica do Participante da Pesquisa/Representante legal Rubrica do Pesquisador Executante

Atualizado-dezembro 2019

2

adicionais por esta biópsia pois este local geralmente faz parte do processo de canulação (técnica de preparação para a circulação extracorpórea) do átrio que já acontece de forma habitual.

Não haverá consulta especial, coleta ou realização de novos exames por conta da participação na pesquisa, o paciente será acompanhado conforme o protocolo clínico para todos os pacientes operados na instituição. Estão garantidas todas as informações que você queira antes e depois do estudo.

A participação na pesquisa é voluntária. Você tem a liberdade de recusar participar da pesquisa ou se decidir participar, poderá retirar seu consentimento a qualquer momento. Este fato não implicará na interrupção do atendimento ao seu filho(a), que está assegurado.

As informações relacionadas ao estudo poderão ser inspecionadas pelos médicos que executam a pesquisa e pelas autoridades legais, no entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isso será sob forma codificada, para que a confidencialidade seja mantida.

Todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa (miRNA) ou o DNA para o banco de dados não são responsabilidade do paciente ou sua família.

Pela participação no estudo, você não receberá qualquer valor em dinheiro. Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome ou de do seu filho(a), e sim em código.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de dúvidas. O investigador principal é o Prof. Dr. Marcelo Biscegli Jatene que pode ser encontrado no endereço: Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 44 – Bloco 2 - 2º andar no Serviço de Cirurgia Cardiovascular Infantil. Telefone(s) (11) 99930-1616, e-mail mbjatene@uol.com.br. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: (11) 2661-7585, (11) 2661-1548, (11) 2661-1549, das 7 às 16h de segunda a sexta-feira ou por e-mail: cep@hc.fm.usp.br.

Fui suficientemente informado a respeito do estudo "Correlação entre o miRNA em biópsia de miocárdio e o índice neutrófilos-linfócitos pré-operatório em sangue periférico como marcadores de prognóstico em pacientes com cardiopatia congênita cianótica versus acianótica submetidos à correção cirúrgica".

Eu discuti as informações acima com o Pesquisador Responsável (Prof. Dr. Marcelo Biscegli Jatene) ou pessoa (s) por ele delegada (s) (.....) sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim os objetivos, os procedimentos, os potenciais desconfortos e riscos e as garantias. Concordo voluntariamente em participar deste estudo, assino este termo de consentimento e recebo um via rubricada pelo pesquisador.

_____ Data ____/____/____

Assinatura do participante /representante legal

Nome do participante/representante legal

_____ Data ____/____/____

Assinatura do responsável pela entrevista

Nome resumido do projeto: PREVISÃO	Confidencial	
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido versão 1.0 de Dezembro de 2019		
Nome do Pesquisador Principal - Prof. Dr. Marcelo Biscegli Jatene Hospital Das Clínicas Da Faculdade De Medicina Da USP		
	Rubrica do Participante da Pesquisa/Representante legal	Rubrica do Pesquisador Executante

Atualizado-dezembro 2019

ANEXO B - APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA

5188/20/217

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

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: CORRELAÇÃO ENTRE O miRNA EM BIÓPSIA DE MIOCÁRDIO E O ÍNDICE NEUTRÓFILOS-LINFÓCITOS PRÉ-OPERATÓRIO COMO MARCADORES DE PROGNÓSTICO EM PACIENTES COM CARDIOPATIA CONGÊNITA CIANÓTICA VERSUS ACIANÓTICA SUBMETIDOS À CORREÇÃO CIRÚRGICA

Pesquisador: Marcelo Biscegli Jatene

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 2

CAAE: 44374721.0.0000.0068

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

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.709.162

Apresentação do Projeto:

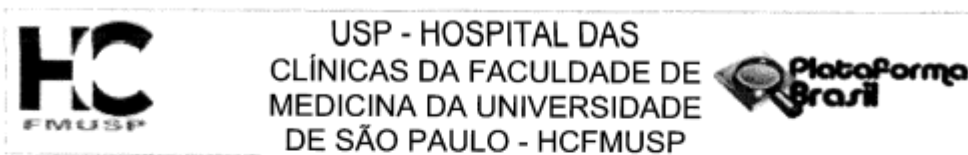
miRNA em biópsia de miocárdio e o índice neutrófilos-linfócitos PRÉ-operatório em sangue periférico como marcadores de prognóstico em pacientes com cardiopatia congênita cianótica Versus acianótica Submetidos à correção cirúrgica. Os autores têm como hipótese principal que há uma correlação positiva entre o INL pré-operatório e o miRNA em pacientes cardiopatas. E que exista uma expressão maior de miRNA, com valores maiores de INL em pacientes com TF (cianóticos) versus pacientes com CIV (acianóticos).

Serão incluídos 66 pacientes consecutivos para o grupo de pacientes com TF e 66 para o grupo de pacientes com CIV, tendo sido realizado cálculo amostral.

Objetivo da Pesquisa:

Esta pesquisa tem como objetivo principal correlacionar o miRNA em biópsia de miocárdio e o índice neutrófilos-linfócitos pré-operatório em sangue periférico como marcadores de prognóstico em pacientes com cardiopatia congênita cianótica versus acianótica submetidos à correção.

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



Continuação do Parecer: 4.709.162

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Já avaliados e descritos em parecer anterior.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisadores fizeram as adequações solicitadas quanto a biopsia durante o procedimento.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Pesquisadores fizeram as adequações solicitadas quanto a biopsia durante o procedimento.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem necessidade de novas adequações.

Considerações Finais a critério do CEP:

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

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1414865.pdf	06/05/2021 10:53:47		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	2_TCLE_V2021.doc	06/05/2021 10:53:27	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	1_PROJETO_DOUTORADO_V2021.docx	06/05/2021 10:53:20	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Outros	carta_resposta_CEP_5188.docx	06/05/2021 10:52:45	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Outros	Carta_Resposta_CEP_5188.pdf	06/05/2021 10:51:32	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	1_PROJETO_DOUTORADO.docx	10/03/2021 14:43:03	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito

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

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

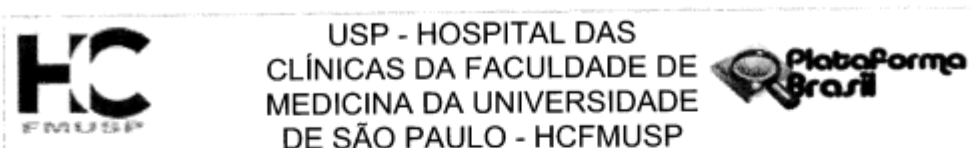
UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

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



Continuação do Parecer: 4.709.162

Outros	8_Biorrepositorio.pdf	10/03/2021 13:07:53	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Outros	8_Biorrepositorio.doc	10/03/2021 13:07:38	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Outros	7_Carta_POS.pdf	10/03/2021 13:07:27	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Outros	7_carta_pos.docx	10/03/2021 13:07:16	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Outros	6_Cronograma.docx	10/03/2021 13:07:08	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Outros	5_Dados_Digitais.pdf	10/03/2021 13:06:57	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Outros	5_dados_digitais.docx	10/03/2021 13:06:46	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Outros	4_DECLARACAO_CUSTO.pdf	10/03/2021 13:06:36	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Outros	4_Declaracao_Custo.doc	10/03/2021 13:06:24	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	2_TCLE.doc	10/03/2021 13:06:13	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Outros	3_ORCAMENTO.docx	10/03/2021 13:05:54	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Outros	fr_sgp_assinada.pdf	10/03/2021 13:05:18	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Folha de Rosto	FR_PB_ASSINADA.pdf	10/03/2021 13:05:03	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito

Situação do Parecer:

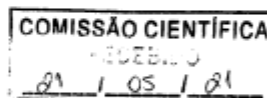
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 13 de Maio de 2021

Assinado por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador(a))



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

ANEXO C - DECLARAÇÃO DE CUSTOS

DECLARAÇÃO DE CUSTOS

DADOS SOBRE A PESQUISA

TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Correlação entre o mRNA em biópsia de miocárdio e o índice neutrófilo-linfócito pré-operatório como marcadores de prognóstico em pacientes com cardiopatia congênita cianótica versus acianótica submetidos à correção cirúrgica

PESQUISADORES PRINCIPAL:

1. Professor Doutor Marcelo Biscegli Jatene

- CARGO/FUNÇÃO: Diretor do Serviço de Cirurgia Cardiovascular Infantil do InCor-HCFMUSP
- INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 49.952 (CRM-SP)
- MATRÍCULA InCor Fundação Zerbini: 616065

UNIDADE DO HCFMUSP: InCor - Cirurgia Torácica e Cardiovascular

DURAÇÃO DA PESQUISA: 36 meses

CARACTERÍSTICAS DO ESTUDO: Estudo observacional retrospectivo (revisão de prontuários eletrônicos para checar o hemograma de rotina pré-operatório) e prospectivo (biópsia de miocárdio para o estudo do mRNA e coleta de 3-4 mL de sangue periférico para a extração de DNA com aplicação devida do termo de consentimento livre e esclarecido) em crianças com tetralogia de Fallot e em crianças com comunicação interventricular que serão submetidas a correção cirúrgica conforme o agendamento do hospital.

Declaro para os devidos fins que os custos referentes à parte prospectiva do projeto de pesquisa acima citado, serão de total responsabilidade do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular.

Ambas as partes do protocolo não acarretarão custos adicionais à Instituição.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data 10/11/2020

Prof. Dr. José Eduardo Krieger
Assinatura do responsável pelo estudo
Lab. de Gen. e Cardiologia Molecular IUM-13
InCor - HCFMUSP

Data 05/11/2020