



Dora Lopes Castelo Branco Catré

EFEITOS DA ANESTESIA, ANALGESIA E SEDAÇÃO EM SER IMATURO

Estudo Experimental e Clínico

Tese de Doutoramento em Ciências da Saúde, ramo de Medicina, especialidade de Cirurgia/Anestesiologia, orientada pelo Senhor Professor Doutor António Manuel Silvério Cabrita e pelo Senhor Professor Doutor Joaquim Manuel Vieira da Silva Viana e apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

Outubro de 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Efeitos da Anestesia, Analgesia e Sedação em Ser Imaturo

Estudo Experimental e Clínico

Dora Lopes Castelo Branco Catré

Tese submetida à Universidade de Coimbra para aquisição do grau de Doutor em Ciências da Saúde, ramo de Medicina, especialidade de Cirurgia/Anestesiologia, orientada pelo Senhor Professor Doutor António Manuel Silvério Cabrita e pelo Senhor Professor Doutor Joaquim Manuel Vieira da Silva Viana pela Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

Universidade de Coimbra

2014

Na capa, Maria Miguel, concebida e nascida durante a realização deste trabalho.

À minha família

i. Resumo Biográfico

A autora nasceu em Coimbra a 31 de Dezembro de 1981. Frequentou a Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, onde se licenciou em Medicina (Curso 1999-2005) e obteve o grau de Mestre em Patologia Experimental em 2009. Em 2010 obteve a Competência em Patologia Experimental pela Ordem dos Médicos. Na vertente clínica obteve o título de Especialista em Anestesiologia em 2011 após a realização do Internato Complementar desta Especialidade no Hospital de S. Teotónio, E.P.E., Viseu, onde foi contratada como Assistente Hospitalar, cargo que exerce até à data.

A sua ligação ao ensino universitário iniciou-se na Universidade Católica Portuguesa como Assistente Convidada do Mestrado Integrado em Medicina Dentária onde lecionou, entre outras, Semiologia Clínica, Anestesia e Analgesia e Suporte de Vida e Emergência Médica e na Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra onde lecionou aulas teórico-práticas da área de anestesia na unidade curricular Técnicas de Cirurgia Experimental do Mestrado em Patologia Experimental.

Durante a sua formação e atividade em Anestesia desenvolveu particular interesse pelas fragilidades dos extremos da vida. Em particular, durante o seu Estágio da Especialidade de Anestesia, realizado no Hospital Pediátrico de Coimbra, contactou com neonatos cirúrgicos, tendo despertado as preocupações que inspiraram esta tese de doutoramento. Nesta fase desenvolveu investigação translacional e clínica de onde resultou diversa produção científica referenciada na Medline/PubMed durante o período de doutoramento, nomeadamente:

Catré D, Viana JS, Cabrita AM, Oliveira M, Felizes A, Lopes MF. Hydroxyethyl starch 130/0.4 attenuates early hepatic damage in ischemia/reperfusion injury. *Can J Anaesth.* 2010 May;57(5):439-45.

Lopes MF, Catré D, Reis A, Leitão LM. Endoscopic treatment of recurrent tracheoesophageal fistula with histoacryl glue. *Gastrointest Endosc.* 2010 Dec;72(6):1324-5; author reply 1325.

Catré D, Lopes MF, Bento C, Cabrita AS. Protective perioperative strategy using a third generation hydroxyethyl starch during surgery in a murine model of liver reperfusion injury. *Acta Cir Bras*. 2011 Dec;26(6):456-62.

Pereira CM, Figueiredo ME, Carvalho R, Catré D, Assunção JP. Anesthesia and surgical microvascular flaps. *Rev Bras Anesthesiol*. 2012 Jul;62(4):563-79.

Oliveira-Santos M, Lopes MF, Catré D, Gonçalves E, Cabrita A. [Effect of hydroxyethyl starch on acute renal injury in a model of hepatic ischemia-reperfusion]. *Acta Med Port*. 2012 Sep-Oct;25(5):308-16.

Carvalho JP, Catré DL, Pereira CM, Costa M. Anesthesia in patients with positive direct coombs test: report of three cases. *Rev Bras Anesthesiol*. 2010 Jan-Feb;60(1):75-83.

Além destes, os seguintes artigos publicados ou submetidos a publicação em revistas indexadas na Medline/PubMed resultaram do trabalho desenvolvido durante a preparação desta Tese:

Catré D, Lopes MF, Cabrita AS. Lasting developmental effects of neonatal fentanyl exposure in preweanling rats. *Anesthesiol Res Pract*. 2012;2012:180124.

Catré D, Lopes MF, Viana JS, Cabrita AS. Morbimortalidade Perioperatória no Primeiro Ano de Idade: Revisão Sistemática (1997-2012). *Rev Bras Anesthesiol*. *In Press*. DOI: 10.1016/j.bjan.2013.03.025

Catré D, Lopes MF, Cabrita AS, Viana JS. Anestesia Pediátrica em Período de Imaturidade Cerebral e Perturbação do Neurodesenvolvimento. *Acta Med Port*. 2014 May-Jun;27(3):383-389.

Catré D, Lopes MF, Madrigal A, Oliveiros B, Viana JS, Cabrita AS. Early Mortality after Neonatal Surgery: Analysis of Risk Factors in an Optimized Health Care System for the Surgical Newborn. *Rev Bras Epidemiol*. 2013; 16(4): 943-52.

Catré D, Lopes MF, Madrigal A, Oliveiros B, Cabrita AS, Viana JS, Farela Neves J. Predictors of major postoperative complications in neonatal surgery. Rev Col Bras Cir. 2013; 40(5): 363-369.

ii. Agradecimentos

A abrir estas páginas, umas palavras, necessariamente aquém do devido, às pessoas que me ajudaram neste percurso.

Ao Senhor Prof. Doutor António Silvério Cabrita, meu Orientador, pelo apoio e amizade, pelo estímulo da sua confiança, pelo partilhar de conhecimentos na área da Patologia Experimental e na condução de estudos de investigação, pelas oportunidades proporcionadas, a minha muita estima e gratidão.

Ao Senhor Prof. Doutor Joaquim Silva Viana, meu Orientador, pelo apoio e compreensão, pelo estímulo da sua confiança, pelo partilhar de conhecimentos na área da Anestesiologia, o meu agradecimento e testemunho da maior admiração.

À Senhora Prof. Doutora Maria Francelina Lopes, pela ajuda incondicional, pela educação e formação pessoal e académica na área da cirurgia pediátrica, o meu mais profundo agradecimento e carinho.

Ao Senhor Dr. Angel Madrigal, distinto Anestesiologista, pelos importantes ensinamentos na área da anestesia pediátrica, pela disponibilidade e apoio, a minha gratidão.

À Senhora Dra. Bárbara Oliveiros do Laboratório de Bioestatística e Informática Médica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, pela ajuda e conhecimentos partilhados na área da estatística, o meu agradecimento.

Aos investigadores de diversas unidades de investigação translacional da Faculdade de Medicina e da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, em particular ao Senhor Prof. Doutor Miguel Castelo-Branco, à Senhora Prof. Doutora Maria Filomena Botelho, ao Senhor Prof. Doutor Frederico Pereira e à Senhora Prof. Doutora Isabel Vitória, pela disponibilização de recursos para o estudo experimental e pelo apoio prestado, o meu reconhecimento.

Aos médicos da Unidade de Cuidados Intensivos do Hospital Pediátrico de Coimbra, em particular ao Senhor Dr. José Farela Neves, pela disponibilização de recursos e pelo apoio prestado, a minha gratidão.

Aos médicos das Unidades de Cuidados Neonatais das Maternidades Bissaya Barreto e Dr. Daniel de Matos, pela disponibilização de recursos e pelo apoio prestado, a minha gratidão.

À minha família, entretanto alargada, pela ajuda e pela paciência nas privações a que a submeti, o mais profundo carinho.

iii. Sumário

	Pág.
iv. Resumo	9
v. Abstract	13
vi. Lista de Abreviaturas e Símbolos Mais Utilizados	17
I INTRODUÇÃO	19
1 Efeitos Da Anestesia, Sedação e Analgesia Em Ser Imaturo – Estado Da Arte	20
1.1 Anestesia/Analgesia/Sedação: Etimologia e Conceitos	20
1.2 Ser Imaturo – Considerações Gerais	21
1.3 Anestesia, Analgesia e Sedação no Período Neonatal para Lactente Cirúrgico	23
1.4 Efeitos Sobre o SNC de Anestésicos/Sedativos/Analgésicos em Período de Imaturidade Cerebral	37
1.4.1 Estudos Experimentais	37
1.4.1.1 Mecanismos Possíveis de Neurotoxicidade dos Anestésicos em Período de Vulnerabilidade do SNC	43
1.4.1.2 Modelos de Estudo	45
1.4.2 Estudos em Humanos	47
1.5 Morbimortalidade em Anestesia Pediátrica	49
1.6 Conclusões e Definição do Problema	50
2 OBJETIVOS	51
II ESTUDOS DE CONTRIBUTO PESSOAL	53
ESTUDO A EFEITOS NO RATO INFANTIL DA INJEÇÃO REPETIDA DE FENTANIL OU MIDAZOLAM NO PERÍODO DE RECÉM-NASCIDO EM CONTEXTO DE STRESSE CIRÚRGICO	
A.1 Justificação do Estudo	55
A.2 Objetivos	57
A.3 Materiais e Métodos	57
A.4 Resultados	66
A.5 Discussão	79
A.6 Conclusões	88

ESTUDO B ANESTESIA PEDIÁTRICA EM PERÍODO DE IMATURIDADE CEREBRAL E PERTURBAÇÕES DO NEURODESENVOLVIMENTO - REVISÃO SISTEMÁTICA	
B.1 Justificação do Estudo	91
B.2 Objetivos	91
B.3 Métodos	91
B.4 Resultados	92
B.5 Discussão	98
B.6 Conclusões	100
ESTUDO C MORBIMORTALIDADE PERIOPERATÓRIA NO PRIMEIRO ANO DE IDADE - REVISÃO SISTEMÁTICA (1997-2012)	
C.1 Justificação do Estudo	101
C.2 Objetivos	101
C.3 Métodos	102
C.4 Resultados	103
C.5 Discussão	114
C.6 Conclusões	117
ESTUDO D MORBIMORTALIDADE EM ANESTESIA/CIRURGIA NEONATAL: ANÁLISE DE FATORES DE RISCO DE MORTALIDADE PRECOCE E DE COMPLICAÇÕES OPERATÓRIAS NUM SISTEMA OTIMIZADO DE PRESTAÇÃO DE CUIDADOS DE SAÚDE AO RECÉM-NASCIDO CIRÚRGICO	
D.1 Justificação do Estudo	119
D.2 Objetivos	120
D.3 Métodos	120
D.4 Resultados	123
D.5 Discussão	133
D.6 Conclusões	138
III CONSIDERAÇÕES FINAIS	141
1 Discussão Conjunta	141
2 Conclusão Final	146
3 Perspetivas Futuras	147
IV REFERÊNCIAS	149

iv. Resumo

Efeitos da Anestesia, Analgesia e Sedação em Ser Imaturo Estudo Experimental e Clínico

Catré D

Anualmente milhões de fetos e recém-nascidos humanos são expostos, direta ou indiretamente, a anestésicos gerais/sedativos ou analgésicos para alívio da dor e stresse cirúrgicos. As principais preocupações nesta área são dominadas pela percepção do aumento de risco de morbimortalidade e de efeitos nóxios potenciais no neurodesenvolvimento, originados pela anestesia/analgesia/sedação (A/A/S) utilizada em fase de imaturidade geral e designadamente do sistema nervoso central. Os efeitos da A/A/S, administrada a crianças jovens, e em particular a neonatos com patologia cirúrgica de risco, estão ainda insuficientemente estudados neste subgrupo pediátrico. O objetivo principal desta Tese foi contribuir para a fundamentação científica do tema, através da realização de um conjunto de estudos de índole experimental (Estudo A) e clínica (Estudos B a D).

O nosso estudo experimental (Estudo A) levanta questões importantes relativas ao impacto no neurodesenvolvimento do ser imaturo exposto a midazolam ou fentanil, fármacos amplamente usados no contexto clínico estudado (neonatos internados em unidades de cuidados intensivos pediátricas submetidos a cirurgia sob anestesia). Utilizando um modelo murino neonatal de dor incisional pós-operatória constituíram-se 4 grupos experimentais: (1) fentanil, (2) midazolam, (3) sham e (4) não-operado, cujo desenvolvimento físico e comportamento foram avaliados ao longo do estudo após administração repetida dos fármacos teste. No final da experiência foi também realizado estudo histopatológico e histomorfométrico de áreas do córtex peri-rinal, giro dentado do hipocampo e cerebelo. Os nossos resultados sugerem que a administração repetida de fentanil ou de midazolam a ratos submetidos a stresse cirúrgico em fase de imaturidade cerebral alterou o crescimento e o desenvolvimento normais, tendo tido impacto variável, positivo ou negativo, nos diferentes parâmetros estudados, sendo de destacar aspetos globalmente positivos para o fentanil, com melhoria de aquisição de competências cognitivas (memória), e desfavoráveis para o midazolam que afetou negativamente a memória e o comportamento ansioso.

Os estudos B e C tiveram, respetivamente, como objetivos (Estudo B) analisar os resultados e conclusões de estudos epidemiológicos publicados na literatura sobre perturbações persistentes do neurodesenvolvimento após exposição a anestésicos de crianças em fase de imaturidade cerebral e (Estudo C) analisar o perfil epidemiológico da morbimortalidade relacionada com a anestesia geral e cirurgia no primeiro ano de idade e em particular no período neonatal (primeiro mês de idade), utilizando o método de revisão sistemática da literatura. No Estudo B, a análise das publicações revelou estudos com numerosas limitações e conclusões discordantes que fazem com que a informação reportada ainda se considere insuficiente para mudar a prática clínica atual e no Estudo C observou-se grande variabilidade nos índices de mortalidade e morbidade na faixa etária em análise, bem como nos seus subgrupos. No entanto, apesar da óbvia heterogeneidade metodológica e ausência de estudos específicos, os perfis epidemiológicos de morbimortalidade relacionada com a anestesia de crianças no primeiro ano de idade mostram frequência mais alta nesta faixa etária, com os maiores picos de incidência na anestesia de neonatos.

O estudo D teve como objetivo a análise da morbimortalidade numa ampla coorte de recém-nascidos submetidos a cirurgia neonatal sob anestesia geral num centro regional de referência em Portugal, em contexto de cuidados otimizados de saúde para esta população. O recurso a análise estatística utilizando o método de regressão logística permitiu determinar fatores de risco independentes para mortalidade e fatores de risco independentes para complicações pós-operatórias graves (graus III a V na classificação de Clavien-Dindo) nos primeiros 30 dias após a cirurgia neonatal. Entre os resultados relevantes encontrou-se taxa de mortalidade intra-hospitalar de 6,4%, o que está dentro da prevalência encontrada em países desenvolvidos. A mortalidade e as complicações pós-operatórias graves após cirurgias neonatais sob anestesia geral nos primeiros 30 dias de pós-operatório foram respetivamente de 5% e 23%. As variáveis classificação de estado físico ASA 3 ou superior e enterocolite necrosante/perfuração gastrointestinal foram identificadas como fatores de risco independentes para mortalidade pós-operatória precoce neonatal e as variáveis mais do que uma intervenção, reparação cirúrgica de hérnia diafragmática congénita, prematuridade com menos de 32 semanas de gestação e cirurgia abdominal foram identificadas como fatores de risco independentes para complicações graves após a anestesia/cirurgia neonatal.

O nosso contributo pessoal de índole experimental pode contribuir para apoiar o uso neonatal de fentanil, quando indicado, ou seja, em ambientes pós-cirúrgicos,

incluindo em recém-nascidos prematuros. No que se refere ao midazolam a sua utilização deverá ser restringida à menor exposição possível, até esclarecimento dos seus efeitos no neurodesenvolvimento humano. No entanto, a extrapolação dos nossos dados para o contexto clínico deve ser feita com cautela, como em qualquer estudo com animais. O contributo providenciado pelos estudos clínicos, ao sistematizar as informações disponíveis e estabelecer fatores de risco independentes, pode ajudar os profissionais de saúde a orientar as intervenções para melhoria de resultados e definir o prognóstico pós-operatório em neonatos com patologia cirúrgica.

Palavras-Chave: Anestesia/Analgesia/Sedação; Imaturo; Neonatal; Morbimortalidade; Fentanil; Midazolam; Rato.

v. Abstract

Anesthesia, Analgesia and Sedation Effects in the Immature Being Experimental and Clinical Study

Catré D

Every year millions of fetuses and newborn humans are exposed, directly or indirectly, to general anesthetics/analgesics /sedatives for pain relief and surgical stress. The main concerns in this area come from the perception of increased risk of morbidity and potential neurodevelopmental effects induced by anesthesia/analgesia/sedation (A/A/S) used during immaturity specially of the central nervous system. The effects of A/A/S, administered to young infants, particularly neonates with higher risk surgical pathology, are not yet sufficiently studied. The main objective of this thesis was to contribute to the scientific knowledge in this field, by conducting a series of studies of experimental (Study A) and clinical (Studies B to D) nature.

Our experimental study (Study A) raises important questions about the impact on the neurodevelopment of immature beings exposed to midazolam or fentanyl , drugs widely used in the clinical setting further studied in this context (neonates hospitalized in pediatric intensive care units undergoing surgery under anesthesia). Using a murine model of neonatal postoperative pain, pups were divided into four groups: (1) fentanyl, (2) midazolam, (3) sham and (4) non-operated, whose physical development and behavior were evaluated over the study period after repeated administration of the test drug. At the end of the experiment, histopathological and histomorphometric study of areas of peri-rhinal cortex, dentate gyrus of the hippocampus and cerebellum was also conducted. Our results suggest that repeated administration of fentanyl or midazolam to rats subjected to surgical stress during brain immaturity altered the normal growth and development, with variable impact, either positive or negative, on the different parameters studied, with emphasis on globally positive findings for fentanyl, with improved acquisition of cognitive skills (memory) and unfavorable findings for midazolam which negatively affected memory and anxious behavior.

Studies B and C, respectively , aimed (Study B) to analyze the results and conclusions of epidemiological studies published in literature on persistent neurodevelopmental disorders following exposure of children during brain immaturity

to anesthetics and (Study C) to analyze the epidemiological profile of morbidity and mortality related to anesthesia and surgery in the first year of age and particularly in the neonatal period (first month of age), through a systematic review of the literature. In Study B, analysis of publications revealed studies with conflicting conclusions and numerous limitations that make the information reported still deemed insufficient to change current clinical practice and, in Study C, a great variability was observed in rates of mortality and morbidity in the age in analysis, as well as in its subgroups. However, despite the obvious methodological heterogeneity and absence of specific studies, epidemiological profiles of morbidity and mortality related to anesthesia in children in the first year of age showed higher frequency in this age group, with the highest peaks of incidence for neonates.

Study D aimed to analyze the morbidity and mortality in a large cohort of infants undergoing neonatal surgery under general anesthesia in a regional center of reference in Portugal, in the context of optimal health care for this population. The use of statistical analysis using the logistic regression method allowed the determination of independent risk factors for mortality and for severe postoperative complications (grades III to V in the Clavien - Dindo classification) in the first 30 days after neonatal surgery. Among the relevant results, a 6.4 % rate of in-hospital mortality was found, which is within the prevalence reported by developed countries. Mortality and severe postoperative complications in the first 30 days after neonatal surgeries under general anesthesia were respectively 5% and 23%. Variables ASA physical status 3 or higher and necrotizing enterocolitis/gastrointestinal perforation were identified as independent risk factors for early neonatal postoperative mortality and variables more than one intervention, surgical repair of congenital diaphragmatic hernia, prematurity under 32 weeks gestational age and abdominal surgery were identified as independent risk factors for severe complications after neonatal anesthesia/surgery.

Our personal contribution of experimental nature can help support the neonatal use of fentanyl, when indicated, in post-surgical settings, including in premature neonates. With regard to midazolam, its use should be restricted to the lowest exposure possible until its effects on human brain development are better clarified. However, extrapolation of our data to the clinical context should be done with caution as in any animal study. The contribution provided by the clinical studies, by systematizing the available information and establishing independent risk factors can help health

professionals to improve results and to better define the postoperative outcome in neonates with surgical pathology.

Keywords: Anesthesia/Analgesia/Sedation; Immature; Neonatal; Morbimortality; Fentanyl; Midazolam; Rat.

vi. Lista de Abreviaturas e Símbolos Mais Utilizados

µg	Microgramas
µm	Micrómetros
A/A/S	Anestesia/Analgesia/Sedação
BO	Bloco operatório
CAM	Concentração alveolar mínima
CGrI	Camada granular interna do cerebello
Classe ASA	Classificação do estado físico da Sociedade Americana de Anestesiologistas (<i>American Society of Anesthesiologists</i>)
cm	Centímetros
cP	Células de Purkinje
CPR	Córtex peri-rinal
d	Dias
DP	Desvio padrão
ev	Endovenoso
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Fent	Fentanil
FMUC	Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra
G IG	Grande para a idade de gestação
g	Gramas
GABA	Ácido gama-aminobutírico
h	Horas
HPC	Hospital Pediátrico de Coimbra
IC	Intervalo de confiança
id	Veze por dia
IG	Idade de gestação
Ip	Intraperitoneal
IQ	Diferença interquartis
IRno	Índice de reconhecimento de um novo objeto
Kg	Quilogramas
LCE	Labirinto em cruz elevado
Mdz	Midazolam
mg	Miligramas

min	Minutos
mL	Mililitros
n	Número de casos
NEC	Enterocolite necrosante
NMDA	N-metil-D-aspartato
OCDE	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico
OR	<i>Odds ratio</i>
P IG	Pequeno para a idade de gestação
Px	Dia pós-nascimento x
RN	Recém-nascido
sc	Subcutâneo
seg	Segundos
SNC	Sistema nervoso central
UCIP	Unidade de cuidados intensivos do Hospital Pediátrico de Coimbra
UCPA	Unidade de cuidados pós-anestésicos

I

INTRODUÇÃO

Anualmente milhões de fetos e recém-nascidos humanos são expostos, direta ou indiretamente, a anestésicos gerais/sedativos ou analgésicos. A preocupação legítima sobre os efeitos indesejáveis da exposição precoce destes seres, de reconhecida imaturidade fisiológica, mantém-se atual, existindo na literatura científica abundante informação, embora controversa, sobre tais efeitos. No centro das questões mais focadas nas últimas décadas estão os efeitos de neurotoxicidade potencial de anestésicos e o maior risco de morbimortalidade a que ficam sujeitas crianças jovens e em particular neonatos gravemente doentes submetidos a cirurgia sob anestesia geral em fase de imaturidade dos seus sistemas e órgãos, particularmente em fase de imaturidade do sistema nervoso central (SNC).

A tese “Efeitos da Anestesia, Sedação e Analgesia Em Ser Imaturo. Estudo Experimental e Clínico” pretende contribuir para o conhecimento de efeitos da anestesia/analgesia/sedação (A/A/S) em fase de imaturidade do SNC, através da investigação de índole translacional e clínica incidindo em período muito precoce da vida pós-neonatal.

Esta Tese está estruturada da seguinte forma:

- Capítulo I: apresenta o estado da arte e revisão da literatura científica sobre o tema. Nele é realizada a explanação teórica do tema, como a definição etimológica dos termos, evolução histórica da anestesia pediátrica, indicações cirúrgicas para anestesia neonatal e aspetos da fisiologia neonatal relevantes na vulnerabilidade característica deste grupo etário à anestesia, à dor e ao stresse cirúrgico. Através da revisão da literatura sobre os efeitos da anestesia, sedação e analgesia identificam-se lacunas de conhecimento, orientando para os estudos de contributo pessoal.

- Capítulo II: inclui o contributo pessoal, apresentando 4 estudos de investigação.

O Estudo A, “Efeitos no Rato em Crescimento da Injeção Repetida de Fentanil ou Midazolam no Período de Recém-nascido em Contexto de Stresse Cirúrgico”, realizado em modelo animal, verifica o impacto no neurodesenvolvimento do ser

imaturidade exposto a midazolam ou fentanil, fármacos amplamente usados no contexto clínico estudado (neonatos internados em unidades pediátricas de cuidados intensivos submetidos a cirurgia sob anestesia).

O Estudo B, “Anestesia Pediátrica em Período de Imaturidade Cerebral e Perturbações do Neurodesenvolvimento: Revisão Sistemática“, analisa os resultados e conclusões de estudos epidemiológicos publicados na literatura sobre perturbações persistentes do neurodesenvolvimento após exposição a anestésicos de crianças em fase de imaturidade cerebral, utilizando o método de revisão sistemática da literatura.

O Estudo C, “Morbimortalidade Perioperatória no Primeiro Ano de Idade: Revisão Sistemática (1997-2012)”, analisa o perfil epidemiológico da morbimortalidade relacionada com a anestesia geral e cirurgia no primeiro ano de idade, e em particular no período neonatal (primeiro mês de idade), utilizando o método de revisão sistemática da literatura respeitante aos últimos 15 anos.

O Estudo D, “Morbimortalidade em Anestesia/Cirurgia Neonatal”, examina os fatores de risco de mortalidade precoce e complicações operatórias num sistema otimizado de prestação de cuidados de saúde ao recém-nascido cirúrgico, analisando por método de regressão logística múltipla a morbimortalidade numa ampla coorte de recém-nascidos submetidos a cirurgia neonatal sob anestesia geral em centro regional de referência em Portugal.

- Capítulo III: apresenta as considerações finais, conclusão final e perspetivas futuras.

1 EFEITOS DA ANESTESIA, SEDAÇÃO E ANALGESIA EM SER IMATURO – ESTADO DA ARTE

1.1 Anestesia/Analgesia/Sedação: Etimologia e Conceitos

Anestesia e analgesia, duas palavras originárias do grego “*anaesthesia*” e “*analgesia*”, significam insensibilidade e sedação, do latim “*sedatione*”, significa ação de abrandar.¹

A origem da palavra anestesia atribuiu-se ao filósofo grego Pedanius Dioscorides de Anazarbus, residente em Roma, que a usou pela primeira vez no ano 50 d.c. para descrever o efeito narcótico da planta mandrágora utilizada para auxiliar uma

cirurgia.² O termo “anestesia” com significado clínico próximo do atual foi proposto em 1846 pelo neurologista, filósofo e poeta Oliver Wendell Holmes em carta a William T. G. Morton,³ considerado um dos pais desta área de especialização médica.

Os conceitos anestesia, analgesia e sedação estão intimamente ligados. Na atividade clínica são técnicas utilizadas em diferentes contextos que procuram garantir a inocuidade da execução de intervenções terapêuticas ou diagnósticas tanto perturbadoras quanto dolorosas. Diversos autores, incluindo a Associação Americana de Anestesia (ASA) em 2009,⁴ procuraram definir os conceitos algo ambíguos de anestesia geral, sedação e analgesia. Segundo a ASA, anestesia geral corresponde a perda de consciência induzida por fármacos durante a qual o doente não é despertável, mesmo por estímulos dolorosos. Por outras palavras, trata-se de uma depressão reversível do sistema nervoso central induzida por fármacos que resulta em perda de resposta e percepção de todos os estímulos externos.⁵ De acordo com a ASA, sedação define-se como um estado induzido por fármacos que altera a coordenação e função cognitiva, e, consoante a profundidade, pode afetar também a consciência, a patência da via aérea, a ventilação e a função cardiovascular, considerando-se que sedação é um estado que faz parte de um processo contínuo, que inclui progressivamente sedação mínima (“ansiólise”), sedação moderada (“sedação consciente”) e sedação profunda, podendo culminar em anestesia geral. Segundo Tavares J,⁶ analgesia define-se como insensibilidade dolorosa sem supressão de outras modalidades de sensação.

1.2 Ser Imaturo – Considerações Gerais

Imaturo (do latim *immatūru*), significa que o ser ainda não atingiu o seu desenvolvimento (físico, psicológico e/ou emocional) completo.¹ Em relação à anestesia, as fases de imaturidade no ser humano não se limitam ao período de gestação, mas incluem também os grupos etários pediátricos mais jovens, desde o período de recém-nascido até aproximadamente os 8 a 10 anos de idade, quando se completa o desenvolvimento pulmonar.

A idade pediátrica de maior potencial de morbimortalidade em anestesia engloba o primeiro ano de vida (lactente), onde o risco anestésico se estende em decrescendo desde o nascimento. Os grupos mais críticos incluem os recém-nascidos de extrema prematuridade (no limite de viabilidade) e de extremo baixo peso, com o período de

maior risco estendendo-se desde o nascimento (risco máximo) até às 60 semanas pós-conceção (cerca dos 6 meses de idade).⁷ O risco anestésico no período neonatal, isto é, nos primeiros 28 dias de vida (Tabela I.1) advém da imaturidade de vários órgãos e sistemas e da diminuição da capacidade de mecanismos homeostáticos regularem adequadamente o meio interno.⁸ Neste período, especialmente nos primeiros dias de vida, ocorre um conjunto de transformações fisiológicas para adaptação à vida extrauterina e é também nesta fase que o desenvolvimento de maturação de órgãos e sistemas fisiológicos é mais intenso, nomeadamente a nível do sistema nervoso central (SNC).

Na Tabela I.1 apresenta-se um conjunto de definições referentes ao recém-nascido humano, designadamente com exposição de atributos que influenciam as tomadas de decisão em anestesia neonatal e na Tabela I.2 apresentam-se as características fisiológicas do ser imaturo que mais influenciam o desenvolvimento das manifestações patológicas características deste grupo etário de risco.

Tabela I.1 - Definições Referentes ao Recém-nascido Humano

Característica	Definição
RN (Idade neonatal)	Primeiro mês de vida (até aos 28 dias de idade)
Idade neonatal precoce	Primeira semana de vida (< 8 dias de idade)
RN de termo	IG \geq 37 semanas
RN prematuro	IG < 37 semanas completas
RN grande prematuro	IG 22 a 27 semanas
Baixo peso ao nascer	PN < 2500g
Muito baixo peso	PN < 1500g
Extremo baixo peso [#]	PN < 1000g
Micronato [#]	PN < 800g
Pequeno para a idade de gestação	PN < percentil 10 para a IG
Grande para a idade de gestação	PN > percentil 90 para a IG

RN = recém-nascido; g= gramas; s= semanas; IG= idade de gestação ao nascer; PN= peso de nascimento; [#] definição de Lee *et al.*⁸

Tabela I.2 - Variáveis fisiológicas e suas manifestações patológicas em ser imaturo

Variável fisiológica	Manifestação Patológica
Pele fina	Evaporação de água transepitelial
Deficiente insulação e termorregulação	Perda de calor – hipotermia
Imaturidade renal	Desequilíbrio hidroeletrólítico

Fragilidade da matriz vascular germinativa/deficiente regulação vascular cerebral	Hemorragia intraventricular
Necessidades de oxigénio/Retina imatura	Retinopatia da prematuridade
Circulação “de transição”	Persistência de <i>shunts</i> fetais patentes
Deficiência em surfactante	Doença de membrana hialina
Imaturidade pulmonar (requerendo oxigénio e ventilação mecânica)	Displasia broncopulmonar
Imaturidade gastrointestinal	Enterocolite necrosante

Adaptado de Lee HL, Jain L. Physiology of infants with very low birth weight. *Semin Pediatr Surg.* 2000 May;9(2):50-5.⁸

1.3 Anestesia, Analgesia e Sedação no Período Neonatal para Lactente Cirúrgico

A anestesia pediátrica (e neonatal) como área de especialização médica foi sendo gradualmente reconhecida ao longo do século XX,⁹⁻¹¹ deixando de se olhar para a criança como um adulto em miniatura. Em particular, desde os finais da década de cinquenta até à atualidade verificaram-se grandes avanços no conhecimento da fisiologia de órgãos e sistemas imaturos, evolução técnica com miniaturização de equipamentos e instrumentos anestesiológicos e cirúrgicos e monitorização eletrónica de parâmetros vitais durante a anestesia e equipas altamente diferenciadas na prestação de cuidados de saúde em neonatologia atuando em centros terciários.¹² Assim, a sobrevivência atual de neonatos sujeitos a anestesia geral, mesmo em situações de extrema fragilidade, é consideravelmente superior à de meados do século XX. Infelizmente, os avanços na compreensão da fisiologia da dor do recém-nascido foram mais tardios e levaram a um atraso na implementação correta da analgesia. Só recentemente foi dada a devida importância à analgesia do recém-nascido, descurada até ao início de 1980 por se acreditar que neste grupo etário faltava o substrato neurológico necessário para a perceção de dor, por falta de mielinização, existência de vias dolorosas incompletas e imaturidade do córtex cerebral do recém-nascido.¹³ No virar do milénio novos desafios foram apresentados à anestesiologia neonatal, designadamente os da anestesia para cirurgia minimamente invasiva,¹⁴ cada vez mais frequente. No presente, a anestesia para cirurgia fetal por métodos endoscópicos ou aberta é já uma realidade,¹⁵ com a colocação de novos problemas. As principais indicações para intervenção anestesiológica no período neonatal estão listadas na Tabela I.3.

Tabela I.3 - Condições cirúrgicas mais frequentes que requerem anestesia geral no período neonatal

Patologia/procedimentos

Atresia do esôfago/fístula traqueoesofágicaⁱ

Hérnia diafragmática congênitaⁱⁱ

Onfalocelo/Gastrosquisisⁱⁱⁱ

Estenose hipertrófica do piloro

Abdômen agudo do recém-nascido^{iv}

Enterocolite necrosante^v

Atresias intestinais (incluindo malformações anorretais)

Anomalias de fixação/rotação intestinal

ⁱ Lopes MF¹⁶ refere que das cinco variantes anatómicas habituais de atresia do esôfago/ fístula traqueoesofágica (AE/FTE), a AE associada a FTE distal está presente em cerca de 85% dos casos, é habitualmente de hiato curto, o que permite a reparação da AE no período de recém-nascido (laqueação da FTE e anastomose esofágica primária por toracotomia ou toracoscopia), ao contrário da AE isolada que é geralmente de hiato-longo e em que a intervenção em recém-nascido se limita à gastrostomia. Pinheiro *et al.*¹⁷ afirmam que o tratamento cirúrgico da AE é considerado uma urgência, mas não uma emergência, exceto em prematuro com dificuldade respiratória e que os cuidados anestésicos se focam na minimização de ventilação através da FTE, geralmente colocando a extremidade do tubo endotraqueal distal à fístula para que se evite a distensão/perfuração gástrica e consequente compromisso ventilatório. Mais de 50% das crianças apresentam outras malformações associadas, algumas potencialmente letais, as quais são responsáveis pela atual baixa mortalidade associada à AE.

ⁱⁱ Wójcicki e Drozdowski¹⁸ afirmam que a ocorrência de hérnia diafragmática congênita está associada a alta mortalidade e morbidade, relacionada com a gravidade da hipoplasia pulmonar e da hipertensão arterial pulmonar. Ruano *et al.*¹⁹ referem que a hérnia diafragmática congênita pode ser diagnosticada com precisão por volta do segundo trimestre de gravidez por ultrassonografia e afirmam que a oclusão traqueal do feto, por intervenção fetoscópica precoce nas situações de grave hipoplasia pulmonar, aumenta a sobrevivência da criança após a cirurgia neonatal de encerramento do orifício herniário diafragmático.

ⁱⁱⁱ Christison-Lagay *et al.*²⁰ referem que o onfalocelo (defeito no umbigo e vísceras abdominais cobertas por saco) e o gastrosquisis (defeito paraumbilical, habitualmente à esquerda, e vísceras abdominais sem saco) são os defeitos congênitos *major* da parede abdominal mais frequentes e que o prognóstico se relaciona com as malformações associadas ao onfalocelo e com o grau de lesão do intestino no gastrosquisis. O tratamento cirúrgico de ambas as situações consiste no encerramento do defeito de parede nos primeiros dias de vida pós-natal, primário, ou utilizando um silo temporário.

^{iv} de la Hunt²¹ refere que o abdômen agudo do recém-nascido é causa frequente de internamento em cuidados intensivos pediátricos, podendo ocorrer numa ampla variedade de patologias congênitas, mecânicas (atresias intestinais, anomalias de rotação intestinal, mecônio espesso, entre outras), ou funcionais, representadas por patologias da inervação intestinal (Doença de Hirschsprung), ou pode ser adquirida e associada a peritonite/perfuração, como na enterocolite necrosante.

^v Fitzgibbons *et al.*²² referem que a enterocolite necrosante é uma patologia gastrointestinal sistêmica devastadora do recém-nascido, em que a taxa de mortalidade intra-hospitalar permanece elevada e significativamente relacionada com o grau de baixo peso de nascimento. Hillier *et al.*²³ afirmam que os principais desafios da intervenção anestésica intraoperatória incluem a frequente extrema prematuridade, distensão abdominal pronunciada, instabilidade hemodinâmica, acidose, insuficiência respiratória, sepsis, coagulopatia, desequilíbrios eletrolíticos e canal arterial patente com necessidade de monitorização hemodinâmica e laboratorial e apoio farmacológico frequente incluindo o recurso a inotrópicos, fármacos para ressuscitação e transfusão de concentrado de glóbulos ou plasma.

Doença de Hirschsprung
Hérnia inguinal encarcerada
Persistência de canal arterial patente ^{vi}
Mielomeningocele ^{vii}
Derivação ventriculoperitoneal
Cistoscopia/Excisão de válvulas da uretra posterior
Torção do testículo
Cateterismo cardíaco diagnóstico/de intervenção ^{viii}
Estudo imagiológico (ressonância magnética)
Acesso venoso central

A maioria das situações referidas na Tabela I.3 requer cuidados em ambiente hospitalar muito diferenciado, dotado de profissionais treinados, infraestruturas e processos adequados para garantir uma prática anestesiológica segura. No período neonatal, o stresse provocado pela patologia cirúrgica e os efeitos dos fármacos utilizados em anestesia, sedação ou analgesia associados às transformações da adaptação à vida extrauterina e à imaturidade fisiológica de diversos sistemas podem ter consequências nefastas e mesmo colocar em risco a vida do doente. Tal não invalida que, mesmo em situações extremas de prematuridade e de gravidade de doença, os recém-nascidos cirúrgicos devam ter o tratamento adequado da dor e devam ser anestesiados, sendo que a probabilidade de analgesia ou anestesia com menor risco relativo ocorrerá se houver conhecimento da fisiologia do imaturo e se se prestar a devida atenção ao detalhe.²⁸ Neste contexto é prudente escolher fármacos e técnicas que providenciem a anestesia ideal e minimizem as alterações hemodinâmicas, de trocas gasosas e de ventilação no contexto da cirurgia.²⁹

Nenhum dos agentes anestésicos disponíveis atualmente preenche, em concentrações seguras, os requisitos do anestésico ideal, ou seja, de um fármaco com ação previsível, não tóxico nas concentrações usadas clinicamente, metabolicamente

^{vi} Clyman *et al.*²⁴ estimam que 70% dos grandes prematuros são candidatos a toracotomia no período neonatal para laqueação de canal arterial patente (hipotensão persistente e aumento da necessidade de apoio ventilatório).

^{vii} Peiró e Encinas²⁵ descrevem o mielomeningocele como um defeito no encerramento do tubo neural, com graves consequências neurológicas, urológicas, funcionais e cognitivas. Adzich²⁶ refere que o tratamento pós-natal consiste no encerramento do canal vertebral ao nascimento, sendo necessárias medidas de apoio médico, ao longo da vida. Cerca de 85% dos casos requerem uma derivação ventriculoperitoneal.

^{viii} Martins e Castela²⁷ referem a septostomia com balão como procedimento paliativo eficaz e seguro na criação de uma comunicação interauricular duradoura na transposição das grandes artérias.

inerte, rapidamente eliminado e capaz de induzir inconsciência, analgesia e relaxamento muscular adequados para todos os procedimentos cirúrgicos. Assim, na ausência deste fármaco ideal, geralmente são usadas combinações de diferentes agentes para atingir as condições pretendidas. Esta abordagem por um lado minimiza o risco de toxicidade por permitir o uso de doses menores de cada fármaco, mas por outro lado expõe a criança a um conjunto maior de efeitos adversos. Dadas as diferenças farmacológicas observadas na idade pediátrica, sobretudo nos neonatos pelas diferenças farmacocinéticas associadas à imaturidade e à disfunção de órgãos, verificou-se um grande interesse no desenvolvimento de fármacos de duração de ação mais curta no sentido de aumentar a segurança mantendo a eficácia da anestesia no intraoperatório e da analgesia pós-operatória.³⁰

O papel da importância da A/A/S para procedimentos invasivos e no perioperatório do recém-nascido tem vindo a ser reafirmado nos últimos 30 anos, quando se compreendeu que este ser, embora imaturo, sente dor e responde de maneira considerável ao stresse cirúrgico e a procedimentos médicos causadores de desconforto, medo, ansiedade e stresse.^{31,32}

Assim, um dos pilares nos cuidados perioperatórios a RN com doença crítica é providenciar anestesia ou sedação, amnésia e ansiólise seguras, conforme a necessidade, e analgesia adequada, utilizando medidas farmacológicas e não farmacológicas.³³

Na prática atual, excetuando casos muito específicos, a anestesia é mais comumente usada no bloco operatório e a sedação em cuidados intensivos, sendo a analgesia comum aos dois. Uma vez que o aumentar da profundidade de sedação pode culminar em anestesia geral,⁴ a maioria dos agentes hipnóticos pode ser usada tanto para anestesia como sedação, dependendo o efeito da dose usada.

A anestesia tem o objetivo de prevenir a dor e as respostas ao stresse e suas sequelas, mantendo a homeostasia fisiológica,³⁴ além de permitir um melhor controlo dos parâmetros respiratórios e cardiovasculares.³⁵ É bem reconhecida a influência no aumento da morbidade e mortalidade perioperatória de ser imaturo exposto a estímulos nocivos sem o adequado controlo analgésico e anestésico, designadamente aumento das complicações circulatórias, respiratórias e metabólicas.³⁶

A anestesia geral é administrada na grande maioria dos casos por via inalatória, intravenosa ou de forma balanceada usando agentes através destas duas formas de administração. Na sua forma mais frequente, a anestesia geral para cirurgia pode ser dividida em três fases genéricas: indução, manutenção e recobro, por vezes precedidas

por medicação pré-anestésica na enfermaria com objetivo ansiolítico em crianças mais velhas. A fase de indução tem como objetivo atingir inconsciência de forma rápida e suave com condições para abordagem da via aérea e início da cirurgia sem reação do doente. Os fármacos usados nesta fase são habitualmente administrados em *bolus* e consistem em hipnóticos endovenosos ou agentes inalatórios para induzir inconsciência, opióides, que permitem geralmente diminuir a dose necessária dos hipnóticos enquanto produzem analgesia, e, quando indicados, relaxantes musculares para permitir a intubação traqueal e melhorar as condições cirúrgicas. A manutenção da anestesia geral é usualmente conseguida através de uma combinação de administração contínua de um agente anestésico inalatório ou endovenoso e de perfusão ou *bolus* de um agente analgésico opióide (geralmente fentanil ou seu derivado) por via endovenosa. Nesta fase podem também ser administradas doses adicionais de relaxantes musculares e são iniciados fármacos analgésicos cuja ação se pretende que dure no pós-operatório. O recobro imediato da anestesia geralmente é conseguido interrompendo a administração dos agentes usados na manutenção, sendo necessário por vezes usar fármacos para reversão dos seus efeitos (neostigmina, sugammadex, naloxona, flumazenil). Assim, mesmo para os procedimentos cirúrgicos mais simples, são administrados pelo menos 4 a 5 fármacos.

O papel da analgesia, iniciada no intraoperatório e continuada no pós-operatório, que nesta faixa etária decorre geralmente em ambiente de cuidados intensivos, tem assumido importância crescente, sendo atualmente parte integrante do tratamento destas crianças.³⁷ Na realidade, a dor não é um fenómeno passivo resultante da transferência de um estímulo periférico para um centro no córtex, mas sim um processo ativo combinado, gerado em parte periféricamente e em parte no córtex, com múltiplas mudanças plásticas que em conjunto resultam numa experiência multidimensional que envolve componentes dos foros sensorio-discriminativo, afetivo-motivacional e cognitivo.³⁸ Múltiplas evidências sugerem que esta plasticidade do cérebro imaturo em resposta à dor e stresse pode originar anomalias na sensibilidade à dor e alterações neuroanatômicas cerebrais e de comportamento futuras.³⁹ Por este motivo, a analgesia é atualmente uma prioridade no tratamento de RN em ambiente de cuidados intensivos e é olhado como o quinto sinal vital, devendo ser mensurado através de escalas de dor pediátricas como “Children's and Infants' Postoperative Pain Scale” (CHIPPS), CRIES, COMFORT e “Premature Infant Pain Profile” (PIPP).⁴⁰

Critérios éticos, morais, humanitários e fisiológicos indicam que a dor deve ser alvo de atuação preventiva e, quando presente, deve ser efetivamente controlada em todas as crianças, seja qual for a idade, maturidade ou gravidade da doença.⁴¹ Cresce a evidência científica de que esta atuação ajuda a minimizar problemas emocionais como a ansiedade, previne o fenómeno de sensibilização do sistema nervoso central a estímulos nocivos e previne a libertação de mediadores tecidulares da dor, melhora a resposta ao stresse, reduz as necessidades operatórias de anestésicos e reduz a necessidade de analgesia pós-operatória.⁴² Por outro lado, o controlo efetivo da dor traz benefícios comprovados não só emocionais (normalização do sono e comportamento, prevenção da progressão para dor crónica) como físicos, nomeadamente levando a diminuição da mortalidade e morbidade após cirurgia *major* e a menor tempo de ventilação.

Relativamente à sedação pediátrica, geralmente associada a analgesia, é mais comumente necessária em ambiente de cuidados intensivos para conforto do doente e para providenciar condições ideais de realização de técnicas complementares de diagnóstico ou terapêutica. São causas de dor/stresse neste contexto a intubação traqueal e ventilação mecânica, aspiração traqueal, colocação e presença de acessos vasculares, drenos, sonda nasogástrica, etc. Os fármacos mais usados para sedação são os hipnóticos e opióides, isoladamente ou em combinação, sendo midazolam, fentanil e morfina os mais frequentemente administrados nas unidades de cuidados intensivos neonatais.⁴³ A via de administração é geralmente endovenosa, sendo preferida a perfusão à administração em *bolus* uma vez que mantém a concentração mais estável, embora possa estar associada a acumulação de fármaco com aumento do tempo de ação.

Os fármacos mais usados atualmente em A/A/S neonatal e as suas características mais relevantes^{30,44,45} estão sumariados nas Tabelas I.4 a I.9. Para cada fármaco são indicadas ainda as idades pediátricas em que o seu uso é autorizado, quer pela *Food and Drug Administration* (FDA) quer pelo Infarmed (informação obtida através da consulta dos respetivos Resumos das Características do Medicamento).

Tabela I.4 - Hipno-sedativos mais usados atualmente em anestesia/sedação neonatal e suas características mais relevantes

Etomidato	<p>Indução anestesia: ev 0,3mg/kg Vantagens: amnésia, menor efeito depressor cardiovascular. Desvantagens: dor à injeção, supressão adrenal, movimentos mioclônicos. Metabolização maioritariamente hepática. Eliminação renal. Licenciamento: FDA ≥ 10anos; Infarmed refere uso em crianças sem especificar idades.</p>
Cetamina	<p>Sedação: ev 0.5-1,5 mg/kg em <i>bolus</i> lento (1 minuto) (máximo: 2 mg/kg); IM 2-5 mg/kg (máximo: 6 mg/kg) Indução anestesia: ev 1-3 mg/kg; IM 3-10mg/kg Induz anestesia dissociativa. Vantagens: Analgesia, amnésia, broncodilatador, estimula sistema nervoso simpático (frequentemente hipertensor, embora possa ser depressor cardiovascular direto), versatilidade das vias de administração. Desvantagens: aumento da pressão intracraniana, alucinações (minimizadas pelo uso concomitante de benzodiazepinas), sialorreia (antagonizada por atropina), depressão respiratória se administrado rapidamente, por vezes broncospasmo nas crianças mais jovens. Metabolização hepática. Eliminação renal. Licenciamento: FDA ≥16 anos; Infarmed: informação omissa.</p>
Propofol	<p>Indução anestesia: ev 2,5-4 mg/kg (20-40 mg a cada 10 segundos até resposta); Manutenção: 9-15 mg/kg/h Sedação procedimentos diagnósticos/cirúrgicos: dose inicial 1-2mg/kg seguida de 1,5-4,5 mg/kg/h Vantagens: amnésia, ação curta. Desvantagens: apneia, sem analgesia, hipotensor, movimentos mioclônicos, dor à injeção. Doses elevadas e por períodos longos podem provocar “síndrome do propofol” com acidose metabólica, rabdomiólise e colapso cardiovascular, potencialmente fatal. Metabolização principalmente hepática. Eliminação renal. Licenciamento: FDA: indução ≥ 3anos, manutenção ≥2meses; Infarmed: autorizado para sedação curta, indução e manutenção de anestesia em crianças >1mês (10mg/mL) ou >3 anos (20 mg/mL) e sedação em UCI a partir dos 16 anos.</p>
Tiopental	<p>Indução anestesia: 5-8 mg/kg; RN 2-4 mg/kg Barbitúrico. Vantagens: amnésia, diminuição pressão intracraniana, anti-convulsivante Desvantagens: apneia, libertação histamina, contraindicado na hipovolemia. Usar com cuidado na presença de doença cardíaca, renal e no choque. Evitar no mal asmático e porfiria. Metabolização hepática. Eliminação renal. Licenciamento: FDA não aprovado para idade ≤ 18anos. Infarmed: informação omissa.</p>

Midazolam	<p>Sedação: ev em RN < 32 semanas de gestação 0,03 mg/kg/h; ev em RN > 32 semanas e crianças até 6 meses 0,06 mg/kg/h; ev > 6 meses Dose de carga: 0,05-0,2 mg/kg; Dose de manutenção: 0,06-0,12 mg/kg/h; retal 0,1-0,3 mg/kg; oral 0,1-0,5 mg/kg, nasal 0,2-0,4 mg/kg; perfusão ev (doentes ventilados) 0,06-0,3mg/kg/h.</p> <p>Vantagens: amnésia, versatilidade das vias de administração, anticonvulsivante.</p> <p>Desvantagens: potencial de apneia, hipotensão. Usar com cuidado na disfunção hepática, renal, cardíaca e respiratória. Potencia efeitos de depressores do sistema nervoso central, anestésicos e narcóticos. A terapêutica prolongada (1-2 semanas) pode causar síndrome de abstinência, pelo que se deve fazer desmame.</p> <p>Antagonizado por flumazenil.</p> <p>Metabolização hepática. Eliminação renal.</p> <p>Licenciamento: FDA: todas as idades para sedação com ventilação mecânica; oral para sedação a partir dos 6 meses; Infarmed: sedação consciente e medicação pré-anestésica ≥6meses; indução de anestesia – informação omissa; sedação em UCI - todas as idades.</p>
------------------	--

Ev= endovenoso; FDA= Food and drug administration; IM= intramuscular.

Tabela I.5 - Relaxantes musculares mais usados atualmente em anestesia neonatal e suas características mais relevantes

Atracúrio	<p>Dose inicial lactentes: 0,3-0,4 mg/kg. Manutenção: 0,1-0,2 mg/kg. Perfusão: 0,3-0,6 mg/kg/h</p> <p>Início ação 2-3minutos; pico 3-10 minutos; duração 20-35 minutos. Não necessita ajuste de dose na insuficiência renal e hepática.</p> <p>Metabolização por via de Hofmann (dependendo temperatura e pH).</p> <p>Associado a liberação moderada de histamina.</p> <p>Licenciamento: FDA e Infarmed ≥1mês.</p>
Cisatracúrio	<p>Dose inicial: 0,15 mg/kg. Manutenção: 0,03 mg/kg. Perfusão: 0,06-0,18 mg/kg/h</p> <p>Isómero único do atracúrio com maior potência, maior duração de ação e menor liberação de histamina.</p> <p>Duração 55 minutos.</p> <p>Metabolização por via de Hofmann (dependendo temperatura e pH).</p> <p>Licenciamento: FDA e Infarmed ≥ 1mês.</p>
Mivacúrio	<p>Dose inicial: 0,1-0,15 mg/kg dos 2 aos 6 meses; 0,1-0,2 mg/kg a partir dos 6 meses; manutenção: 0,1mg/kg; perfusão: 0,01-0,015 mg/kg/min</p> <p>Pico máximo de bloqueio 2 minutos; duração 6-16 minutos.</p> <p>Associado a alguma liberação de histamina.</p> <p>Metabolizado por colinesterases plasmáticas. Eliminação biliar e renal.</p> <p>Licenciamento: FDA ≥ 2 anos; Infarmed ≥ 2 meses.</p>

Rocurônio	<p>Dose inicial: 0,6-1mg/kg; manutenção: 0,1-0,15 mg/kg; perfusão: 0,3-0,6 mg/kg/h</p> <p>Aminoesteróide de rápido início de ação.</p> <p>Duração 10-40 minutos.</p> <p>Associado a ligeira taquicardia.</p> <p>Principalmente eliminado por via biliar sem metabolização prévia.</p> <p>Antagonista: sugammadex (só recomendado pelo Infarmed a partir dos 2 anos).</p> <p>Licenciamento: FDA todas as idades (exceto indução sequencial rápida – não recomendada em idade pediátrica); Infarmed: todas as idades pediátricas.</p>
Succinilcolina	<p>Dose única: 2mg/kg</p> <p>Relaxante muscular despolarizante. Produz contração muscular antes de relaxamento muscular.</p> <p>Efeito rápido.</p> <p>Metabolizado por pseudocolinesterases plasmáticas. Eliminação renal.</p> <p>Pode causar disritmias, hipercaliemia, mioglobínúria.</p> <p>Potencial desencadeante de hipertermia maligna.</p> <p>Provoca aumento da pressão-intraocular.</p> <p>Licenciamento: FDA e Infarmed todas as idades pediátricas.</p>
Vecurônio	<p>Dose inicial: 0,08-0,1 mg/kg (RN 0,05-0,1 mg/kg ação mais prolongada); manutenção: 0,02-0,03 mg/kg. Perfusão: 0,05-0,1 mg/kg/h</p> <p>Início ação 1 minuto; pico 3-5 minutos; duração 20-60 minutos (mais prolongado em RN).</p> <p>Reduzir dose na insuficiência renal e hepática.</p> <p>Efeitos vagolíticos e simpaticomiméticos (estabilidade cardiovascular).</p> <p>Principalmente eliminado inalterado por via biliar.</p> <p>Licenciamento: FDA e Infarmed todas as idades pediátricas.</p>

Ev= endovenoso; FDA= Food and drug administration.

Tabela I.6 - Anestésicos inalatórios mais usados atualmente em anestesia neonatal e suas características mais relevantes

Sevoflurano	<p>CAM (concentração alveolar mínima): RN 3,3%; 1-<6M 3%; 6M-3A 2,8%</p> <p>Anestésico halogenado.</p> <p>Desvantagens: Hipotensão, depressão respiratória, náuseas, vômitos, agitação ao despertar.</p> <p>Vantagens: rápida ação, não irritante - adequado para indução anestésica.</p> <p>Recuperação rápida.</p> <p>Minimamente metabolizado, eliminação pulmonar.</p> <p>Licenciamento: FDA e Infarmed todas as idades pediátricas.</p>
--------------------	---

Desflurano	<p>CAM: 0 - 1 ano: 8,95 - 10,65%</p> <p>Anestésico halogenado.</p> <p>Recuperação muito rápida (por baixa solubilidade sangue e tecidos).</p> <p>Irritante das vias aéreas (associado a tosse, laringospasmo e aumento secreções), não está indicado na indução anestésica.</p> <p>Desvantagens: Hipotensão, depressão respiratória, náuseas e vômitos.</p> <p>Minimamente metabolizado, eliminação pulmonar.</p> <p>Licenciamento: FDA e Infarmed todas as idades pediátricas (apenas para manutenção anestésica).</p>
Isoflurano	<p>CAM: RN 1,6%; 1-<6M 1,87%; 6M-12M 1,8%</p> <p>Anestésico halogenado.</p> <p>Não irritante das vias aéreas mas odor desagradável, mal tolerado para indução anestesia.</p> <p>Desvantagens: Hipotensão, depressão respiratória, náuseas e vômitos</p> <p>Minimamente metabolizado, eliminação pulmonar.</p> <p>Licenciamento: FDA ≥ 2anos; Infarmed: todas as idades pediátricas.</p>

CAM=concentração alveolar mínima (concentração alveolar de um anestésico volátil que evita resposta ao estímulo doloroso em 50% dos pacientes); RN= Recém-nascido; M= meses; A= anos; FDA= Food and Drug Administration.

Tabela I.7 - Analgésicos opióides mais usados atualmente em A/A/S neonatal e suas características mais relevantes

Alfentanil	<p>Dose inicial: 0,02-0,05 mg/kg; doses suplementares: 0,015 mg/kg; perfusão: 0,5-1 µg/kg/min</p> <p>Ação curta.</p> <p>Usar com cuidado no hipotireoidismo, insuficiência renal ou hepática.</p> <p>Efeito sedativo potenciado por ansiolíticos e hipnóticos.</p> <p>Efeitos adversos: depressão respiratória, hipotensão e bradicardia, rigidez muscular.</p> <p>Metabolização principalmente hepática. Eliminação renal.</p> <p>Antagonista: naloxona.</p> <p>Licenciamento: FDA ≥ 12 anos. Infarmed menciona necessidade de aumentar dose em crianças sem especificar idade e refere a farmacocinética em RN.</p>
Fentanil	<p>Dose inicial ev: VE 1-5µg/kg; VM 1-25µg/kg; doses seguintes: VE 1µg/kg VM 1-3 µg/kg. Perfusão (apenas com VM): 0,5-5 µg/kg/h</p> <p>Início ação 1-2 minutos; pico 10 minutos.</p> <p>RN doses idênticas mas mais sensível a depressão respiratória.</p> <p>Usar com cuidado na insuficiência renal e hepática e na hipertensão intracraniana.</p> <p>Analgesia e sedação.</p> <p>Efeitos adversos: Apneia/depressão respiratória, rigidez torácica (principalmente com <i>bolus</i> rápidos > 5 µg/kg), bradicardia, hipotensão, náuseas, obstipação.</p> <p>Metabolização principalmente hepática. Eliminação renal.</p> <p>Antagonista: naloxona.</p>

	<p>Licenciamento: FDA e Infarmed \geq 2anos (embora FDA apresente a dose ev para uso neonatal referem que não há dados de segurança para uso transdérmico ou parenteral).</p>
Morfina	<p>Analgesia: 0,05-0,15mg/kg; sedação (VM): 10-40μg/kg/h (após <i>bolus</i> ev). Iniciar pela dose mais baixa (principalmente se idade <6meses) e aumentar até efeito desejado.</p> <p>Analgesia e sedação.</p> <p>Efeitos adversos: Apneia/depressão respiratória, libertação histamina, convulsões em RN, dependência, náuseas, vômitos, hipotensão, obstipação, miose.</p> <p>Usar com cuidado em doentes com broncospasmo, disfunção hepática ou renal, choque, hipotensão, retenção urinária, hipotireoidismo.</p> <p>Potenciado por hipnóticos.</p> <p>Metabolização por hepática. Eliminação renal biliar.</p> <p>Antagonista: naloxona.</p> <p>Licenciamento: FDA e Infarmed todas as idades pediátricas.</p>
Petidina	<p>Dose ev: 0,5-1mg/kg. Perfusão: 0,1-0,3 mg/kg/h</p> <p>Não usar na insuficiência hepática. Cuidado na insuficiência renal.</p> <p>Aumenta efeito sedativo das benzodiazepinas.</p> <p>Efeitos adversos: Depressão respiratória, náuseas, obstipação, taquicardia, inotrópico negativo.</p> <p>Analgesia e sedação.</p> <p>Metabolização principalmente hepática. Eliminação renal.</p> <p>Metabolito pró-convulsivante (evitar uso crônico).</p> <p>Metabolismo significativamente reduzido no RN.</p> <p>Antagonista: naloxona.</p> <p>Licenciamento: FDA não disponível. Infarmed: todas as idades pediátricas (refere necessidade e extremo cuidado em RN e prematuros).</p>
Remifentanil	<p>Perfusão: 0,05-0,9 μg/kg/min</p> <p>Muito rápido início de ação.</p> <p>Metabolização por esterases não específicas, não colinesterases plasmáticas. Eliminação renal.</p> <p>Duração 5-10 minutos.</p> <p>Efeitos adversos: rigidez muscular, depressão respiratória, hipotensão, bradicardia.</p> <p>Antagonista: naloxona.</p> <p>Licenciamento: FDA \geq 2 anos; Infarmed \geq 1 ano.</p>
Tramadol	<p>Ev: 1-2mg/kg (6/6h)</p> <p>Agonista dos recetores opióides com mecanismo de ação opióide e não opióide. Não necessita ajuste terapêutico na insuficiência renal e hepática.</p> <p>Antagonista: naloxona (apenas 30% antagonizado).</p> <p>Metabolização principalmente hepática. Eliminação renal.</p> <p>Licenciamento: FDA: não disponível; Infarmed refere especial cuidado abaixo dos 12 anos.</p>

Ev= endovenoso; FDA= Food and Drug Administration; RN= recém-nascido; VE= ventilação espontânea; VM= ventilação mecânica.

Tabela I.8 - Analgésicos não opióides mais usados atualmente em A/A/S neonatal e suas características mais relevantes

Cetarolac	<p>Ev/IM lento: 0,5 mg/kg até 30mg (6/6h) Anti-inflamatório não-esteróide. Contraindicado na insuficiência renal (associado a lesão renal) e patologia dispéptica gastrointestinal. Antiagregante plaquetar. Metabolização hepática. Eliminação renal Licenciamento: FDA: não disponível; Infarmed \geq 2 anos.</p>
Paracetamol	<p>Ev: 7,5mg/kg até 10 kg (máximo 30 mg/kg/dia); 15 mg/kg dos 10 aos 50 kg; Oral/rectal 10-30 mg/kg (máximo 90 mg/kg/dia, máximo RN 60 mg/kg/dia) Analgésico e antipirético. Risco de hepatotoxicidade com doses elevadas (dose dependente). Associado a hipotensão principalmente se administração rápida. Metabolização hepática. Eliminação renal. Antagonista: acetilcisteína. Licenciamento: FDA e Infarmed todas as idades pediátricas.</p>

Ev= endovenoso; FDA= Food and drug administration.

Tabela I.9 - Outros fármacos comumente usados atualmente em A/A/S neonatal e suas características mais relevantes

Hidrato cloral	<p>Oral, retal, 30-75 mg/kg (máximo total 120 mg/kg ou até 1g no lactente) Contraindicado na lesão hepática e renal. Efeitos adversos: depressão respiratória, excitação paradoxal, tonturas. Não usar via oral se gastrite/esofagite. Metabolização hepática e nos glóbulos vermelhos. Eliminação renal. Licenciamento: FDA todas as idades; Infarmed: informação não disponível.</p>
Diazepam	<p>Sedação ev: 0,1-0,3mg/kg (máximo 5mg). Perfusão: 0,1 mg/kg/h (máximo 0,4 mg/kg/h) Medicação pré-anestésica: oral 0,2-0,3 mg/kg (máximo 2,5mg); retal 0,5mg/kg. Benzodiazepina. Efeito ansiolítico e antiepiléptico. Usar com cuidado na insuficiência hepática e renal. Efeitos adversos: depressão respiratória, hipotonia, sonolência, ataxia, alucinações, hipotensão, retenção urinária, estimulação paradoxal sistema nervoso central. Metabolização hepática. Eliminação renal Antagonista: flumazenil. Licenciamento: FDA \geq 1ano; Infarmed: refere uso em crianças sem especificar idades.</p>

Ev= endovenoso; FDA= Food and drug administration.

A simples extrapolação de doses de adultos para crianças – baseada apenas no peso corporal, área de superfície corporal ou idade – pode ter consequências drásticas. A A/A/S pediátrica tem particularidades, nomeadamente no que concerne ao comportamento farmacológico dos agentes administrados que por motivos fisiológicos difere da farmacologia do adulto, às diferenças anatómicas que influenciam as técnicas e equipamento necessário, à imaturidade dos órgãos responsáveis pelo metabolismo e eliminação dos agentes e à fisiologia, nomeadamente de respostas reflexas a efeitos adversos dos fármacos usados. Mesmo dentro da idade pediátrica a resposta aos agentes anestésicos é tanto mais particular quanto menor a idade, com o extremo nos recém-nascidos e prematuros, caracterizados pela maturação contínua e rápida que apresentam.

A resposta dos neonatos aos fármacos administrados é influenciada por muitos fatores, nomeadamente idade gestacional, conteúdo corporal de água, gordura e massa muscular, desenvolvimento hepático e renal, maturidade funcional do coração, presença de malformações congénitas, concentração sérica de proteínas, temperatura corporal e maturação da barreira hematoencefálica.

A composição corporal muda com a idade afetando significativamente a farmacocinética e farmacodinâmica. O conteúdo total de água corporal é mais alto em prematuros (superior a 80%) do que em RN de termo (75%) e em RN de termo do que em crianças mais velhas (60%), enquanto os conteúdos de gordura e massa muscular aumentam com a idade. Assim, os neonatos apresentam um grande volume de distribuição de fármacos hidrossolúveis, como a succinilcolina e muitos antibióticos, necessitando frequentemente de maiores doses iniciais para atingir o nível plasmático necessário, enquanto o menor conteúdo de gordura e massa muscular levam a que fármacos que dependem destes tecidos para redistribuição, como fentanil e o tiopental, possam apresentar efeito clínico prolongado.⁴⁶

Por outro lado, a imaturidade do metabolismo hepático e da função renal dos neonatos determinam atraso no metabolismo e excreção de vários fármacos que dependem destes órgãos. A maturação das enzimas hepáticas ocorre em ritmos diferentes, com aparecimento progressivo das isoformas não fetais do citocromo P450 desde alguns dias após o nascimento até aos 3 meses de idade e da capacidade de formar conjugados, por exemplo por glucoronidação, desde os 3 até aos 6 meses de idade.⁴⁶ Acresce que o fluxo sanguíneo hepático também está reduzido no neonato, aliado ao débito cardíaco, o que contribui para o comprometimento do metabolismo hepático,

fenômeno que pode ser exacerbado pela presença de doenças abdominais que cursam com aumento da pressão intra-abdominal. De igual forma, várias outras patologias podem alterar a distribuição dos fármacos, nomeadamente a persistência do canal arterial, a hipertensão pulmonar persistente ou a hipoplasia do ventrículo esquerdo podem diminuir o fluxo sanguíneo para alguns tecidos, tanto órgãos alvo como locais de metabolização.

Relativamente à concentração sérica de proteínas, a sua percentagem em relação à massa corporal total no recém-nascido é de 11%, aos quatro meses aumenta para 11,5% e com um ano de idade para 15%.⁴⁷ Nos neonatos, esta reduzida concentração sérica de proteínas associada a presença de albumina fetal (com afinidade diminuída para ligação a fármacos), baixo pH plasmático (que reduz a ligação a ácidos) e concentração sérica de moléculas competidoras pela ligação a proteínas (como a bilirrubina e ácidos gordos livres), promovem aumento das frações livres de fármacos, o que aumenta o efeito e acelera a eliminação.⁴⁸

Adicionalmente, a barreira hematoencefálica no recém-nascido é incompleta e, consequentemente, facilita a penetração de fármacos, especialmente os lipossolúveis, no sistema nervoso central.

Tendo em conta todos os fatores apresentados anteriormente, a administração de fármacos a recém-nascidos, principalmente nos prematuros, deve ser avaliada cuidadosamente sendo necessária particular atenção e cuidado na sua escolha e ajuste de dose.⁴⁹

Apesar de avanços importantes na compreensão de especificidades da farmacodinâmica de alguns dos fármacos usados em A/A/S no período neonatal, a falta de informação nesta população, nomeadamente relativa à toxicidade no sistema nervoso central a longo prazo⁵⁰ e à farmacocinética e farmacodinâmica da maior parte dos fármacos utilizados, e a controvérsia existente entre pares⁵¹⁻⁵³ continuam a ser causa de intensa preocupação. Acresce que aproximadamente 80% dos fármacos licenciados para uso nos Estados Unidos da América pela FDA não estão aprovados para uso na população pediátrica por falta de estudos.⁵⁴ Consequentemente, os prestadores de cuidados de saúde são confrontados com a necessidade de basear a sua prescrição, geralmente imprescindível, na experiência clínica em vez de em dados comprovados cientificamente.^{54,55}

1.4 Efeitos Sobre o SNC de Anestésicos/Sedativos/Analgésicos em Período de Imaturidade Cerebral

1.4.1 Estudos Experimentais

A demonstração em laboratório do efeito neurotóxico potencial de fármacos anestésicos sobre o SNC em fase de imaturidade teve início na década de setenta do século XX com o estudo de Chang e colaboradores para o halotano, que pela primeira vez alertaram para esta questão.⁵⁶ Desde então muitos outros estudos evidenciaram, *in vitro* ou *in vivo*, efeitos neurotóxicos do SNC imaturo^{ix} (neurodegeneração, alterações moleculares a nível da membrana sináptica, aumento dos valores de interleucinas pró-inflamatórias) e/ou alterações do comportamento após a exposição de animais imaturos a diversos anestésicos/sedativos e analgésicos opióides usados na clínica humana, isoladamente ou em associação. Informação laboratorial recente, em geral da última década (Tabela I.10), reafirma a informação mais antiga sobre neurotoxicidade por exposição de modelos animais de imaturidade do SNC e completa-a com novos dados, alguns deles provenientes de estudos em modelo animal próximo do homem na escala filogenética, como o macaco-rhesus.

Tabela I.10 - Toxicidade *in vitro* ou *in vivo* de anestésicos, sedativos e analgésicos em modelos em fase de imaturidade do sistema nervoso central

Fármaco	Autor, Ano	Desenho/grupos	Resultados de histopatologia cerebral (◇) e de neurodesenvolvimento (●)
Fentanil	Laudenbach <i>et al.</i> , ⁵⁸ 2001	5 µl x 3 administrações ip ou 1 µl x 2 ic em murganho RN (P5-6) modelo de LC	◇Exacerbação de lesões cerebrais induzidas
Fentanil+ Xénon	Sabir <i>et al.</i> , ⁵⁹ 2013	Fentanil dose para sedação durante 24h com ou sem xénon 50%, porco P1	◇Sem efeito tóxico
Midazolam	Vutskits <i>et al.</i> , ⁶⁰ 2005	0.25–25 µg/mL durante 5d, culturas de neurónios de ratos RN	◇Não afetou o crescimento de dendrites
Midazolam	Young <i>et al.</i> , ⁶¹ 2005	9mg/kg sc, murganho P7	◇Apoptose neuronal

^{ix} Em pequenos roedores, como o rato e o murganho, o cérebro é relativamente imaturo ao nascimento. Historicamente, a fase de desenvolvimento do cérebro do rato com 7 dias de vida pós-natal corresponde à do feto humano no último trimestre de gestação.⁵⁷

Midazolam	Koch <i>et al.</i> , ⁶² 2008	0,1-10mg/kg ev, 0,1mg/kg intratecal, rato P3-10-21-40	<ul style="list-style-type: none"> ● Diminuição do limiar das respostas reflexas mecânicas e aumento da magnitude no rato P3 (com efeito oposto em ratos mais velhos e adultos) na administração ev mas não na intratecal ● Menor efeito sedativo em rato com SNC em desenvolvimento
Midazolam + Isoflurano + Tiopental	McClaine <i>et al.</i> , ⁶³ 2005	Anestesia durante 4h, carneiro 122 dias de gestação	◇ Sem neurodegenerescência
Midazolam + N ₂ O + Isoflurano	Jevtovic-Todorovic <i>et al.</i> , ⁶⁴ 2003	6h de anestesia, rato P7	◇ Neurodegeneração apoptótica no cérebro em desenvolvimento e défices na função sináptica do hipocampo com a combinação ◇ Sem aumento da apoptose neuronal com 3, 6 ou 9mg/kg midazolam <ul style="list-style-type: none"> ● Distúrbios persistentes da memória e aprendizagem
Midazolam + N ₂ O + Isoflurano	Boscolo <i>et al.</i> , ⁶⁵ 2013	6h de anestesia, rato P7	◇ Alterações da morfogênese mitocondrial no cérebro imaturo
Midazolam + Cetamina	Young <i>et al.</i> , ⁶¹ 2005	Administração repetida 9mg/kg midazolam + 40mg/kg cetamina sc, murganho P7	◇ Apoptose neuronal
Morfina	Bajic <i>et al.</i> , ⁶⁶ 2013	10mg/kg sc 2id (total 13 administrações), rato PND1	◇ Apoptose no córtex e amígdala cerebrais
Cetamina	Young <i>et al.</i> , ⁶¹ 2005	Administração repetida 10-40mg/kg sc, murganho P7	◇ Apoptose neuronal (20-40mg/kg)
Cetamina	Slikker <i>et al.</i> , ⁶⁷ 2007	Anestesia durante 24h, macaco-rhesus 122 dias de gestação, PND5 e PND35	◇ Morte neuronal inversamente proporcional ao estadio de desenvolvimento
Cetamina	Zou <i>et al.</i> , ⁶⁸ 2009	Anestesia durante 3, 9 ou 24h, macaco-rhesus PND5-6	◇ Apoptose no córtex frontal após 9 e 24h de anestesia mas não após 3h
Cetamina	Paule <i>et al.</i> , ⁶⁹ 2011	Anestesia durante 24h, macaco-rhesus PND 5-6	● Défices cognitivos persistentes a longo prazo
Cetamina	Brambrink <i>et al.</i> , ⁷⁰ 2012	Anestesia por perfusão ev durante 5h; macaco-rhesus PND6 ou 120 dias de gestação	◇ Apoptose neuronal em ambas as idades, 2,2 vezes superior no feto

Cetamina	Bai <i>et al.</i> , ⁷¹ 2013	100 µM, vários tempos, culturas de neurónios/células germinativas humanas	◇Proliferação e apoptose neuronal após exposição durante 24h e neurotoxicidade mediada por mitocôndrias
Cetamina	Liu <i>et al.</i> , ⁷² 2013	5, 10, ou 20 mg/kg, 1, 3 ou 6 injeções repetidamente; rato PND7	◇Morte neuronal, aparentemente por apoptose, no córtex frontal e aumento da expressão do recetor NMDA após 6 injeções de 20mg/kg, mas não com frequências ou doses menores
Cetamina	Liu <i>et al.</i> , ⁷³ 2013	10 µM durante 24h, culturas de neurónio rato RN	◇Aumento da expressão do recetor NMDA e danos celulares
Propofol	Vutskits <i>et al.</i> , ⁶⁰ 2005	1–20 µg/mL durante 5d, culturas de neurónios de rato RN	◇Diminuição dose dependente do crescimento dendrítico
Propofol	Cattano <i>et al.</i> , ⁷⁴ 2008	25-300 mg/kg ip, murganho P5 a P7	◇Apoptose neuronal após doses iguais ou superiores a 50 mg/kg
Propofol	Milanovic <i>et al.</i> , ⁷⁵ 2010	20mg/kg durante 2, 4 ou 6h, rato P7	◇Degeneração neuroapoptótica
Propofol	Pesić <i>et al.</i> , ⁷⁶ 2010	25mg/kg, rato P7	◇Morte celular no córtex e tálamo
Propofol	Cui <i>et al.</i> , ⁷⁷ 2011	50, 100 ou 150 mg/kg ip a cada 90min (4 vezes), murganho P5 a P7	◇Aumento da expressão das proteínas c-Fos e caspase-3 clivada no hipocampo após 6h
Propofol	Briner <i>et al.</i> , ⁷⁸ 2011	Anestesia durante 6h por <i>bolus</i> inicial de 40 mg/kg seguido a cada hora de 20mg/kg, rato PND5, 10, 15, 20 e 30	◇Diminuição da densidade das espinhas dendríticas após exposição em PND5 e 10 e aumento após exposição em idade mais velhas
Propofol	Karen <i>et al.</i> , ⁷⁹ 2013	30 mg/kg a cada 90 minutos (3 vezes), rato P6	◇Neurodegeneração apoptótica aguda ● Alterações mínimas do neurodesenvolvimento em adolescente (P30) mas não em adulto (P120)
Propofol	Creeley <i>et al.</i> , ⁸⁰ 2013	Anestesia durante 6,5h, macaco-rhesus 120 dias de gestação	◇Apoptose neuronal e aumento de oligodendrócitos
Propofol	Zou <i>et al.</i> , ⁸¹ 2013	Diversas doses, cultura de células embrionárias neuronais rato	◇Apoptose e inibição do crescimento celular dose-dependente

N ₂ O+ Isoflurano	Zou <i>et al.</i> , ⁸² 2011	70% N ₂ O e 1% isoflurano, individualmente ou associados, durante 8h, macaco-rhesus P5-6	◇Morte neuronal apenas para a combinação N ₂ O+Isoflurano
Isoflurano	Johnson <i>et al.</i> , ⁸³ 2008	0,75% durante 4h, 1,5% durante 2h ou 2% durante 1h, murgancho lactente	◇Neuroapoptose após uma ou mais horas de exposição
Isoflurano	Brambrink <i>et al.</i> , ⁷⁰ 2012	0,7 a 1,51% durante 5h, macaco-rhesus P6	◇Neuroapoptose cerebral
Isoflurano	Briner <i>et al.</i> , ⁸⁴ 2010	1,5% durante 30, 60 e 120 min, rato P16	◇Não provoca morte celular mas altera a citoarquitetura neuronal (aumento da densidade das espinhas dendríticas)
Isoflurano	Brosnan <i>et al.</i> , ⁸⁵ 2013	1, 4, 1,9 e 3,8%, durante 6h, culturas de células do hipocampo de rato P7	◇Degenerescência neuronal
Isoflurano± Xénon	Cattano <i>et al.</i> , ⁸⁶ 2008	0.75% isoflurano; 70% xénon, isoladamente ou em associação, durante 4h, murgancho P7	◇Neuroapoptose presente em todos os cenários, mais intensa após exposição a isoflurano do que após xénon ou do que após associação isoflurano+xénon
Desflurano	Briner <i>et al.</i> , ⁸⁴ 2010	7% durante 30, 60 e 120 min, rato P16	◇Não provoca morte celular mas altera a citoarquitetura neuronal (aumento da densidade das espinhas dendríticas)
Sevoflurano	Satomoto <i>et al.</i> , ⁸⁷ 2009	3% durante 6h, murgancho P6	◇Neuroapoptose ●Distúrbios da aprendizagem
Sevoflurano	Briner <i>et al.</i> , ⁸⁴ 2010	2,5% durante 30, 60 e 120 min, rato P16	◇Não provoca morte celular mas altera a citoarquitetura neuronal (aumento da densidade das espinhas dendríticas)
Sevoflurano	Fang <i>et al.</i> , ⁸⁸ 2012	3%-5% durante 4h, rato P7	◇Neurodegeneração ●Distúrbios de aprendizagem
Sevoflurano	Zhou <i>et al.</i> , ⁸⁹ 2012	2.3% durante 6 h, rato P7	◇Neurodegeneração
Sevoflurano	Brosnan <i>et al.</i> , ⁸⁵ 2013	0,75, 1 e 2 CAM durante 6h, culturas do hipocampo de ratos P7	◇Degenerescência neuronal

Sevoflurano	Wang <i>et al.</i> , ⁹⁰ 2013	2,5% durante 4h, rato P7	<ul style="list-style-type: none"> ◇Sem perda neuronal no hipocampo após 7 semanas ◇Diminuição da expressão de PSD-95 (marcadores de sinapses) no hipocampo após 7 semanas mas não imediatamente após anestesia ●Distúrbios da aprendizagem e memória após 7 semanas
Sevoflurano	Zheng <i>et al.</i> , ⁹¹ 2013	2,5% durante 2h, murganho 14 dias de gestação	<ul style="list-style-type: none"> ◇Neuroapoptose, neuroinflamação e diminuição dos marcadores de sinapses no feto e murganho P31 ●Distúrbios da aprendizagem e memória P31
Sevoflurano	Zheng <i>et al.</i> , ⁹¹ 2013	4,1% durante 6 h, culturas celulares de neurónios murganho	<ul style="list-style-type: none"> ◇Diminuição dos marcadores de sinapses (PSD95 e sinaptofisina)

Ip= intraperitoneal; Ic= intracerebral; RN= recém-nascido; P= dia pós-natal; Mdz= midazolam; Mdz+Ket= midazolam+cetamina; LC= leucomalácia cerebral= lesão da substância branca do cérebro; h= horas; d= dias; ev= endovenoso; SNC= sistema nervoso central; sc= subcutâneo; min= minutos; id= vezes por dia; CAM= concentração alveolar mínima.

Assim, vários estudos demonstraram neurotoxicidade por exposição a anestésicos inalatórios como o sevoflurano,^{84,85,87-91} isoflurano⁸²⁻⁸⁶ e desflurano.⁸⁴ Também ocorreu neurotoxicidade por exposição a anestésicos/sedativos intravenosos, como cetamina,⁶⁷⁻⁷³ propofol,⁷⁴⁻⁸¹ midazolam,⁶⁰⁻⁶² bem como a fármacos opióides como a morfina⁶⁶ e o fentanil.⁵⁸ Os efeitos neurotóxicos foram dependentes de vários fatores, como a espécie animal, período de desenvolvimento cerebral, concentração do fármaco, sua utilização isolada ou em associação e número de exposições à anestesia. Por outro lado, as mesmas classes de fármacos mostraram, por vezes, e em determinados contextos, efeitos neuroprotetores. Por exemplo, no estudo de Cattano e colaboradores,⁸⁶ a exposição de murganho com 7 dias de vida pós-natal a isoflurano, a xénon (não usado em pediatria) ou a exposição conjunta a xénon e isoflurano mostrou que o isoflurano e o xénon, ambos bloqueadores do recetor NMDA, foram neuroapoptogénicos, porém o xénon em associação com o isoflurano diminuiu a resposta neuroapoptótica induzida pela exposição isolada a este último. Num outro estudo, tanto o propofol como o midazolam em dose subterapêutica de sedação evidenciaram efeito neuroprotetor em cérebro de feto de rato em contexto de isquemia-

reperusão provocada pela oclusão bilateral das artérias útero-ovárias aos 19 dias de gestação.⁹²

Dos fármacos individuais supracitados, o sevoflurano, midazolam e fentanil constituem os pilares de anestesia, sedação e analgesia de recém-nascidos gravemente doentes, sendo de utilização muito frequente quer no bloco operatório (sevoflurano/fentanil), quer na unidade de cuidados intensivos neonatais⁹³ e pediátricas⁹⁴ (midazolam/fentanil). Enquanto vem surgindo na literatura abundante informação pré-clínica sobre o sevoflurano, a informação sobre o potencial efeito neurotóxico em modelos pré-clínicos de imaturidade cerebral do fentanil e do midazolam é relativamente escassa, controversa e incompleta, não havendo estudos que avaliem os efeitos destes fármacos no neurodesenvolvimento. Assim, da informação na literatura sobre os efeitos neurotóxicos do fentanil em animal com SNC imaturo, num estudo, Sabir e colaboradores⁵⁹ reportaram a ausência de neuroapoptose cerebral no porco recém-nascido em hipotermia ou normotermia tanto para a exposição a xénon com fentanil como para a exposição só a fentanil, utilizando os seguintes grupos: (1) porco com menos de 24 horas de vida, exposto durante 24 horas a inalação de xénon a 50% e perfusão de fentanil em condições de hipotermia, (2) porco com menos de 24 horas de vida, exposto durante 24 horas a inalação de xénon a 50% e perfusão de fentanil em condições de normotermia, (3) porco com menos de 24 horas de vida exposto durante 24 horas a perfusão de fentanil em condições de normotermia, (4) controlos juvenis não ventilados em condições de normotermia e (5) expostos durante 24 horas a inalação de isoflurano a 2% em condições de normotermia. Noutro estudo, Laudenbach e colaboradores⁵⁸ reportaram o efeito de apoptose neuronal provocado pela administração repetida de fentanil em dose alta a murganho recém-nascido. Neste trabalho, tendo como objetivo secundário a investigação da toxicidade de fentanil em animal imaturo sujeito a administração repetida de fentanil em modelo de leucomalácia periventricular da prematuridade, os autores do estudo expuseram ratinhos recém-nascidos com 4 e 5 dias de vida pós-natal à injeção intraperitoneal repetida de fentanil (0,1, 1, ou 10 µg/kg/dose, 3 injeções), seguida de indução de lesão cerebral por ibotenate, tendo reportado exacerbação da lesão cerebral para 3 administrações de fentanil a 10 µg/kg/ dose, mediada por ativação do recetor opióide-tipo 1.⁵⁸

No que concerne à exposição a midazolam em contexto de imaturidade do SNC, Young e colaboradores⁶¹ demonstraram apoptose cerebral provocada por exposição de murganho (P7) a 9mg/kg em administração subcutânea, no entanto tal não se verificou

para a mesma dose no rato (P7) em estudo realizado por Jevtovic-Todorovic e colaboradores,⁶⁴ o que foi consistente com os achados de estudo *in vitro* em que o crescimento de dendrites de culturas celulares do rato não foi afetado pela exposição ao fármaco.⁶⁰

Para avaliar a eficácia do midazolam na sedação em recém-nascido, Koch e colaboradores⁶² administraram o fármaco em doses consideradas sedativas para rato⁹⁵ a ratos com 3, 10, 21, e 40 dias de vida pós-natal e verificaram que o midazolam, em contraste com os efeitos no adulto (40 dias), potenciou o comportamento nocicetivo e de sensibilização dos reflexos cutâneos e teve menor efeito sedativo em recém-nascidos.

1.4.1.1 Mecanismos Possíveis de Neurotoxicidade dos Anestésicos em Período de Vulnerabilidade do SNC

Como referido atrás, múltiplos estudos mostraram que fármacos anestésicos, sedativos e analgésicos com propriedades bloqueadoras do recetor NMDA^x ou agonistas de recetores do ácido gama-aminobutírico_A (GABA_A)^{xi} têm potencial efeito neurotóxico especialmente quando usados em período de vulnerabilidade do SNC. Na janela de vulnerabilidade do SNC aos nóxios, caracterizada por intensa atividade de proliferação neuronal, diferenciação, sinaptogénese e rápido desenvolvimento de dendrites e estabelecimento de redes neuronais complexas, designada por surto de crescimento cerebral, qualquer interferência com os sistemas de neurotransmissão endógena, como por exemplo a insuficiente ou a excessiva estimulação da sinalização GABA ou NMDA, que perturbe a precisão de orquestração temporo-espacial de vias moleculares multifacetadas que guiam a proliferação, migração, diferenciação e sobrevivência das células neurais podem conduzir a alteração permanente das funções normais do sistema nervoso central.⁹⁶ Acresce o facto de, durante a etapa de sinaptogénese acelerada, designada por surto de crescimento cerebral,^{97,98} o aminoácido excitatório NMDA e o GABA, este último o principal neurotransmissor inibidor no sistema nervoso central dos

^x O recetor NMDA é um recetor excitatório estimulado endogenamente pelo glutamato e aspartato. A cetamina, o protóxido de azoto (N₂O), e o xénon são exemplos de anestésicos antagonistas deste recetor.

^{xi} O recetor GABA_A é uma estrutura pentamérica de membrana e tem geralmente ação inibitória. Contudo, durante determinadas fases do desenvolvimento o recetor GABA_A evidencia função excitatória. As benzodiazepinas, barbitúricos, propofol, etomidato e anestésicos voláteis são exemplos de agonistas deste recetor.

mamíferos, terem ação trófica no sistema nervoso central em desenvolvimento e o GABA poder ainda ser paradoxalmente excitatório, influenciando, por ativação de recetores ionotrópicos (canais iónicos ligante-dependentes) e recetores metabotrópicos ligados à proteína G, a formação de sinapses e neuroplasticidade na fase de surto de crescimento cerebral.⁹⁹

Embora não se conheçam os mecanismos de neurotoxicidade dos anestésicos habitualmente usados em fase de imaturidade do SNC, pensa-se que estão associados, à semelhança dos opióides e de outros fármacos com impacto na homeostasia glutamérgica/GABAérgica do cérebro,^{100,101} a stresse oxidativo, apoptose, disfunção mitocondrial e inibição da neurogénese. De acordo com Olney e colaboradores¹⁰²⁻¹⁰⁴ a morte celular desencadeada por fármacos agonistas GABA_A e/ou antagonistas NMDA envolve a translocação da proteína Bax (família de proteínas Bcl-2) para as membranas das mitocôndrias e alteração da sua permeabilidade e extravasamento de citocromo c, que por sua vez desencadeiam uma série de alterações culminando na ativação de caspases e apoptose^{xii}. A apoptose dos neurónios em desenvolvimento pode ser originada, de acordo com a investigação de Pearn e colaboradores,¹⁰⁵ pela diminuição de fatores neurotróficos, como o fator neurotrófico derivado do cérebro, supressão da ativação do plasminogénio tecidual da fenda sináptica e despolimerização da actina do citoesqueleto, induzidas por anestésicos. Segundo Ward e Lopke^{106,107} ainda não é claro se a anestesia apenas acelera a neuroapoptose fisiológica normal das células com morte já programada ou se faz com que células neuronais saudáveis sejam eliminadas, originando a supressão transitória da neurogénese e conduzindo à alteração no desenvolvimento dos circuitos neuronais e a subseqüentes déficits neurocognitivos. O papel potencial da acumulação excessiva de radicais livres na apoptose de neurónios imaturos foi sugerido recentemente por Boscolo e colaboradores.⁶⁵ Neste estudo, efetuado em ratos P7 expostos a 6 horas de anestesia (midazolam intraperitoneal em dose sedativa, seguido pela exposição a isoflurano e protóxido de azoto) ocorreu aumento de radicais livres, diminuição do enzima superóxido dismutase e aumento da fissão mitocondrial por desregulação da expressão de proteínas envolvidas no processo de fissão/fusão das mitocôndrias.⁶⁵

^{xii} Apoptose: morte celular programada. Inicia-se por diversas vias, todas levando à ativação da caspase 3 que causa morte celular.

1.4.1.2 Modelos de Estudo

O estudo pré-clínico da neuropatologia do desenvolvimento para fármacos anestésicos tem utilizado diferentes abordagens de estudo, desde a pesquisa *in vitro* a estudos *in vivo*. A pesquisa *in vitro* com o recurso a culturas de células do SNC imaturo (habitualmente de origem animal) tem a vantagem de facilitar um rastreio inicial rápido de efeitos neurotóxicos dos fármacos sob diferentes concentrações utilizando um número reduzido de animais. Os estudos *in vivo* têm utilizado uma ampla variedade de modelos animais, desde os de pequeno porte, como os murinos, aos de maior porte, como o porco, carneiro e sobretudo o macaco, e têm fornecido abundante informação sobre os possíveis mecanismos de neurotoxicidade anestésica, quer em estudos de histopatologia do SNC quer em estudos de observação dos efeitos dos fármacos no neurodesenvolvimento. No entanto, essa informação tem de ser criticamente avaliada na extrapolação da sua aplicabilidade à clínica humana, uma vez que são reconhecidas as importantes diferenças entre os modelos experimentais de estudo dos efeitos neurotóxicos dos anestésicos em período de imaturidade do SNC e a prática clínica de anestesia pediátrica.¹⁰⁸

Designadamente para modelos murinos, que incluem espécies experimentais utilizadas em mais de 90% dos estudos de investigação científica contemporânea devido aos seus inúmeros atributos vantajosos,¹⁰⁹ Loepke e colaboradores¹⁰⁸ referem que são diferentes do humano quer a prática de exposição aos anestésicos quer a janela de vulnerabilidade do SNC à toxicidade farmacológica. Por exemplo, no que concerne à prática anestésica do modelo murino de investigação, enquanto a anestesia para cirurgia pediátrica é comumente efetuada sob intubação traqueal, em ventilação mecânica e com monitorização contínua dos sinais vitais, a anestesia do rato ou do murganho é habitualmente efetuada sem abordagem da via aérea ou monitorização dos sinais vitais.

Outra diferença reside no facto de a anestesia em estudos com roedores ser geralmente administrada sem estímulo nocivo, ao contrário da prática da anestesia em cirurgia pediátrica, em que o SNC fica exposto à estimulação do próprio procedimento cirúrgico e à dos estímulos de stresse envolventes, como os dolorosos. Vários estudos sugerem que o stresse e a dor têm uma provável repercussão no desenvolvimento cerebral, pelo que os efeitos benéficos dos anestésicos também devem ser considerados.

Além do mais, a duração da anestesia em estudos animais é geralmente não comparável à da prática clínica habitual e, por diferenças metabólicas, as doses de

anestésicos necessárias para plano cirúrgico em anestesia injetável são muito mais elevadas em animais de pequeno porte em comparação com os humanos.

No que concerne à janela de vulnerabilidade do SNC a tóxicos anestésicos, esta é distinta nas diversas espécies animais e é complexa a atribuição de equivalência entre o surto de crescimento cerebral dos diversos modelos animais e o do humano, pela complexidade do desenvolvimento do sistema nervoso central de mamíferos, sua variabilidade temporal nas diversas espécies, bem como pela maturação não simultânea dos diversos componentes do SNC.¹⁰⁸ Estimativas habituais em investigação indicam que este período no rato é relativamente curto, tendo início 1 ou 2 dias antes do nascimento e estendendo-se até cerca de 10 dias após o nascimento,¹¹⁰ enquanto no humano é longo e de duração ainda imprecisa, tendo início no 3º trimestre de vida intrauterina e estendendo-se até vários anos após o nascimento, 3 anos para Olney e colaboradores.¹⁰³ Tradicionalmente os estudos em ratos iniciam-se no 7º dia pós-parto, com interpretação dos dados fazendo-os equivaler ao prematuro humano tardio (com neurodesenvolvimento equivalente ao do feto do 3º trimestre de gestação e a recém-nascido à nascença, para uns,¹⁰⁹ ou estendendo-se ao primeiro mês de vida, para outros),¹¹¹ contudo, esta equivalência foi readaptada com base em análise neuroinformática contemporânea, sugerindo-se a equivalência do 7º dia após o parto no rato ao feto humano entre as 17 e as 22 semanas de gestação.¹⁰⁸

Werboff e colaboradores¹¹² foram os primeiros a reconhecer a importância de utilizar estudos com animais para avaliar os efeitos tóxicos no neurodesenvolvimento de fármacos administrados em fase de imaturidade do SNC. Da diversidade de métodos entretanto desenvolvidos destacam-se os estudos histopatológicos que têm contribuído para a elucidação dos mecanismos de neurotoxicidade dos anestésicos e os estudos de neurodesenvolvimento que têm possibilitado a análise da repercussão potencial de alterações estruturais do SNC induzida por anestésicos em fase de surto de crescimento cerebral e a sua influência na perturbação dos marcos de neurodesenvolvimento. Estes marcos, correspondentes a eventos de desenvolvimento físico, funcional (dos reflexos) e das funções sensoriais, motoras e cognitivas, que estão particularmente bem identificados nos modelos murinos¹¹³⁻¹²¹ e dos quais se conhecem as correspondências a fases do desenvolvimento neural nas diversas regiões cerebrais, têm constituído as baterias de testes de avaliação do neurodesenvolvimento (Tabela I.11).

Tabela I.11 - Pannel de testes utilizados na avaliação da neurotoxicidade de fármacos em modelos murinos do neurodesenvolvimento

Parâmetro	Teste
Crescimento físico ^{xiii} 122	Evolução do peso corporal
Indicadores de maturação somática ¹²²	Erupção dentária dos incisivos Desenrolamento das orelhas Abertura dos olhos
Desenvolvimento reflexo ^{xiv} e neuromotor ¹¹⁵	Reflexo postural ou de endireitamento Geotaxia negativa Agarrar
Desenvolvimento sensorial	Orientação olfativa Início da resposta a estímulo da audição
Reatividade emocional	Atividade motora em campo aberto ^{xv} 123 Teste do labirinto em cruz elevado ^{xvi} 117,124,125
Aprendizagem e memória	Teste de reconhecimento de um novo objeto ¹²⁶ Labirinto em Y
Coordenação motora	Rotarod ¹²⁷

1.4.2 Estudos em Humanos

Após o reconhecimento da necessidade de Anestesia/Analgesia/Sedação nos neonatos no início de 1980, atualmente, em cada ano, milhões de fetos, recém-nascidos e crianças em todo o mundo são expostos a anestésicos, sedativos ou analgésicos para aliviar a dor e o sofrimento infligidos durante procedimentos invasivos.^{128,129} Só nos Estados Unidos da América (EUA) mais de 75 mil grávidas são submetidas anualmente a intervenções cirúrgicas não obstétricas ou a procedimentos de intervenção fetal sob

^{xiii} O ganho de peso é considerado o melhor indicador do estado de saúde do rato em idade precoce e as alterações do ganho ponderal são usadas como indicador de toxicidade.¹²²

^{xiv} Os reflexos primitivos aparecem e desaparecem em sequências definidas durante períodos específicos de desenvolvimento. A ausência de um reflexo primitivo esperado, ou persistência para além de um tempo de espera de extinção, normalmente indica disfunção grave no SNC, podendo refletir alterações do desenvolvimento sensoriomotor normal. o reflexo de endireitamento é um reflexo de recuperação postural que se manifesta desde o 1º dia de nascimento e se robustece com a idade; a geotaxia negativa reflete a tendência do ser vivo para se orientar contra a gravidade e reflete competências vestibular e/proprioceptivas e o reflexo de agarrar reflete a força e coordenação motora e desenvolve-se entre o 14º e o 17º dia de vida pós-natal.¹¹⁵

^{xv} Originalmente descrito por Hall¹²³ para o estudo no rato da “emocionalidade”, o campo aberto é atualmente um dos testes mais usados no estudo das alterações comportamentais de tipo ansioso provocadas por experiências nocivas.

^{xvi} O labirinto em cruz elevado foi originalmente descrito em 1984 para avaliação no rato do comportamento motivado pelo medo¹²⁴ e desde o estudo de Pellow e File¹²⁵ é um dos testes mais usados para avaliação do comportamento ansioso no rato.

anestesia¹³⁰ e estima-se em 6 milhões por ano o número de crianças com intervenções cirúrgicas sob anestesia.¹³¹

Até recentemente a questão da segurança relacionada com os fármacos em anestesia pediátrica não foi especialmente debatida por não existirem dados que a questionassem. Contudo, a evidência, por um lado, de aumento do risco de morbimortalidade em grupos pediátricos imaturos e com patologia crítica¹³² e, por outro lado, a crescente inquietação sobre a segurança desses fármacos no sistema nervoso central em desenvolvimento, fizeram com que o estudo dos efeitos da anestesia, sedação e analgesia em ser imaturo se impusesse pela sua relevância clínica e se transformasse numa questão urgente de saúde pública.¹³¹ Na verdade, a acumulação da evidência de neurotoxicidade em animais expostos a anestésicos em fase de imaturidade cerebral,^{133,134} em conjunto com recentes observações epidemiológicas, sugerem que fármacos usados em contexto de anestesia clínica pediátrica podem exercer efeitos indesejáveis sobre o sistema nervoso central imaturo, isto é, abrangendo crianças nos primeiros anos de vida pós-natal.

Desde finais do século XX intensificou-se nas comunidades científicas de ciências da saúde a reflexão sobre a segurança da anestesia, sedação ou analgesia perinatal na prática clínica humana.^{128,131,135,136} Acresce o facto de virem surgindo alertas na literatura sobre a associação entre resultados desfavoráveis no neurodesenvolvimento a longo prazo e exposição a cirurgia sob anestesia geral de crianças com patologia da prematuridade ou malformações congénitas graves em fase precoce da vida pós-natal.^{137,138}

Face à óbvia dificuldade em extrapolar os resultados das experiências em animais para o humano, a investigação clínica vem tentando encontrar resposta à questão do potencial efeito neurotóxico de fármacos anestésicos, sedativos ou analgésicos em anestesia pediátrica. Neste contexto surgiram alguns estudos epidemiológicos publicados na literatura sobre perturbações persistentes do neurodesenvolvimento após exposição a anestésicos de crianças em fase de imaturidade cerebral mas, apesar de alguns trabalhos de síntese dos resultados e conclusões desses estudos, falta a sua análise sistemática. Outros estudos, com desenhos ambidirecionais, retrospectivos/prospetivos a serem desenvolvidos no âmbito dos projetos PANDA (*Pediatric Anesthesia NeuroDevelopment Assesment*)¹³⁹ e GAS (*General Anesthesia Spinal*)¹⁴⁰ encontram-se atualmente em curso.

1.5 Morbimortalidade em Anestesia Pediátrica

A melhoria da sobrevivência a patologias congênitas bem como o desenvolvimento de novas técnicas cirúrgicas em pediatria levaram a um aumento do número de cirurgias realizadas em crianças com idade inferior a um ano, muitas das quais em neonatos extremamente vulneráveis.¹⁴¹ A anestesia de doentes pediátricos com menos de um ano de idade tem particularidades muito próprias e os resultados de estudos pediátricos em crianças mais velhas não lhes são necessariamente aplicáveis.

Apesar de o risco de complicações anestésicas estar presumivelmente associado às características da população, o estudo da morbimortalidade relacionada com os cuidados anestésicos à população pediátrica com menos de um ano de idade tem especial relevância pela sua frequência e pelo impacto considerável sobre a saúde dos pacientes. A caracterização do perfil epidemiológico da morbimortalidade nesta faixa etária, por constituir um instrumento de avaliação da qualidade da assistência em saúde, pode melhorar a prática anestésica neste grupo de características muito particulares, sendo um ponto de partida para a redução da morbimortalidade.¹⁴²⁻¹⁴⁵ A informação relativa à morbimortalidade em anestesia pediátrica é abundante mas dispersa. Embora muitos reconheçam que a idade inferior a um ano e especificamente o período neonatal estejam associados a maior risco de complicações anestésicas,^{142,146} não existem estudos dirigidos a esta faixa etária. Os dados disponíveis estão dispersos em estudos abrangendo um maior espectro de idades, com referências inconstantes aos resultados nestes grupos pediátricos. Faltam estudos que analisem o perfil epidemiológico da morbimortalidade relacionada com a anestesia geral no primeiro ano de idade e em particular nos seus diferentes subgrupos de vulnerabilidade: primeiro mês de idade e 1 a 12 meses de idade.

O recém-nascido cirúrgico, ou seja, o recém-nascido submetido a cirurgia entre o nascimento e os 28 dias de vida, tem risco particularmente alto de morbimortalidade pós-operatória pela associações de vários fatores de risco, tais como nascimento prematuro, baixo peso ao nascer, defeitos cromossómicos, síndromes genéticas ou doença grave com disfunção de múltiplos órgãos, e, portanto, exige cuidados altamente dedicados em unidades de terapia intensiva neonatal capazes de oferecer suporte a neonatos de alto risco.

No que se refere especificamente ao recém-nascido cirúrgico, excetuando alguns estudos limitados a uma única patologia ou cirurgia, a análise de fatores preditivos de complicações pós-operatórias em neonatos ainda é incompleta e não existem dados disponíveis relativos a preditores de mortalidade pós-operatória em neonatos sujeitos a anestesia geral para diversos tipos de cirurgia. Esta informação é especialmente escassa em Portugal, faltando estudos que analisem os resultados de morbimortalidade operatória em centros de referência para esta população de risco.

1.6 Conclusões e Definição do Problema

Após traçar a panorâmica sobre “Anestesia, Sedação e Analgesia em Ser Imaturo”, incidindo designadamente sobre a fundamentação teórica do tema, definição etimológica, evolução histórica da anestesia pediátrica, indicações cirúrgicas para anestesia neonatal, aspetos da fisiologia neonatal relevantes na vulnerabilidade característica deste grupo etário à anestesia, à dor e ao stresse cirúrgico e fármacos mais usados em anestesia pediátrica, identificámos os problemas e lacunas de conhecimento científico que nortearam os estudos realizados no âmbito desta Tese, tais como:

- 1) Falta de estudos pré-clínicos sobre o efeito no neurodesenvolvimento da administração repetida de fármacos opióides e benzodiazepinas em contexto de dor e stresse cirúrgico em período de imaturidade do SNC.
- 2) Falta de estudos de compilação e análise crítica de publicações da literatura versando perturbações persistentes do neurodesenvolvimento após exposição a anestésicos de crianças em fase de imaturidade cerebral e de estudos de morbimortalidade relacionada com a anestesia geral no primeiro ano de idade e em particular nos seus diferentes subgrupos de vulnerabilidade: primeiro mês de idade e 1 a 12 meses de idade.
- 3) Falta de estudos de morbimortalidade pós-operatória em centros de referência para esta população de risco em Portugal.
- 4) Falta de definição de fatores de risco independentes para morbimortalidade após diversos tipos de cirurgia neonatal.

Tendo como objetivo geral contribuir para a fundamentação científica do tema, delineámos o contributo pessoal com base nas seguintes hipóteses de trabalho:

1º Hipotetizamos que opióides/benzodiazepinas usados repetidamente em período de imaturidade do SNC podem induzir alterações persistentes no desenvolvimento somático e de comportamento, tendo projetado a investigação em contexto de experimentação animal.

2º Hipotetizamos que existe evidência clínica de risco tóxico potencial no neurodesenvolvimento de criança submetida a anestesia geral em período de imaturidade do SNC, tendo projetado uma revisão sistemática da literatura referente aos estudos realizados em humanos relacionados com esta questão clínica.

3º Hipotetizamos que existe evidência clínica de maior risco de morbimortalidade pós-operatória em subgrupos pediátricos expostos a cirurgia/anestesia durante o primeiro ano de idade, tendo projetado uma revisão sistemática da literatura referente aos estudos realizados em humanos relacionados com esta questão clínica.

4º Hipotetizamos que a morbimortalidade operatória após cirurgia neonatal permanece elevada, mesmo em contexto de prestação de cuidados de saúde otimizados, e que existem fatores de risco independentes para o aumento da morbimortalidade neste grupo específico, tendo projetado um estudo de uma coorte de neonatos de alto risco cirúrgico submetidos a cirurgia/anestesia neonatal em centro terciário com cuidados de saúde otimizados.

2 OBJETIVOS

Os principais objetivos dos estudos incluídos nesta Tese foram:

- Verificar os efeitos da exposição neonatal repetida a fentanil ou midazolam no desenvolvimento físico, motor e de comportamento e na histopatologia de áreas do sistema nervoso central em contexto de dor pós-operatória e stresse (Estudo A).
- Avaliar e sintetizar os resultados e conclusões de estudos epidemiológicos publicados na literatura sobre perturbações persistentes do neurodesenvolvimento após exposição a anestésicos de crianças em fase de imaturidade cerebral, através de revisão sistemática da literatura (Estudo B).
- Analisar, em revisão sistemática, o perfil epidemiológico da morbimortalidade relacionada com a anestesia geral no primeiro ano de idade e nos seus diferentes

subgrupos de vulnerabilidade: primeiro mês de idade e 1 a 12 meses de idade (Estudo C).

- Analisar a morbimortalidade e seus fatores preditivos após cirurgia neonatal sob anestesia geral num centro de cuidados otimizados ao recém-nascido cirúrgico (Estudo D).

II

ESTUDOS DE CONTRIBUTO PESSOAL

Este capítulo inclui os 4 estudos que resultaram de contributo pessoal: um estudo experimental (Estudo A), duas revisões sistemáticas da literatura em contexto clínico (Estudos B e C) e um estudo epidemiológico clínico (Estudo D). Apresentamos cada estudo individualmente segundo o seguinte formato: justificação do estudo, objetivos específicos, métodos, discussão e conclusões.

ESTUDO A

EFEITOS NO RATO INFANTIL DA INJEÇÃO REPETIDA DE FENTANIL OU MIDAZOLAM NO PERÍODO DE RECÉM-NASCIDO EM CONTEXTO DE STRESSE CIRÚRGICO

Um excerto deste estudo está publicado na *Anesthesiology Research and Practice*.¹³⁴

A.1 JUSTIFICAÇÃO DO ESTUDO

Apesar da ampla utilização de anestésicos gerais, analgésicos e sedativos no período neonatal desconhecem-se os seus efeitos precisos em contexto de imaturidade fisiológica e stresse cirúrgico. Opióides, como o fentanil, e benzodiazepinas, como o midazolam, são fármacos de uso corrente em unidades terciárias de cuidados intensivos pediátricos, onde constituem os pilares de sedação, analgesia e anestesia de recém-nascidos gravemente doentes.⁹³ Nestes recém-nascidos é particularmente preocupante a utilização prolongada de fentanil e de midazolam no período neonatal, durante uma fase de imaturidade cerebral, sem que se saiba quais as repercussões persistentes sobre o sistema nervoso central (SNC). Na clínica é bem conhecida a síndrome de abstinência em recém-nascidos de mães toxicodependentes de opióides¹⁴⁷ e por iatrogenia em recém-nascidos criticamente doentes internados em unidades de cuidados intensivos e expostos por longos períodos à perfusão de opióides, incluindo fentanil, e/ou midazolam.^{148,149} Além disso, numa análise retrospectiva de uma pequena coorte de lactentes humanos prematuros, Cambonie e colaboradores sugeriram maior risco de leucomalácia periventricular da prematuridade associado à utilização de fentanil.^{58,150} Acresce a informação pré-clínica de que a exposição de circuitos nociceptivos e não-nociceptivos do sistema nervoso a analgésicos e sedativos modula a sinalização de recetores relacionada com o desenvolvimento do cérebro e de dados experimentais em animais fornecendo evidências de que a exposição crónica a opióides, sedativos ou suas combinações em fase de surto de crescimento cerebral diminui o número de neurónios e diminui o crescimento e ramificações dendríticas, o que tem sido associado a défices motores e de aprendizagem,¹⁵¹ sugerindo neurotoxicidade por utilização quer de fentanil quer de midazolam em fase de imaturidade do SNC.

No que concerne a estudos com exposição ao fentanil em animais com SNC em desenvolvimento, um reportou exacerbação do dano histopatológico do cérebro de modelo murino neonatal de lesão da substância branca, provocada por exposição repetida a injeções de doses altas de fentanil,⁵⁸ embora tal não tenha sido corroborado por um estudo recente no porco recém-nascido em que não se observou apoptose cerebral após 24 horas de perfusão intravenosa contínua.⁵⁹

Pela possibilidade de a exposição prolongada a fentanil ou a midazolam em fase de desenvolvimento do SNC poder induzir alterações persistentes do neurodesenvolvimento e por não termos identificado nenhum estudo pré-clínico ou clínico na literatura que abordasse este assunto, o nosso estudo pré-clínico vem de encontro à necessidade de adquirir novos conhecimentos que permitam melhorar a compreensão dos efeitos persistentes destes fármacos no neurodesenvolvimento ao serem administrados numa fase de intensa plasticidade sináptica.

No presente estudo testámos a hipótese de que a exposição a fentanil ou a midazolam no período neonatal iria aumentar o risco de alterações do neurodesenvolvimento. Para este efeito, seleccionámos um modelo murino neonatal de stress cirúrgico ao qual injetámos repetidamente fentanil ou midazolam numa idade com desenvolvimento cerebral equivalente ao do prematuro tardio humano. Assim, recorrendo a uma ampla bateria de testes para avaliação do neurodesenvolvimento de modelo murino, examinámos o crescimento e desenvolvimento somático e funções motoras e cognitivas do rato em idade pré-desmame, a qual corresponde aos primeiros anos de vida da criança. Em estudo histopatológico, realizado no final da experiência, em P21, analisámos por histomorfometria áreas do córtex peri-rinal, giro dentado do hipocampo e cerebelo.

A.2 OBJETIVOS

Tivemos como principal propósito:

Verificar a repercussão no desenvolvimento físico e comportamento de ratos infantis, após administração repetida de fentanil ou de midazolam a rato neonato em contexto de stresse cirúrgico.

Foram objetivos específicos:

Relativamente ao fentanil, estudar se a administração repetida de injeções de fentanil em idade neonatal precoce provoca:

- alterações agudas do desenvolvimento físico e do desenvolvimento reflexo e neuromotor;
- alterações do crescimento e desenvolvimento físico e do desempenho motor, cognitivo e de comportamento em rato infantil no período pré-desmame;
- alterações da histomorfologia do SNC no rato infantil em P21, avaliadas em microscopia ótica com análise qualitativa e quantitativa do córtex peri-rinal, giro dentado do hipocampo e córtex do cerebelo.

Relativamente ao midazolam, estudar se a administração repetida de injeções de midazolam em idade neonatal precoce provoca:

- alterações agudas do desenvolvimento físico e do desenvolvimento reflexo e neuromotor;
- alterações do crescimento e desenvolvimento físico e do desempenho motor, cognitivo e de comportamento em rato infantil no período pré-desmame;
- alterações da histomorfologia do SNC no rato infantil em P21, avaliadas em microscopia ótica com análise qualitativa e quantitativa do córtex peri-rinal, giro dentado do hipocampo e córtex do cerebelo.

A.3 MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

O estudo decorreu na Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (FMUC). As ninhadas de *Rattus norvegicus*, variedade Wistar, descendentes de animais originários do Laboratório Charles-River, L'Arbresle Cedex, França, estiveram alojadas com as respetivas progenitoras em caixas de plástico adequadas à espécie durante toda a experiência até ao 21º dia de vida pós-natal e mantiveram-se sob condições laboratoriais normalizadas de temperatura, ciclos de luz e de humidade relativa e com acesso livre a água e a ração sólida comercializada para a espécie.

Cada grupo, constituído por 10 animais do sexo masculino com 6 dias de vida pós-natal (P6), proveio de pelo menos 3 ninhadas. Na realização do protocolo experimental respeitaram-se as Recomendações Éticas e de Bem-Estar-Animal regulamentadas na legislação portuguesa (Portaria 1005 de 1992)¹⁵² adaptada da Diretiva Europeia 1986/609/EEC¹⁵³ e da sua revisão 2010/63/EU.¹⁵⁴ O estudo foi previamente aprovado pela Comissão de Ética da FMUC.

Modelo de Dor Incisional Pós-operatória

Seguiu-se o método descrito por Brennan e colaboradores para a criação do modelo de dor incisional pós-operatória.¹⁵⁵

Desinfetou-se a planta da pata posterior direita de rato P6 com solução de iodopovidona a 10%, aplicou-se anestésico tópico em *spray* (cloreto de etilo) e realizou-se uma incisão mediana profunda na planta da pata, entre o calcanhar e a base dos dedos, utilizando lâmina de bisturi nº 11. Aprofundou-se a ferida mediante a elevação e incisão longitudinal do músculo flexor subjacente. Finalmente, procedeu-se ao encerramento da ferida operatória com pontos separados de *nylon* 6/0.

Fármacos

Utilizaram-se as seguintes soluções:

- (1) Fentanil (solução injetável 0,05 mg/mL; B. Braun Medical Lda. Barcarena, Portugal) diluído a 0,25 µg/mL em soro fisiológico (solução salina a 0,9%).
- (2) Midazolam (solução injetável 5 mg/mL; B. Braun Medical, S. A., Barcelona, Espanha) diluído a 400 µg/mL em soro fisiológico (solução salina a 0,9%).

Grupos Experimentais

Constituíram-se os seguintes grupos: (1) Fent (fentanil): incisão da pata + fentanil, (2) Mdz (midazolam): incisão da pata + midazolam, (3) Sham: (controlo *sham* operado com injeção de veículo): incisão da pata + solução salina a 0,9%, e (4) NãoOp (não-operado): sem incisão da pata nem injeção, mas crias manipuladas em observação diária.

Procedimentos Experimentais

Em P6 transferiu-se a ninhada e respetiva progenitora para nova gaiola com material de cama limpo. Pela observação anogenital procurou-se determinar quais as crias do sexo masculino. Limitou-se a ninhada a um máximo de 12 crias. Procedeu-se à numeração de cada rato com tinta de marcador de acetato resistente à água e à distribuição aleatória dos machos por grupos. Realizaram-se os testes de base, registou-se o peso de cada rato e procedeu-se à injeção subcutânea na face dorsal do pescoço da primeira dose do fármaco de teste do grupo (1) fentanil, 25 μg por kg de peso (0,1 mL por g de peso corporal de uma solução de fentanil diluída a 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em solução salina a 0,9%), ou (2) midazolam, 4 mg por kg de peso (0,1 mL por g de peso corporal de uma solução de midazolam diluída a 0,4 mg/mL em solução salina a 0,9%) ou (3) solução salina a 0,9%, 0,1 mL por g de peso corporal. A injeção foi imediatamente seguida da realização de ferida cutânea-muscular profunda na região plantar utilizando o método previamente descrito.¹⁵⁵ Repetiram-se as injeções do fármaco teste ou do soro salino duas vezes por dia (com pelo menos 8 horas de intervalo) durante 3 dias consecutivos, utilizando a mesma via de administração e doses equivalentes às do primeiro procedimento, até perfazer 6 doses por fármaco.

Nos animais do grupo não operado procedeu-se apenas à realização dos testes de base e registo do peso e à desinfecção e anestesia da planta da pata.

Durante os procedimentos vigiou-se a eventual ocorrência de efeitos adversos, designadamente depressão respiratória.

A Figura II.A.1 indica os testes efetuados e período temporal da sua realização.

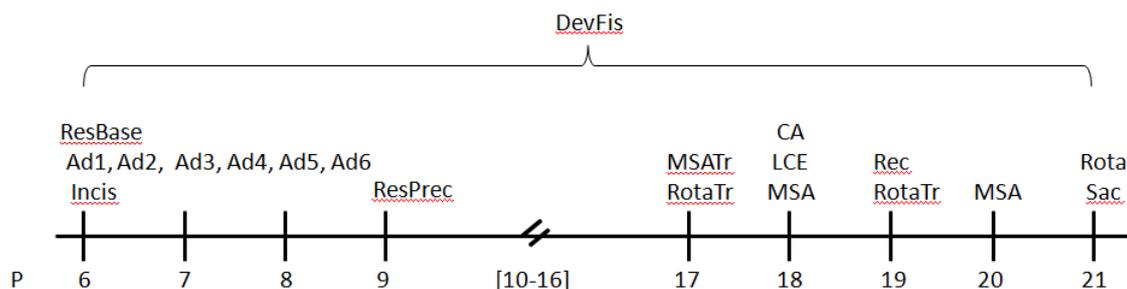


Figura II.A.1: Avaliação do desenvolvimento físico e de crescimento e testes de comportamento efetuados. P= Dia pós-natal; DevFis= Avaliação de crescimento e de desenvolvimento físico (P6-P21); ResBase= Resultados base (reflexo de endireitamento, geotaxia negativa e atividade locomotora); Ad= Administração de injeção de acordo com o grupo (fentanil, solução salina a 0,9%, midazolam) (P6-P8); Incis= Incisão da pata ou manipulação de acordo com o grupo (P6); ResPrec= Resultados precoces (P9); MSATr= Treino de manobra de suspensão em arame (P17); MSA= Teste de manobra de suspensão em arame (P18 e P20); RotaTr= Treino em rotarod (P17 e P19); Rota= Teste em rotarod (P21); CA=Teste em campo aberto (P18); LCE= Teste em labirinto em cruz elevado (P18); Rec= Teste de reconhecimento de novo objeto (P19); Sac= Sacrifício (P21).

Durante o período experimental, monitorizou-se diariamente o crescimento (peso) e avaliou-se o desenvolvimento físico, pesquisando o aparecimento da erupção dos dentes incisivos inferiores e da abertura dos olhos. De acordo com outros autores,¹⁵⁶ utilizou-se a seguinte graduação na avaliação do número de olhos abertos: 0 (ambos os olhos fechados), 1 (1 olho aberto) e 2 (2 olhos abertos).

Ao 9º dia após o nascimento (P9), pelo menos 8 horas após a última injeção, procedeu-se à avaliação dos efeitos agudos de exposição aos fármacos usando o crescimento e o desenvolvimento físico e neuromotor como parâmetros do estudo. Nessa altura procedeu-se à remarcação dos animais utilizando o sistema de corte no pavilhão da orelha.

Entre o 10º dia pós-natal (P10) e o 21º dia pós-natal (P21) decorreu nova fase do estudo. Além da avaliação do crescimento e do desenvolvimento físico, recorreu-se a um conjunto de testes de comportamento para estudar o desenvolvimento motor,

cognitivo e emocional dos animais. Os testes decorreram em sala apropriada, sossegada e com ambiente mal iluminado. Limpam-se os dispositivos utilizados na experiência com álcool a 70% entre cada animal testado. Filmaram-se os testes utilizando câmara de vídeo digital para possibilitar a análise posterior dos resultados.

No final da experiência, em P21, foi realizada necropsia e colheita de tecidos (encéfalo, pulmão, fígado, intestino e rim) e sua fixação para estudo histopatológico.

Avaliação do Comportamento

Avaliação dos Resultados Precoces em Neonato (P9)

Nesta fase do estudo submeteram-se os animais aos seguintes testes para avaliar os efeitos agudos da administração repetida de fentanil ou de midazolam:

Reflexo de Endireitamento (ou Reflexo Postural)

Este teste, realizado de acordo com um procedimento previamente descrito,¹¹⁹ serve para avaliar a maturação subcortical. Consiste no tempo (em segundos) para que uma cria de rato colocada em decúbito dorsal retorne à sua posição normal, isto é, se posicione sobre as 4 patas. O teste efetuou-se em P6 (informação de base) e em P9. Para a medição do parâmetro em estudo utilizou-se um cronómetro, estabelecendo-se 30 segundos como tempo limite para que se completasse o reflexo.

Geotaxia Negativa

Neste teste, realizado de acordo com um procedimento previamente descrito,¹¹⁹ com ligeiras adaptações, são avaliados o desenvolvimento reflexo, competências motoras e funções do labirinto vestibular.¹¹⁵ Consiste no tempo (em segundos) que uma cria de rato colocada num plano inclinado a 25° de cabeça para baixo requer para se reorientar, girando o corpo 180°. O teste efetuou-se em P6 (informação de base) e em P9. Estabeleceu-se um tempo limite máximo de 60 segundos, medido com cronómetro. Em caso de insucesso permitiram-se até 3 tentativas. A cada tentativa falhada foi arbitrariamente atribuído o valor 61.

Atividade Locomotora

A atividade locomotora testou-se em P6 (informação de base) e em P9. Colocou-se o rato num poço circular (6 cm de diâmetro e 2 cm de altura) e avaliou-se a atividade locomotora durante 3 minutos. Esta foi graduada em 1 (imóvel com a cabeça apoiada no chão), 2 (levanta a cabeça), 3 (trepa) e 4 (sai do poço).

Avaliação dos Resultados em Idade Infantil

Nesta fase do estudo submetem-se os animais aos seguintes testes para avaliar os efeitos a longo prazo da administração repetida de fentanil ou de midazolam:

Comportamento em Campo Aberto

O teste de campo aberto é uma medida da atividade motora espontânea e da atividade exploratória dos animais.^{117,118} O teste foi efetuado em P18, tendo sido realizado como previamente descrito,¹²⁰ com ligeiras adaptações. Colocou-se individualmente cada rato no centro da arena (dimensões: 60 cm de comprimento x 40 cm de largura x 25 cm de altura), com 12 áreas idênticas divididas por traços no chão. Avaliou-se o comportamento exploratório do animal contando o número de vezes que este cruzou as linhas do pavimento (quatro patas colocadas dentro da área adjacente) num período de 5 minutos. Adicionalmente, registaram-se a presença ou ausência de comportamentos exploratórios, tais como permanecer sobre as duas patas traseiras investigando o ambiente (*rearing*) e executar autolimpeza do corpo com as patas dianteiras (*grooming*). Foi atribuído *score* 1 à presença de qualquer destes comportamentos exploratórios nos 5 minutos do teste ou 0 à sua ausência. Adicionalmente registou-se o tempo de latência para o início da atividade de locomoção em campo aberto e observou-se a preferência pela área central ou pelos cantos do campo.

Labirinto em Cruz Elevado

O labirinto em cruz elevado é um método amplamente utilizado para avaliar o comportamento de ansiedade em roedores.^{117,124,125} A experiência efetuou-se em P18 segundo um método previamente descrito.¹²¹ Para o teste utilizou-se uma plataforma elevada (altura 49,5 cm) com quatro braços dispostos em cruz (largura 10 cm e comprimento 110,5 cm), dois abertos e dois fechados (ladeados por paredes com 30,5

cm de altura). Colocou-se cada rato na área central da plataforma de frente para um braço aberto e permitiu-se-lhe que explorasse a plataforma durante 5 minutos.

Mediu-se o comportamento exploratório de cada animal usando os parâmetros tradicionais: (1) percentagem de tempo nos braços abertos, obtida através da relação entre o tempo passado nos braços abertos e o tempo total do teste; (2) número de entradas nos braços abertos, correspondendo ao número de vezes que o animal atravessou a entrada de um braço aberto, colocando as 4 patas no seu interior; (3) número de entradas nos braços fechados, correspondendo ao número de vezes que o animal atravessou a entrada de um braço fechado, colocando as 4 patas no seu interior. A percentagem de tempo nos braços abertos e o número de entradas nestes foram usadas como medidas de ansiedade. Uma vez que a plataforma é elevada, os ratos evitam os braços abertos, contudo, dada a sua natureza exploratória, quanto menos ansiosos mais entram os braços abertos e mais tempo ali permanecem.

Manobra de Suspensão em Arame

Esta manobra serve para avaliar a força e coordenação motoras.¹²⁰ Realizou-se o teste durante 3 dias (habituação em P17 e testes em P18 e em P20). Utilizou-se um arame apoiado em plataformas laterais com 15 cm de altura e uma esponja colocada na base do aparelho para amortecer eventuais quedas. Ratos normais submetidos ao teste quando suspensos pelas patas dianteiras tendem a segurar-se com as patas traseiras que impedem a queda e ajudam na progressão ao longo do arame até alcançarem a plataforma.¹²⁰ Mediu-se o tempo de latência (em segundos) para o alcance de uma das plataformas, permitindo-se um tempo limite de 60 segundos. A cada tentativa falhada foi arbitrariamente atribuído o valor 61. Em caso de insucesso permitiram-se até 3 tentativas por teste (valor máximo de latência 183).

Teste de Reconhecimento de Um Novo Objeto para Memória de Curta Duração

Este teste, baseado na tendência natural dos roedores para investigar um novo objeto em vez de um familiar, realizou-se como previamente descrito.¹⁵⁷

Em P19 permitiu-se que cada rato se movesse livremente numa caixa de campo-aberto durante 3 minutos, para familiarização, seguido de um teste de exposição em que se colocou o rato no centro do campo contendo 2 objetos idênticos (blocos brancos

transparentes) localizados em 2 cantos adjacentes. Registou-se o tempo cumulativo passado a explorar cada objeto durante 5 minutos. Definiu-se exploração como o ato de tocar ou cheirar ativamente o objeto. Uma hora mais tarde testou-se a memória dos ratos utilizando o mesmo procedimento mas com substituição de um dos objetos familiares por um novo objeto de aspeto diferente. Registou-se o tempo de exploração para cada objeto (t_n e t_f , respetivamente para tempo de exploração do novo objeto e do objeto familiar) para determinação do índice de reconhecimento (IR). Determinou-se o IR pela relação $[t_n/(t_n+t_f)] \times 100$. Para um animal com esta competência cognitiva será de esperar que passe mais tempo a explorar o novo objeto.

Rotarod em Aceleração

Este teste serve para avaliar o equilíbrio e a coordenação motora, usando para o efeito um rotarod em aceleração.

Realizou-se o teste como previamente descrito,¹¹⁹ com ligeiras adaptações, utilizando um rotarod (Rota Rod LI 8200; Leticia SA Scientific Instruments).

O teste realizado em P21 teve 2 pré-testes, respetivamente em P17 e em P19. Nos 2 pré-testes submetem-se os ratos a habituação e treino colocando-os primeiro na roda parada para habituação, seguindo-se a roda em movimento, com aceleração 5-10-20 revoluções por minuto (rpm) num protocolo de 3 tentativas de 5 minutos para treino. Este treino foi repetido em P19. Em P21 testaram-se os ratos usando o rotarod em aceleração. Programou-se o aparelho para aceleração linear desde 4 a 40 rpm durante 300 segundos. Registou-se o tempo de latência até eventual queda do rotarod durante uma sessão de 300 segundos. Permitiram-se 3 sessões a cada animal e considerou-se para cada um o melhor tempo de latência das 3 sessões.

Histomorfometria do SNC em P21

Em quatro animais por grupo a colheita do encéfalo da calote craniana em P21 foi precedida da perfusão dos tecidos com paraformaldeído a 4% em PBS como descrito noutros estudos.¹⁵⁸ Após esta fixação procedeu-se à secção coronal do encéfalo para obtenção de fragmentos contendo as regiões de interesse segundo o descrito em mapas anatómicos do cérebro de rato.^{159,160} Os fragmentos foram depois imersos no mesmo soluto fixador com adição de sacarose a 20%. As amostras foram processadas de forma

convencional com inclusão em bloco de parafina nas 48 a 72 horas seguintes. Efetuaram-se cortes de 5 µm de espessura dos fragmentos de tecido contendo hipocampo/córtex peri-rinal e cerebelo que foram corados por hematoxilina e eosina (H&E) e por violeta de cresil (uma das técnicas mais utilizadas em estudos do sistema nervoso por possibilitar a evidência da substância de Nissl, material granular constituído por RNA ribossomal, presente nas células nervosas). A observação foi realizada em microscópio ótico Nikon® com sistema acoplado de registo de imagem digital. As colorações histológicas foram observadas em diversas ampliações tendo-se procedido à captura de imagens digitais para posterior análise qualitativa e quantitativa do córtex peri-rinal, giro dentado do hipocampo e camadas granulares e de células de Purkinje no córtex do cerebelo.

O córtex peri-rinal foi identificado no lobo temporal médio (Figura II.A.2 a), tendo em conta que no rato se situa ao longo e dorsalmente ao sulco rinal, tendo como limite caudal o córtex pós-rinal e como limite ventral e medial o córtex entorrinal e estando constituído por diversas camadas celulares com diferentes características morfológicas, denominadas de I a VI.^{161,162}

O giro dentado foi identificado no hipocampo tendo em conta a sua morfologia característica (Figura II.A.2 b).

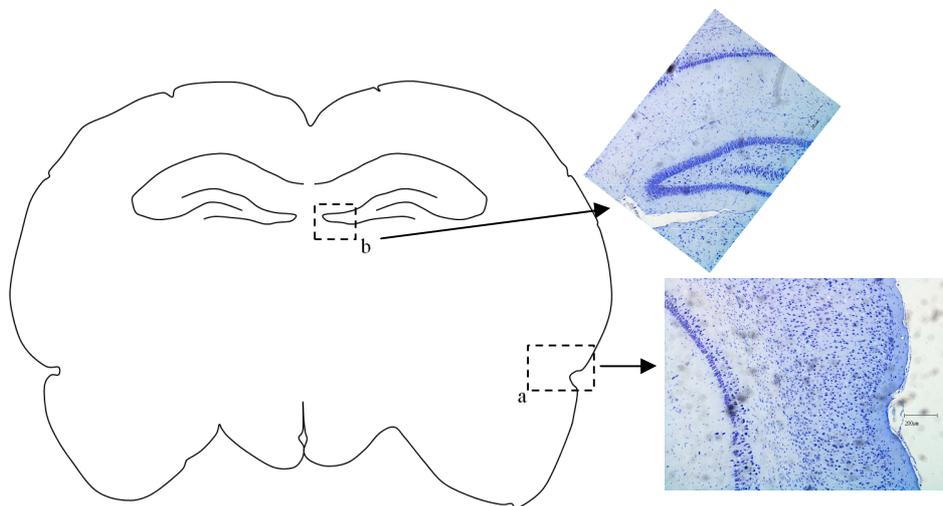


Figura II.A.2: Representação esquemática do cérebro de rato. a: córtex peri-rinal e b: giro dentado do hipocampo.

A histomorfometria de áreas do córtex peri-rinal, giro dentado e córtex do cerebelo foi efetuada de forma cega através do *software* ImageJ (versão 1.47v, Wayne

Rasband, National Institutes of Health, EUA). As imagens foram selecionadas aleatoriamente de pelo menos três campos não sobrepostos por região em ampliações de 400x. A análise morfométrica das diversas regiões baseou-se na determinação quantitativa da densidade neuronal, medida através da percentagem de área de substância de Nissl corada na região selecionada e na contagem manual das células de Purkinje da respetiva camada do cerebelo, tendo nesta última sido determinada a percentagem de corpos celulares evidenciando sinais de neurodegenerescência (como diminuição do tamanho da célula, fragmentação nuclear, cromatina condensada e neurónios escuros), como definido por outros autores.¹⁶³

Análise Estatística

Realizou-se a análise estatística no programa de estatística SPSS (versão 19, SPSS, Inc., Chicago, Il). Determinou-se a normalidade das distribuições usando os testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk. Usou-se a análise de variância (*one-way* ANOVA), seguida do teste Tukey para a comparação entre mais de 2 grupos, em caso de distribuição normal. Na distribuição não normal usou-se o teste Kruskal-Wallis (mais de 2 grupos) seguido, em caso de resultado significativo, do teste Mann-Whitney U (2 grupos) com correção apropriada pelo método de Holm-Bonferroni. Usou-se o χ^2 ou o teste Exato de Fisher, quando apropriado, para análise de variáveis categóricas.

Considerou-se significância para $P < 0,05$.

Os valores são expressos pela média±desvio padrão (DP), mediana e diferença interquartis (IQ) ou número e percentagem.

Os gráficos *boxplot* representam a mediana e percentis (25 e 75).

A.4 RESULTADOS

Resultados de Avaliação Precoce

Não ocorreram mortes na primeira fase do estudo. Os resultados mais relevantes dos testes realizados por grupo estão sumariados na Tabela II.A.1.

Tabela II.A.1 - Resultados de Avaliação Precoce

Variáveis	Grupos				P [#]
	Fent (n=10)	Sham (n=10)	NãoOp (n=10)	Mdz (n=10)	
Peso, média (±DP), g					
P6	12 (± 1)	11 (± 2)	11 (±2)	13 (± 1)	0,119
P9	18 (±2)	16 (± 3)	16 (± 2)	17 (±2)	0,211
Latência endireitamento, mediana (IQ), segundos					
P6	2 (1)	2 (0)	2 (0)	2 (0)	0,066
P9	1 (0)	1 (1)	1 (0)	1 (1)	0,914
Latência geotaxia, mediana (IQ), segundos					
P6	183 (31) ^{*a; *b}	29 (125) ^{*a}	34 (145) ^{*b}	53 (152)	0,003*
P9	19 (14)	23 (33)	22 (35)	21 (66)	0,808
Score de atividade locomotora, mediana (IQ)					
P6	1 (1)	1,5 (1)	1 (1)	1,5 (1)	0,529
P9	2 (1)	3 (1)	3 (0) ^{*c}	2 (0) ^{*c}	0,012*

Px= dia pós-natal x; DP= desvio padrão; IQ (diferença interquartis); #= P correspondente ao teste Anova para a variável peso e ao teste Kruskal-Wallis nas restantes variáveis; *= significância estatística (^{*a} P= 0,001; ^{*b} P= 0,005; ^{*c} P= 0,008; no teste Mann-Whitney U com correção pelo método de Holm-Bonferroni); Scores de atividade locomotora: 1= imóvel e cabeça baixa; 2= eleva a cabeça; 3= trepa; 4= sai do poço.

As características de base avaliadas em P6, como o peso corporal, tempo de latência do reflexo de endireitamento e *score* de atividade locomotora foram semelhantes nos 4 grupos, excetuando o tempo de latência da geotaxia negativa. Observou-se diferença no tempo necessário para completar a geotaxia negativa, sendo este significativamente mais longo no grupo Fent do que nos controlos (Tabela II.A.1). Assim, Fent vs. Sham e Fent vs. NãoOp mostraram respetivamente P= 0,001 e P= 0,005.

Entre P6 e P9 todos os ratos aumentaram gradualmente de peso e não mostraram atraso no desenvolvimento físico.

Todos os grupos evidenciaram melhoria dos parâmetros medidos em P9 em comparação com os valores medidos em P6, designadamente o peso corporal, *score* da atividade locomotora, diminuição do tempo de reflexo de endireitamento e diminuição do tempo da resposta de geotaxia negativa.

A comparação dos resultados entre os grupos em P9 não mostrou diferenças estatisticamente significativas nos parâmetros peso corporal, tempo de latência do reflexo de endireitamento e tempo de resposta de geotaxia negativa. Verificou-se tendência para menor atividade locomotora nos grupos Fent e Mdz, em que

respetivamente 70% e 80% dos animais desses grupos tinham *score* inferior a 3 em comparação com 30% de animais do grupo Sham e 20% de animais do grupo NãoOp, no entanto esta tendência apenas atingiu significado estatístico na comparação entre os grupos Mdz e NãoOp (P= 0,008).

Resultados da Avaliação de Comportamento em Idade Infantil

Como esperado, todos os animais chegaram ao fim deste período de estudo.

A Tabela II.A.2 apresenta os resultados da avaliação do desenvolvimento físico e de testes de avaliação do comportamento entre P10 e o fim do estudo (P21).

Tabela II.A.2 - Resultados da Avaliação entre P10 e P21					
Variáveis	Grupos				P[#]
	Fent (n=10)	Sham (n=10)	NãoOp (n=10)	Mdz (n=10)	
Peso, média±DP, g					
P21	43±3 ^{*a; *b}	36±3 ^{*a; *c}	36±6 ^{*b; *d}	42±3 ^{*c; *d}	<0,001*
Scores abertura dos olhos, P14					
1 ou 2	90%	50%	30%	50%	0,058
Campo aberto, média±DP, número de cruzamentos					
P18	68±23	62±25	48±27	42±39	0,172
Tempo latência manobra de suspensão em arame, mediana (IQ), seg					
P18	127 (164)	183 (0)	183 (22)	90 (161)	0,037 [¥]
P20	25 (83)	75 (171)	76 (174)	75 (127)	0,856
Labirinto em cruz elevada, mediana (IQ), P18					
% t BA	18 (15,4) ^{*e}	7 (13,9)	10 (9,2)	5 (5) ^{*e}	0,005*
NE BA	2 (1)	1 (1)	1 (1)	1 (1)	0,607
NE BF	2 (2)	1 (0)	1,5 (1)	1 (0)	0,153
Índice de reconhecimento de novo objeto, mediana (IQ)					
P19	72 (22) ^{*f}	63 (26)	85 (13) ^{*g}	39 (52) ^{*f; *g}	<0,001*
Melhor tempo latência rotarod, média±DP, seg					
P21	173±24	123±73	128± 25	154±39	0,057

Px= dia pós-natal x; DP= desvio padrão; IQ (diferença interquartis); #= P correspondente ao teste Anova para as variáveis peso, campo aberto e melhor tempo latência rotarod e ao teste Kruskal-Wallis nas restantes variáveis; *= significância estatística (^{*a} P= 0,003; ^{*b} P= 0,001; ^{*c} P= 0,011; ^{*d} P= 0,004; no teste Tukey. ^{*e} P= 0,008; ^{*f} P< 0,001; ^{*g} P= 0,001; no teste Mann-Whitney U com correção pelo método de Holm-Bonferroni); [¥]= sem significado estatístico no teste Mann-Whitney U com correção pelo método de Holm-Bonferroni entre cada 2 grupos; g= gramas; seg= segundos; % t BA= percentagem de tempo que permaneceu nos braços abertos; NE= Número de entradas; BA= braços abertos; BF= braços fechados.

Crescimento

Observou-se aumento progressivo do peso corporal em todos os grupos, contudo esse aumento foi maior nos animais do grupo Fent e Mdz do que nos controles (Figura II.A.3). As diferenças evidenciaram significado estatístico desde P15 que perduraram até ao final do estudo. Especificamente em P21 quer os animais do grupo Fent quer os do grupo Mdz pesavam significativamente mais do que os controles. Assim, Fent vs. Sham e Fent vs. NãoOp mostraram respetivamente $P= 0,003$ e $P= 0,001$. Também Mdz vs. Sham e Mdz vs. NãoOp evidenciaram respetivamente $P= 0,011$ e $P= 0,004$.

Estes resultados indicam que a administração repetida de fentanil ou de midazolam em fase precoce do período neonatal em contexto de stresse cirúrgico promoveu o ganho significativo de peso corporal em rato lactente de idade infantil.

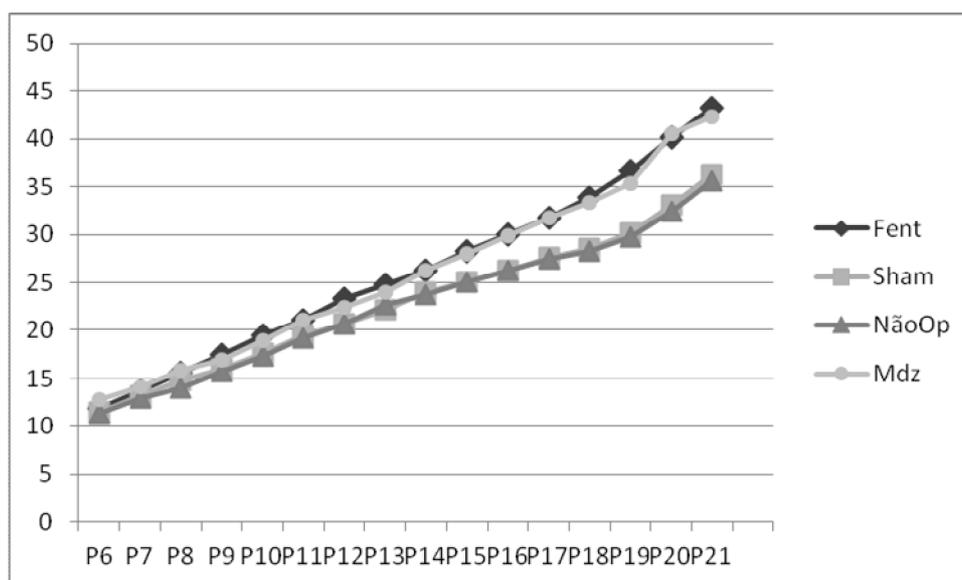


Figura II.A.3: Curva de crescimento representando a média de peso corporal (g) desde P6 a P21.

Abertura dos Olhos

A abertura dos olhos iniciou-se em P14. Na Tabela II.A.2 indica-se a percentagem de animais com pelo menos 1 olho aberto nesse dia. Noventa por cento dos animais do grupo Fent e 50% dos animais do grupo Mdz tinham pelo menos 1 olho aberto, evidenciando desenvolvimento mais precoce ou pelo menos igual aos controles (Sham: 50% e NãoOp: 30%). O *score* da abertura dos olhos em P14 foi tendencialmente maior no grupo Fent do que nos grupos de controlo, contudo sem diferenças

estatisticamente significativas (Figura II.A.4). No grupo Mdz a mediana de olhos abertos em P14 foi igual à do grupo Sham e tendencialmente maior que a do grupo NãoOp, contudo esta diferença (Figura II.A.4) não foi estatisticamente significativa.

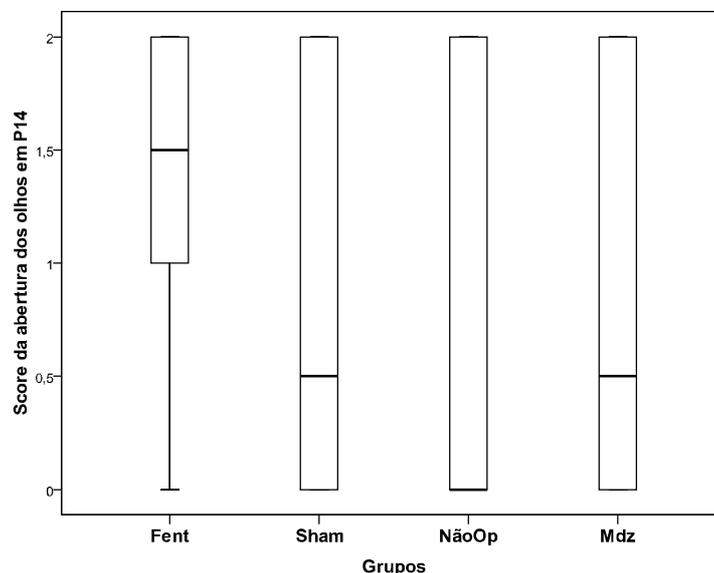


Figura II.A.4: *Boxplots* do *score* de abertura dos olhos em P14. O *score* de olhos abertos foi tendencialmente maior no grupo Fent do que nos restantes grupos. As comparações respetivamente entre o grupo Fent e os controlos e o grupo Mdz e os controlos não evidenciaram significado estatístico.

A análise dos resultados supracitados indica que a administração repetida quer de fentanil quer de midazolam a neonato murino em fase muito precoce do período neonatal não alterou o desenvolvimento físico normal de rato infantil.

Campo Aberto

A Tabela II.A. 2 indica a atividade locomotora em P18, medida pelo número de cruzamentos das linhas de campo aberto, nos 4 grupos do estudo.

As diferenças no número médio de linhas cruzadas em campo aberto entre o grupo Fent e os controlos Sham e NãoOp ou entre o grupo Mdz e os controlos Sham e NãoOp não foram estatisticamente significativas. O perfil de comportamento exploratório observado naquele dia também foi muito semelhante nos animais dos 4 grupos de estudo, sendo caracterizado em todos os casos por início imediato da atividade locomotora (latência até 20 segundos) após a colocação do animal na área

central do campo, existência de atividade de elevação sobre as 2 patas traseiras (*rearing*) ou de atividade de autolimpeza (*grooming*) (*score* 1) nos 5 minutos do estudo e preferência de exploração dos cantos do campo em comparação com a zona central.

Manobra de Suspensão em Arame

Em P17 (treino de habituação) todos os animais caíram do arame antes de atingirem a plataforma dentro do tempo pré-determinado.

Em P18, 60% dos ratos do grupo Fent e 90% dos ratos do grupo Mdz atingiram a plataforma sendo estas taxas de sucesso significativamente superiores ($P= 0,001$) às do grupo Sham (10%) e NãoOp (20%). Em P20, as taxas de sucesso evidenciadas pelos grupos Fent e Mdz mantiveram-se altas (100% no grupo Fent e 80% no grupo Mdz) e próximas das dos grupos de controlo (Sham 60% e NãoOp 70%), nesta altura sem diferenças estatisticamente significativas intergrupos. Além das maiores taxas de sucesso observadas nos grupos Fent e Mdz, os ratos destes grupos em P18 foram tendencialmente mais rápidos do que os controlos a cumprir a tarefa (Figura II.A.5).

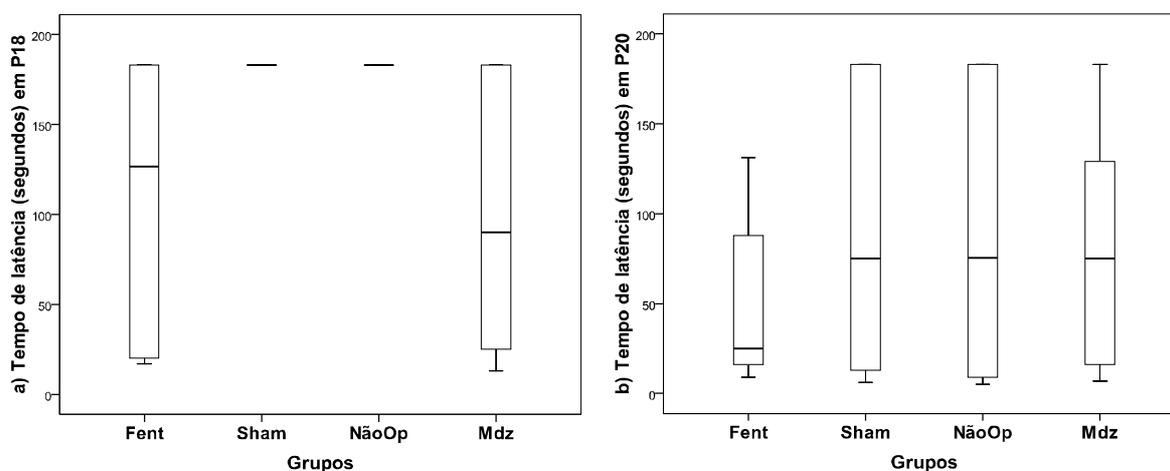


Figura II.A.5: Tempos de latência para alcance da plataforma nos 4 grupos de estudo em (a) P18 e (b) P20.

Comportamento Ansioso

Os gráficos da Figura II.A.6 ilustram a atividade exploratória medida através do número de entradas nos braços abertos ou fechados e a percentagem de tempo de permanência nos braços abertos de labirinto em cruz elevado (LCE), em ratos submetidos a este teste em P18.

O número de entradas nos braços abertos e o número de entradas nos braços fechados, medidos para avaliação da ansiedade não evidenciaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (Tabela II.A.2 e Figura II.A.6 a e b).

Quanto ao tempo de permanência nos braços abertos do LCE, os ratos do grupo Fent manifestaram o comportamento menos ansioso dos 4 grupos, como indicado pelo maior tempo de permanência nos braços abertos (Figura II.A.6 c), no entanto, só a comparação com o grupo Mdz atingiu significado estatístico (Fent vs. Mdz, $P=0,008$).

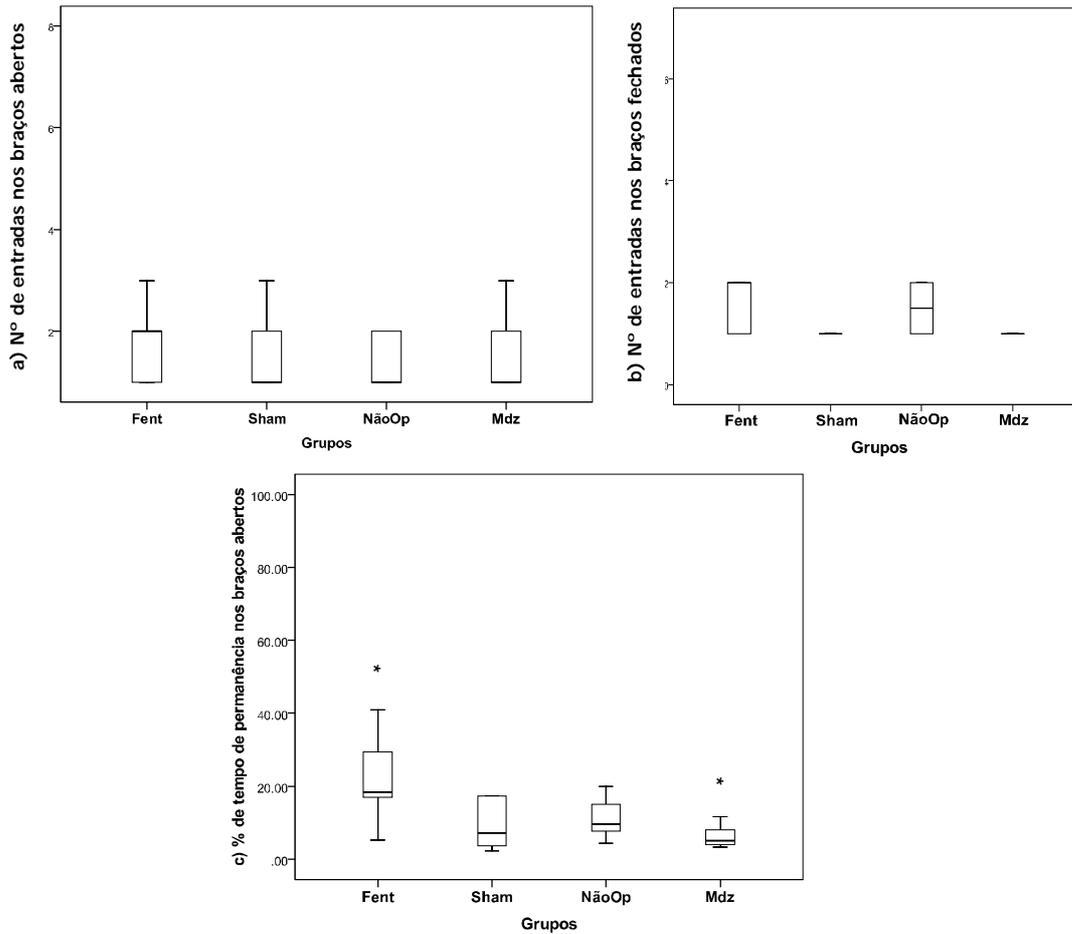


Figura II.A.6: Comportamento no teste do labirinto em cruz elevado. a) Número de entradas nos braços abertos, b) Número de entradas nos braços fechados e c) Tempo de permanência nos braços abertos. * Fent vs. Mdz, $P=0,008$.

Teste de Reconhecimento de Um Novo Objeto

Os resultados deste teste, realizado em P19, estão indicados na Tabela II.A.2 e são ilustrados pela Figura II.A.7.

O grupo Mdz evidenciou o pior índice de reconhecimento de um novo objeto (IRno), significativamente menor do que o do grupo Fent ($P < 0,001$) e NãoOp ($P = 0,001$), e o grupo Fent evidenciou um IRno semelhante ao dos grupos de controle NãoOp e Sham. As comparações intergrupos evidenciaram os significados estatísticos ilustrados na Figura II.A.7.

Estes resultados sugerem que a memória de reconhecimento de um novo objeto foi afetada negativamente pela administração de midazolam em contexto de stresse cirúrgico, ao contrário do ocorrido nos ratos tratados com fentanil.

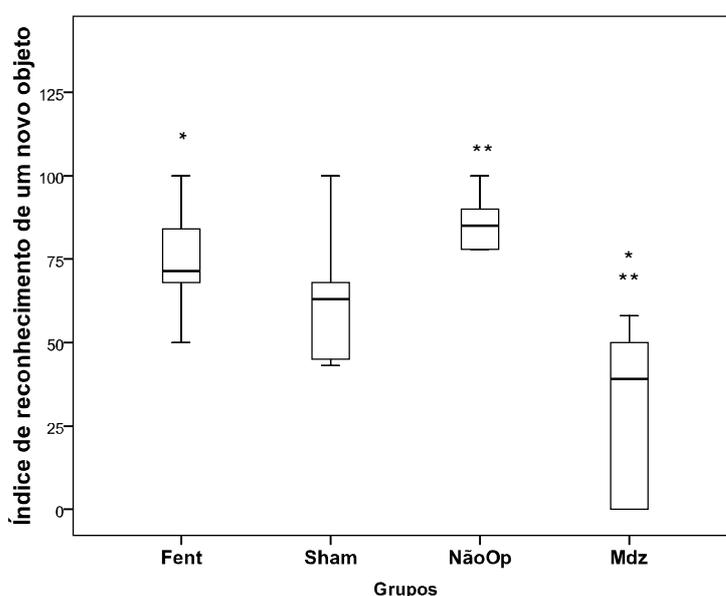


Figura II.A.7: Índice de reconhecimento de um novo objeto nos grupos de estudo.

* Fent vs. Mdz: $P < 0,001$; **NãoOp vs. Mdz: $P = 0,001$.

Rotarod em Aceleração

Em P21 avaliaram-se os efeitos da exposição repetida de ratos a fentanil ou a midazolam na coordenação motora e equilíbrio com base no melhor tempo de latência (o mais alto de 3 testes consecutivos) para cair de roda de rotarod em aceleração. Estes resultados estão indicados na Tabela II.A.2 e estão ilustrados na Figura II.A.8. Os ratos do grupo Fent mantiveram-se na roda de rotarod em aceleração mais tempo do que os outros 3 grupos, sem diferença estatisticamente significativa intergrupos.

A análise destes resultados sugere que a administração repetida dos fármacos em estudo no período neonatal precoce em contexto de stress cirúrgico não prejudicou o desenvolvimento de competências relacionadas com coordenação motora/equilíbrio.

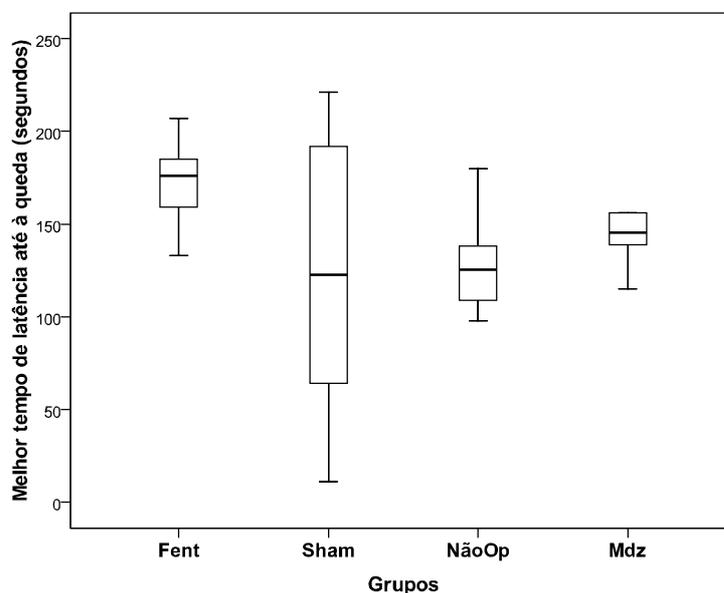


Figura II.A.8: Melhor tempo de latência para a queda de rotarod em aceleração (velocidade 5-40 rpm em 300 segundos).

Resultados Histopatológicos em Rato Infantil em P21

Necropsia e Histopatologia de Órgãos Intra-abdominais e Torácicos

A necropsia dos animais não evidenciou lesões sugestivas de toxicidade e o estudo histopatológico dos órgãos intra-abdominais e torácicos não detetou lesões.

Avaliação Histopatológica e Histomorfométrica do SNC

A avaliação qualitativa das colorações histológicas das regiões de interesse do encéfalo analisado em P21 evidenciou citoarquitetura globalmente conservada, sem necrose ou inflamação em nenhum dos grupos.

A histomorfometria do córtex peri-rinal, giro dentado do hipocampo e córtex do cerebelo (camada granular interna e camada de células de Purkinje) dos diferentes grupos está sumariada na Tabela II.A.3.

Tabela II.A.3 – Resultados da Histomorfometria do SNC em P21

Locais de análise	Grupos				P [#]
	Fent	Sham	NãoOp	Mdz	
CPR II/III; M±DP	10 ± 2,7	10 ± 2,2	13 ± 1,6	10±1,4	0,05
CPR V; m (IQ)	10 (4)	9 (3)	12 (2) ^{*a}	7 (3) ^{*a}	0,008*
Giro dentado; M±DP	50 ± 5,3	51 ± 8,4	58 ± 8,1	52 ± 5,9	0,057
Cerebelo (CGrI); M±DP	47 ± 4,7	48 ± 5,7	48 ± 5,0	50 ± 7,1	0,273
cP (células/100 μm); m (IQ)	3 (0,4)	3 (1,3)	3 (1,6)	3 (1,4)	0,156
% de cP em neurodegenerescência; m (IQ)	25 (18) ^{*b}	38 (20)	25 (19) ^{*c}	47 (22) ^{*b;*c}	0,005*

M±DP= média±desvio padrão; m (IQ)= mediana e diferença interquartis; CPR=córtex peri-rinal; II/III=camada celular II/III; CPR V=camada celular V; CGrI=camada granular interna; cP=células de Purkinje; #= P correspondente ao teste Anova para as variáveis CPR II/III, Giro dentado e camada granular interna do cerebelo e ao teste Kruskal-Wallis nas restantes variáveis; *= significância estatística (*^a P= 0,002; *^b P= 0,007; *^c P= 0,005; no teste Mann-Whitney U com correção pelo método de Holm-Bonferroni).

Morfometria do Córtex Peri-rinal

A análise quantitativa mediu a densidade neuronal de uma camada superficial (camada celular II/III) e de uma camada profunda (camada celular V) do córtex peri-rinal (Figura II.A.9.). Em ambas as camadas celulares esta densidade foi mais alta no grupo NãoOp em comparação com os restantes grupos, mas sem significância estatística intergrupos para os resultados da camada celular II/III, ao contrário dos da camada celular V em que a densidade neuronal do grupo NãoOp foi significativamente mais alta do que a do grupo Mdz (P= 0,002).

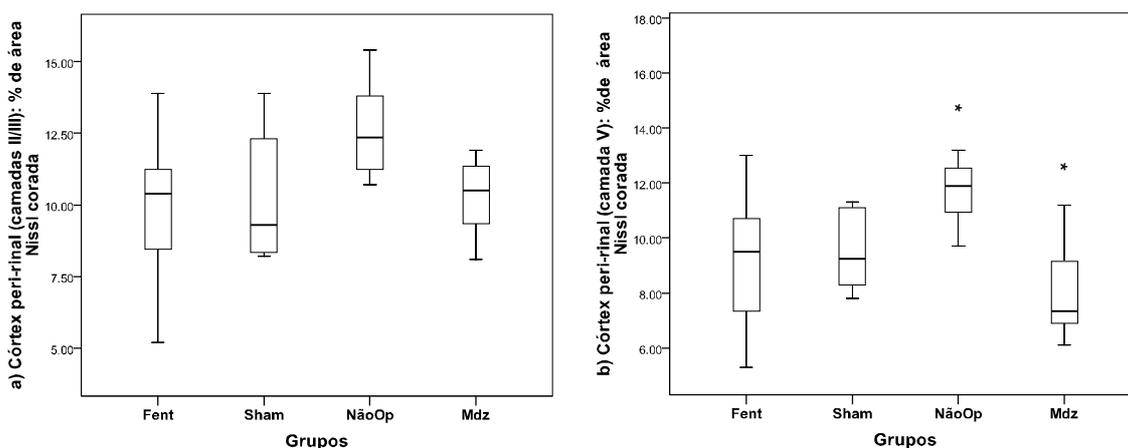


Figura II.A.9: Morfometria do córtex peri-rinal. a) Densidade neuronal da camada celular II/III e b) Densidade neuronal da camada celular V, * NãoOp vs. Mdz, P= 0,002.

A análise destes resultados evidencia uma diminuição significativa da densidade neuronal da camada celular V do córtex peri-rinal nos ratos do grupo Mdz.

Morfometria do Giro Dentado do Hipocampo

A análise quantitativa mediu a densidade neuronal dos ramos do “V” do giro dentado (Figura II.A.10). Esta densidade neuronal foi semelhante nos 4 grupos, embora tendencialmente mais alta no grupo NãoOp.

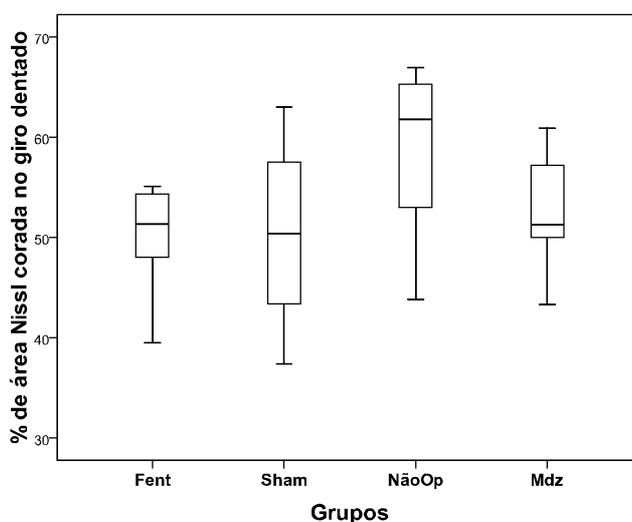


Figura II.A.10: Densidade neuronal no giro dentado no hipocampo dos ratos nos 4 grupos do estudo.

Histopatologia e Histomorfometria do Cerebelo

A Figura II.A.11 representa uma microfotografia de uma lâmina corada pelo violeta de cresil que mostra a organização celular de uma folha cerebelar de um rato do grupo NãoOp em P21. À semelhança deste, a análise microscópica de lâminas coradas de córtex cerebelar de ratos dos grupos Fent, Sham e Mdz permitiu o reconhecimento das suas 3 camadas, designadamente a camada molecular (CM), a camada das células de Purkinje (cP) e a camada granular interna (CGrI) e mostrou que em P21 nenhum dos grupos de estudo mantinha a camada granular externa.

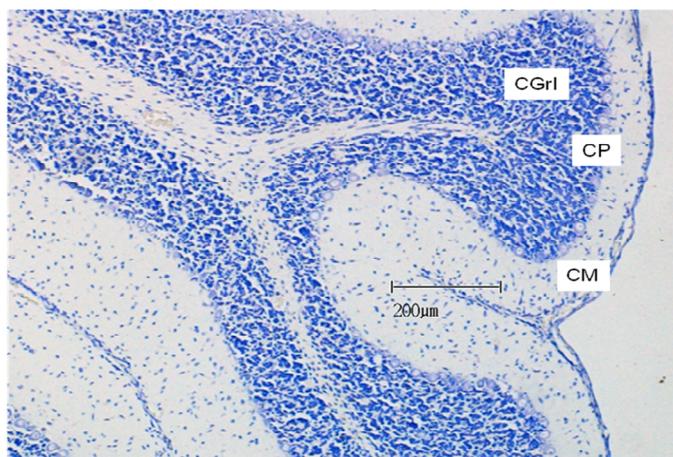


Figura II.A.11: Microfotografia de uma folha cerebelar de rato do grupo NãoOp em que se distinguem 3 camadas: uma externa (CM: camada molecular), uma média (CP: camada de células de Purkinje) e uma interna (CGrI: camada granular interna). Violeta de cresil, escala 200 μm .

A densa camada de pequenos neurónios (células granulares), a maioria das células observadas na CGrI, não evidenciou alterações morfológicas à observação microscópica e a análise quantitativa da densidade neuronal desta camada foi semelhante nos 4 grupos, como apresentado na Figura II.A.12. Pelo contrário, a camada de células de Purkinje, constituída por uma fileira única de grandes neurónios, apresentou características distintas nos diferentes grupos (Figuras II.A.13 e II.A.14). Assim, enquanto no grupo Fent predominavam células de Purkinje regularmente distribuídas na camada e com características citológicas geralmente normais, incluindo nucléolos bem evidentes em neurónio com coloração púrpura clara, muito semelhantes às do grupo de controlo NãoOp, no grupo Mdz as células de Purkinje eram mais espaçadas e muitas apresentavam sinais de neurodegenerescência caracterizados por diminuição do tamanho do corpo celular e condensação da substância de Nissl no citoplasma, o que lhes dava um aspeto azul púrpura escuro. No grupo Mdz o número de células de Purkinje foi tendencialmente menor que nos demais grupos, embora sem significado estatístico (Figura II.A.14 a), e a percentagem de células em neurodegenerescência neste grupo foi a maior (Figura II.A.14 b), sendo estatisticamente diferente da dos grupos Fent (Mdz vs. Fent, $P= 0,007$) e NãoOp (Mdz vs. NãoOp, $P= 0,005$).

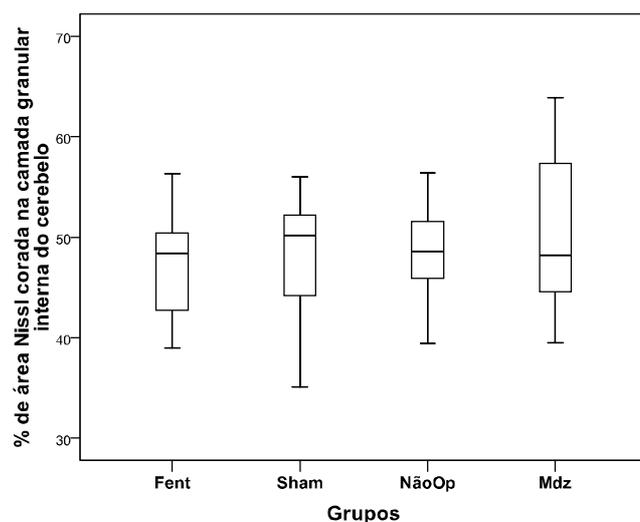


Figura II.A.12: Densidade neuronal na camada granular interna do cerebelo dos ratos dos 4 grupos.

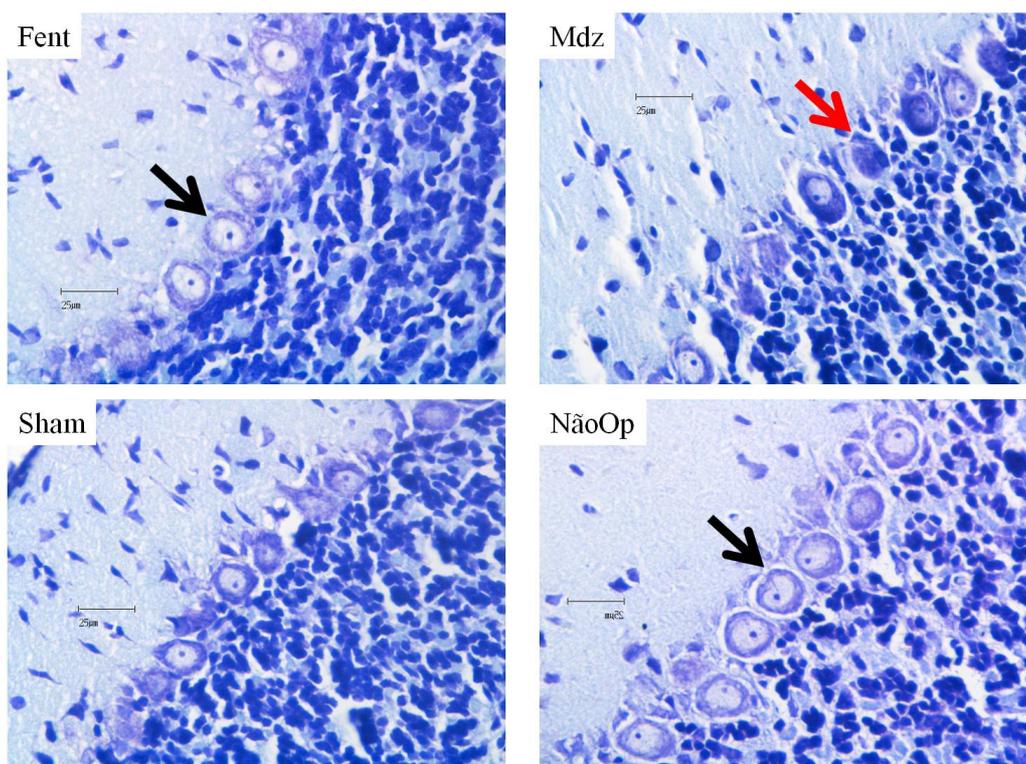


Figura II.A.13: Microfotografias do córtex do cerebelo de ratos, mostrando as características das células da camada de Purkinje (cP) nos 4 grupos do estudo. Setas pretas: cP normais; seta vermelha: cP com alterações sugestivas de apoptose. Violeta de cresil, escala 25 µm.

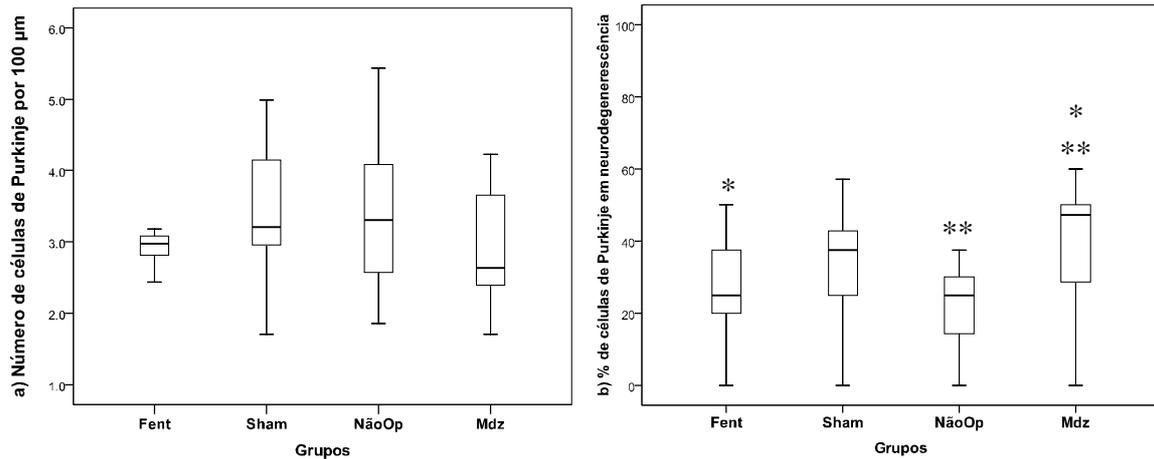


Figura II.A.14: Morfometria da camada de células de Purkinje (cP) no cerebelo dos ratos. a) Número de cP por 100 μm. b) Percentagem de cP em neurodegenerescência.

* Mdz vs. Fent, $P= 0,007$; ** Mdz vs. NãoOp, $P= 0,005$.

A.5 DISCUSSÃO

Este estudo levanta questões relativas ao impacto no neurodesenvolvimento do ser imaturo exposto a fentanil ou a midazolam, fármacos amplamente usados em contexto clínico (neonatos internados em unidades pediátricas de cuidados intensivos e submetidos a cirurgia), tendo tido o objetivo de verificar a repercussão no desenvolvimento físico e no comportamento de ratos infantis, após administração repetida de fentanil ou de midazolam a rato neonato em contexto de stresse cirúrgico.

Como resultado principal deste estudo encontrou-se: (1) evidência de um impacto negativo na memória de reconhecimento de um novo objeto e diminuição da densidade neuronal do córtex peri-rinal em ratos infantis previamente tratados com midazolam em contexto de stresse cirúrgico no período neonatal. Além deste, destacam-se ainda: (2) ausência de efeitos agudos adversos significativos no crescimento e neurocomportamento de ratos neonatos tratados com fentanil ou midazolam; (3) promoção de ganho de peso corporal anómalo em idade infantil após tratamento com fentanil ou midazolam; (4) ausência de efeitos adversos significativos nas competências neurocognitivas (memória de reconhecimento de um novo objeto, ansiedade, coordenação motora/equilíbrio) do rato infantil submetido a tratamento com fentanil no período neonatal; (5) ausência de impacto significativo na ansiedade e coordenação

motora/equilíbrio do rato infantil submetido a tratamento com midazolam no período neonatal; (6) neurodegenerescência das células de Purkinje do córtex do cerebelo do rato infantil após tratamento com midazolam no período neonatal.

O fentanil, um agonista potente dos recetores opióides μ , é um fármaco sintético que tem sido amplamente utilizado no tratamento da dor^{55,164} e como parte da anestesia geral para procedimentos cirúrgicos em pediatria,¹⁶⁵⁻¹⁶⁷ incluindo em unidades neonatais de cuidados intensivos.⁹³ Um estudo⁵⁵ identificou o fentanil como um dos cinco medicamentos mais prescritos em unidades pediátricas de cuidados intensivos, ocupando o terceiro lugar no grupo dos 36 fármacos mais prescritos a neonatos, sendo administrado a 60% dos recém-nascidos ali internados. Contudo, o fentanil não está aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para esta idade pediátrica.⁵⁴

O fentanil foi raramente associado a efeitos adversos significativos sobre o SNC ou outros sistemas, quando sob monitorização adequada.¹⁶⁸ No entanto, relativamente à sua utilização na população pediátrica em estado crítico, o fentanil é um dos vários medicamentos que não estão devidamente testados.⁵⁵

Está bem documentado na prática clínica que aumentos graduais da dose recomendada,¹⁶⁹ abuso ilícito,¹⁷⁰ interações medicamentosas¹⁷¹ ou suscetibilidade individual ao fentanil podem conduzir a neurotoxicidade grave e a morte.¹⁷⁰ Em unidades pediátricas de cuidados intensivos a infusão contínua prolongada (mais de 5 dias) pode provocar dependência fisiológica e síndrome de abstinência após a sua suspensão.¹⁴⁹ Em animais, Kofke *et al.*¹⁷² avaliaram os efeitos neuropatológicos do fentanil no cérebro de ratos tendo demonstrado que este produz lesões no sistema límbico numa ampla gama de doses. Noutro estudo, relacionado com os efeitos do fentanil em isquemia cerebral de rato, Kofke *et al.*¹⁷³ mostraram que este fármaco, em doses altas e baixas, pode exacerbar a isquemia incompleta prévia do prosencéfalo. Além disso, é bem reconhecido na literatura que doses altas de opióides em ratos, comparáveis a doses altas em humanos, podem produzir hipermetabolismo no hipocampo, atividade epileptiforme e lesões neuropatológicas.¹⁷⁴ A exposição ao fentanil durante o surto de crescimento cerebral também suscitou preocupações clínicas pela possibilidade de exacerbação de lesões cerebrais concomitantes frequentes nos doentes prematuros com doença crítica em idade de grande vulnerabilidade do SNC¹⁵⁰ e estudos pré-clínicos acentuaram essas preocupações ao terem detetado exacerbação do dano histopatológico do cérebro de modelo murino neonatal de lesão da substância branca, provocada por exposição repetida a injeções de doses altas de fentanil.⁵⁸

À semelhança do fentanil, o midazolam é um fármaco de uso frequente em pediatria como sedativo para procedimentos cirúrgicos,¹⁷⁵ incluindo a sedação de crianças com doença crítica internadas em unidades pediátricas de cuidados intensivos.¹⁷⁶ Num estudo o midazolam foi identificado como o primeiro entre os 36 fármacos mais administrados a recém-nascidos internados em unidades pediátricas de cuidados intensivos, sendo prescrito a 80% desses doentes.⁵⁵

O midazolam é uma benzodiazepina agonista dos recetores do ácido gama aminobutírico tipo A que tem ação depressora do SNC. Muitas das suas propriedades – ansiolíticas, de relaxamento muscular, amnésicas (anterógradas) e sedativas/anestésicas – têm efeitos principalmente mediados por potenciação pré e pós-sináptica da neurotransmissão GABAérgica. Este fármaco atua num local específico das benzodiazepinas no recetor GABA A, aumentando a permeabilidade ao ião cloro e levando a hiperpolarização da célula e conseqüente aumento do limiar de excitabilidade neuronal. O seu uso como sedativo em pediatria em ambiente hospitalar não tem sido associado a efeitos adversos graves. Dados do Consórcio de Pesquisa de Sedação Pediátrica mostraram que das 30 037 sessões de sedação/anestesia realizadas em 2004 e 2005 fora do bloco operatório, o evento adverso mais frequente foi a dessaturação (157 vezes por 10 000 sedações), tendo sido raros eventos adversos graves e não tendo ocorrido nenhuma morte.¹⁷⁷ Apesar da aparente tranquilidade em termos de segurança da administração deste fármaco em idade pediátrica, a sedação intravenosa contínua prolongada em crianças com doença crítica pode apresentar problemas de dependência fisiológica e pode ocorrer síndrome de abstinência após a sua suspensão.¹⁴⁹ Num estudo de coorte de doentes internados em unidade pediátrica de cuidados intensivos o midazolam foi associado a alterações do comportamento sugestivas de abstinência em 7,5% das crianças, tendo surgido nas 12 horas seguintes à suspensão da administração do fármaco e persistindo por 3 horas a 1 semana; em 1,9% dos casos ocorreu efeito paradoxal.¹⁷⁶ Vários investigadores mostraram que a administração prolongada de doses altas de midazolam a modelo murino neonatal com desenvolvimento cerebral equivalente ao humano das últimas semanas do terceiro trimestre de gestação provocou apoptose cerebral⁶¹ e que a sua associação com cetamina⁶¹ ou com isoflurano e protóxido de azoto,^{64,65} além do aumento da neurodegeneração,^{61,64,65} evidenciou déficit cognitivo no animal adulto.^{64,178} Além disso, noutro estudo, evidenciou-se um menor efeito sedativo em rato com cérebro em desenvolvimento em comparação com o do rato adulto.⁶²

Discussão do Modelo e Desenho Deste Estudo

Para estudar a repercussão no desenvolvimento físico e comportamento do tratamento repetido com fentanil ou midazolam, tanto em contexto de imaturidade do SNC como de dor e stresse cirúrgico, escolhemos o rato pelas vantagens económicas e facilidade de manuseamento, tendo combinado duas estratégias: o modelo para o estudo do desenvolvimento neurológico neonatal (crias com 6 dias de idade) e o de dor pós-incisional de Brennan.¹⁵⁵ Esta idade no rato (P6) reflete imaturidade do SNC e, embora a exata correspondência das idades de desenvolvimento neurológico de roedores para as de seres humanos continue a ser debatida,¹¹¹ a grande maioria dos autores considera que o rato recém-nascido na primeira semana pós-natal corresponde aproximadamente a um prematuro humano, na segunda semana pós-natal é equivalente ao do recém-nascido humano e na terceira semana pós-natal equivale à fase infantil no ser humano.¹⁷⁹ Acresce que numa revisão da autoria de Vidair este autor considera o rato um bom modelo de neurodesenvolvimento humano por as duas espécies compartilharem inúmeras vias de neurodesenvolvimento pós-natal.¹¹¹ O modelo de Brennan de dor incisional¹⁵⁵ foi escolhido uma vez que simula o ambiente clínico cirúrgico habitual envolvendo prematuros internados em unidades neonatais.

Os recém-nascidos prematuros normalmente apresentam um amplo espectro de comorbilidades que os tornam um grupo complexo de estudo, dadas as muitas variáveis, procedimentos dolorosos/stressantes e exposições farmacológicas envolvidas. Portanto, estudos experimentais com animais permitem-nos excluir potenciais fatores de confusão. No nosso estudo, utilizámos um modelo sem comorbilidades em contexto cirúrgico de dor pós-operatória e stresse. Este modelo pré-clínico, que inclui eventos dolorosos que espelham os sintomas observados em doentes submetidos a cirurgia,¹⁸⁰ deu-nos a oportunidade de explorar se a exposição repetida a fentanil ou a midazolam de recém-nascidos sujeitos a estímulos dolorosos leva a anomalias posteriores do neurodesenvolvimento. O modelo de dor pós-operatória utilizado foi previamente descrito por Brennan e colaboradores.¹⁵⁵ Este modelo consiste na incisão da pele plantar da pata do rato, com lesão do músculo subjacente, o que resulta em hipersensibilidade mecânica localizada que dura 3 a 5 dias. Pesquisas adicionais pelo grupo de Brennan mostraram libertação de aminoácidos excitatórios, tais como glutamato e aspartato, ativação de células do corno dorsal e sensibilização central.¹⁸¹

No que se refere ao protocolo do estudo, as doses de midazolam e de fentanil utilizadas, embora em primeira análise muito mais elevadas do que as doses humanas neonatais recomendadas, foram escolhidas de acordo com o metabolismo da espécie, refletindo doses usadas por outros autores e os valores ED50 (dose efetiva para 50% da população) encontrados em contextos clínicos em ratos no 6º dia de vida.¹⁸²⁻¹⁸⁴

No nosso modelo neonatal envolvendo stresse foram avaliadas as alterações no desenvolvimento usando um conjunto de testes validados, normalmente selecionados para a análise de toxicidade farmacológica no rato e foram analisadas a histopatologia e densidade neuronal de regiões do SNC identificadas em estudos animais como áreas com papel fundamental em processos cognitivos complexos, como a memória, a aprendizagem, o comportamento emocional e a coordenação motora, e que contêm recetores para os fármacos avaliados neste estudo,¹⁸⁵⁻¹⁸⁷ designadamente córtex peririnal, hipocampo e cerebelo.^{188,189} No contexto do presente estudo, o córtex peririnal, uma região cortical do lobo temporal médio que recebe informação de diversas regiões sensoriais e que se interconecta com várias estruturas do sistema hipocampal,¹⁹⁰ estando intimamente envolvido na perceção visual¹⁹¹ e na memória,¹⁹² é a região mais estreitamente associada ao processamento de informações sobre objetos e sua familiaridade,¹⁹³ competência classicamente avaliada pelo teste de reconhecimento de um novo objeto. Nesta tarefa são coativadas outras estruturas vizinhas igualmente importantes na memória e aprendizagem, como o hipocampo, nomeadamente o giro dentado.^{188,194} Esta subárea também tem sido relacionada com o comportamento emocional em situações de stresse e imaturidade,¹⁸⁹ comportamento que pode ser testado no labirinto em cruz elevado.¹⁹⁵ Enquanto escasseia informação sobre as lesões histomorfológicas do córtex peririnal em contexto de neurotoxicidade, o hipocampo está relativamente bem estudado, conhecendo-se por exemplo as consequências da exposição dos neurónios hipocampais dessas áreas a vários noxa,¹⁹⁶ nomeadamente o efeito na neurogénese em resposta a drogas de abuso ou stresse em idade precoce da vida. Pelos motivos referidos atrás, seleccionámos como regiões de interesse para a nossa análise histomorfológica, além do córtex peririnal, o giro dentado do hipocampo. Quanto ao cerebelo, estrutura estratificada formada por um córtex composto por quatro camadas no rato neonato (camada granular externa, camada molecular, camada das células de Purkinje e camada granular interna) e por três camadas após P20, por desaparecimento no rato desta idade da camada granular externa,¹⁹⁷ é um órgão fundamental no controlo motor e na aprendizagem adaptativa.¹⁹⁸ Neste órgão, as células

de Purkinje e as células granulares das camadas granular externa e interna assumem especial relevância, as primeiras como únicas eferências do córtex cerebelar, as segundas como únicas células precursoras das células granulares da camada granular interna e as últimas pelo papel que desempenham no controlo do fluxo de informações aferentes e eferentes. No presente estudo, a observação focou-se não só na análise das células de Purkinje, que se originam *in utero*, mas também na análise dos neurónios granulares pela relação temporal do seu aparecimento normal com a exposição do nosso modelo aos fármacos em estudo (P6-P9). No cerebelo de roedores, enquanto as células de Purkinje têm origem pré-natal, as células granulares aparecem durante as primeiras semanas após o nascimento,^{199,200} estando a neurogénese, migração e diferenciação de múltiplas estruturas cerebelares ainda a decorrer. Especificamente no cerebelo do rato, entre o nascimento e P14 ocorre divisão das células granulares da camada granular externa e entre P7 e P10 é atingido o pico de migração destas células precursoras em direção à sua posição final na camada granular interna.²⁰¹ Na mesma altura, entre P7 e P17, ocorre diferenciação funcional de sinapses para as células de Purkinje.²⁰² Além disso, sabe-se que a citoarquitetura normal do cerebelo pode ser alterada por efeito citotóxico no cerebelo imaturo no rato.²⁰³

Discussão dos Resultados

Nas condições do presente estudo, usando um modelo de dor pós-operatória neonatal, demonstraram-se pela primeira vez diversas alterações do crescimento e do comportamento de ratos infantis submetidos a injeções repetidas de fentanil ou de midazolam em período neonatal e em que os resultados, apresentados na Tabela II.A.2, sugerem impacto neurológico duradouro destes fármacos, positivo ou negativo. Algumas das alterações de comportamento correlacionam-se com os resultados histopatológicos apresentados na Tabela II.A.3.

Como resultado mais relevante destacou-se o efeito prejudicial na memória de reconhecimento de um novo objeto evidenciado no rato infantil após o tratamento com midazolam no período neonatal em contexto de stresse. Nestes ratos o índice de reconhecimento de um novo objeto no respetivo teste foi significativamente menor do que nos ratos do grupo NãoOp e do que nos tratados com fentanil (Tabela II.A.2). Acresce que este resultado se relacionou com os achados histomorfológicos de

diminuição da densidade neuronal na camada celular V do córtex peri-rinal dos ratos tratados com midazolam (Tabela II.A.3). Segundo Burke e colaboradores,²⁰⁴ estudos eletrofisiológicos mostraram que os neurónios desta camada, caracterizada pela presença de grandes células piramidais em forma de coração,^{161,162} são ativados por objetos tridimensionais. Estes autores, num estudo realizado em rato, correlacionaram alterações na camada V do córtex peri-rinal com resultados anormais em testes de exploração de objetos sugerindo uma relação de causa/efeito.²⁰⁴ Os nossos resultados são ainda corroborados por outro estudo, em que Wan e colaboradores sugerem o impacto negativo das benzodiazepinas na memória de reconhecimento por perturbação da plasticidade peri-rinal.²⁰⁵

Quanto ao crescimento, nenhum dos fármacos testados evidenciou alteração aguda do peso corporal. Contudo, em P21, quer os ratos tratados com fentanil quer os tratados com midazolam no período neonatal evidenciaram um ganho de peso significativamente maior do que os controlos e esta diferença vinha-se manifestando, embora subtilmente, desde a segunda semana de vida pós-natal e acentuando ao longo da terceira semana. Estes resultados sugerem que os efeitos da exposição neonatal precoce, quer a fentanil quer a midazolam, predispueram a um aumento do peso. Este achado tanto pode significar impacto positivo como negativo, podendo ser explicado por diversas hipóteses, nomeadamente alteração da reatividade emocional com maior disponibilidade para mamar, ou, pelo contrário, distúrbios metabólicos, perturbações de comportamento relacionadas com distúrbios alimentares ou diminuição da atividade física. Outros estudos encontraram relação entre a administração de opióides e alterações no comportamento alimentar.²⁰⁶ Por outro lado, Silveira *et al.*²⁰⁷ demonstraram que a administração crónica de midazolam a ratos se associou significativamente a um aumento de ingestão de alimentos doces, sendo este aumento menor, mas ainda presente e significativo, quando o midazolam foi administrado em contexto de stresse moderado. Uma importante questão que pode ser levantada pelos nossos resultados é se a alteração ponderal é transitória ou se persiste na idade adulta.

Existe evidência crescente que mostra que fármacos que interfiram nas funções do SNC podem causar neuroproteção farmacológica ou, pelo contrário, podem causar efeitos prejudiciais, dependendo das condições patológicas e das condições de plasticidade dos circuitos neuronais do SNC.^{58,111,208,209} Embora a análise dos efeitos do fentanil ou do midazolam no SNC seja dificultada pela multiplicidade e complexidade de mecanismos possíveis envolvidos quer na neuroproteção quer na neurotoxicidade, do

presente estudo ressalta uma ação semelhante de ambos os fármacos no crescimento do rato infantil e influências diferentes no que concerne aos resultados globais dos testes de avaliação de comportamento e histomorfométricos, com aparente inocuidade da administração de fentanil a rato recém-nascido contrastante com um impacto mais prejudicial nos ratos sujeitos a tratamento com midazolam. Assim, além do impacto na memória de curta duração, já discutido, evidenciou-se comportamento significativamente mais ansioso, nomeadamente nos resultados do teste do LCE, e maior número de células de Purkinje em neurodegenerescência no córtex cerebeloso de ratos tratados com midazolam.

No que concerne especificamente ao fentanil, sabe-se de estudos prévios que este fármaco intervém em importantes mecanismos celulares e moleculares neuronais, interferindo não só na rede neuronal ligada à criação de estados de anestesia, mas também em mecanismos envolvidos na neurogênese do hipocampo.²¹⁰ Esta potenciação da neurogênese, através do aumento da atividade NeuroD (um fator de transcrição essencial para o desenvolvimento do SNC), associada ao facto de o fentanil acelerar a mielinização do SNC,²¹¹ poderia ajudar a explicar os efeitos comportamentais tendencialmente melhores encontrados nos testes realizados no presente estudo.

Um aspeto que deixa dúvidas sobre se traduz impacto neurológico positivo ou negativo, além do ganho ponderal já discutido, refere-se ao efeito do fentanil na ansiedade, que, embora aparentando traduzir um efeito benéfico, na verdade pode ser originado por lesão neurológica. No contexto adverso em que se realizou o presente estudo, o esperado aumento da ansiedade foi aparentemente bloqueado pelo fentanil. Contudo, este bloqueio, que parece exagerado, traduzido pela ansiedade tendencialmente diminuída no LCE em comparação com os grupos de controlo, e que se torna significativa se o tratamento estatístico intergrupos apenas incluir os grupos fentanil e controlos,¹³⁴ pode traduzir lesão do hipocampo. De facto, sabe-se que o fentanil pode originar diminuição da ansiedade por lesão citotóxica/bloqueio do hipocampo ventral, por interferência no recetor N-metil-D-aspartato (NMDA).²¹⁰

É possível que os resultados do presente estudo sejam pelo menos parcialmente explicados por um impacto do fentanil sobre o desenvolvimento de circuitos neuronais centrais, dada a grande plasticidade do SNC característica do cérebro imaturo de mamíferos.²¹²

Quanto ao midazolam, o impacto neurológico prejudicial já discutido, evidenciado pelo presente estudo na memória de reconhecimento de um novo objeto,

associado a alterações histopatológicas em diferentes áreas do SNC, designadamente de células do córtex peri-rinal e das células de Purkinje do cerebelo alerta para a possibilidade de toxicidade neurológica deste fármaco em contexto de stresse cirúrgico e imaturidade cerebral. Em consonância com os resultados referidos, outros autores reportaram neurodegenerescência das células de Purkinje após administração do midazolam em período neonatal.¹⁸⁶ Neste estudo, o midazolam, administrado por 3 semanas a murganho em período de imaturidade do SNC, induziu alterações histopatológicas do cerebelo, tendo originado, entre outras, redução do número de células de Purkinje e sua degenerescência, alteração da migração de células granulares e redução do número destas células na camada granular interna.¹⁸⁶ Embora no nosso estudo não se tenha encontrada correlação entre o resultado histopatológico de um número significativamente alto de células de Purkinje em neurodegenerescência e o comportamento do rato na roda do rotarod em aceleração, que foi normal, sabe-se que a depleção de células de Purkinje pode conduzir a perturbação seletiva da coordenação motora²¹³ ou a perturbação cognitiva noutros domínios. O cerebelo, além de um importante papel na coordenação motora, contribui igualmente para o processamento cognitivo e emoção,¹⁹⁸ pelo que lesões menores podem conduzir a deficiências cognitivas e perturbações subtis da aprendizagem e do humor sem evidência de compromisso da coordenação motora.

À semelhança do fentanil, o midazolam pode atuar através de múltiplos mecanismos, tornando difícil atribuir os efeitos no comportamento a uma única função neuronal. Tokuda e colaboradores²¹⁴ observaram, por exemplo, que o midazolam inibe a aprendizagem dependente do hipocampo através da ativação dos recetores benzodiazepínicos e da neuroesteroidogénese. Além do mais, a utilização do midazolam em ser imaturo levanta outro tipo de preocupações relacionados com a sua farmacocinética. Um estudo clínico realizado por de Wildt e colaboradores²¹⁵ demonstrou que a administração do fármaco a neonatos humanos prematuros criticamente doentes foi ineficaz. Sabe-se que a farmacocinética e metabolismo do midazolam na criança dependem da maturidade dos órgãos responsáveis pela sua metabolização e eliminação e que a *clearance* do fármaco pode estar muito diminuída em contexto de doença grave e de inflamação, nomeadamente por diminuição da atividade do citocromo P450 3A4/5.²¹⁵⁻²¹⁷ Por outro lado, Frölich e colaboradores²¹⁸ verificaram aumento significativo da perceção da dor desencadeada por diversos estímulos dolorosos em adultos humanos saudáveis moderadamente sedados por

administração intravenosa de midazolam. Também Koch e colaboradores⁶² verificaram que o midazolam potencia os reflexos nociceptivos, sensibiliza os recetores cutâneos e não tem efeito sedativo em ratos neonatos, dada a imaturidade do sistema inibidor GABAérgico nesta idade. Além disso, este estudo verificou que a administração isolada do midazolam em contexto de stresse de dor operatória no período neonatal pode ser insuficiente para evitar efeitos nefastos relacionados com a ansiedade em idade mais tardia, mostrado pela ansiedade tendencialmente maior evidenciada pelos ratos do grupo Mdz em comparação com os controlos, especialmente o grupo NãoOp. Todos estes resultados indicam a necessidade de melhor compreensão da farmacologia dos fármacos usados por rotina nas unidades de cuidados intensivos neonatais.

A.6 CONCLUSÕES

Os resultados desta investigação permitem algumas conclusões gerais:

1. A administração repetida de fentanil em fase precoce do período neonatal em contexto de stresse cirúrgico na avaliação dos efeitos agudos (P9):
 - 1.1. Não prejudicou o crescimento do neonato;
 - 1.2. Não prejudicou o desenvolvimento físico do neonato;
 - 1.3. Não prejudicou o comportamento reflexo do neonato;
 - 1.4. Não diminuiu significativamente a atividade locomotora do neonato.

2. A administração repetida de fentanil em fase precoce do período neonatal em contexto de stresse cirúrgico na avaliação de resultados em idade infantil pré-desmame:
 - 2.1. Promoveu o ganho significativo de peso corporal;
 - 2.2. Não alterou significativamente o desenvolvimento físico normal;
 - 2.3. Não alterou significativamente o comportamento motor e exploratório;
 - 2.4. Acelerou o sucesso de tarefas comportamentais na manobra de suspensão em arame;
 - 2.5. Diminuiu a ansiedade;
 - 2.6. Não prejudicou a memória de reconhecimento de um novo objeto;

- 2.7. Não alterou significativamente o desenvolvimento de competências relacionadas com coordenação motora e equilíbrio testado em rotarod de aceleração.
3. A administração repetida de fentanil em fase precoce do período neonatal em contexto de stresse cirúrgico na avaliação dos efeitos histopatológicos do SNC em P21:
 - 3.1. Não provocou alterações significativas na densidade neuronal no córtex peririnal.
 - 3.2. Não provocou alterações significativas na densidade neuronal do giro dentado do hipocampo.
 - 3.3. Não provocou alterações significativas no córtex do cerebelo:
 - 3.3.1. Não atrasou o desaparecimento da camada granular externa;
 - 3.3.2. Não alterou significativamente a densidade neuronal da camada granular interna;
 - 3.3.3. Não alterou significativamente o número total de células de Purkinje nem o número de células de Purkinje em neurodegenerescência.
4. A administração repetida de midazolam em fase precoce do período neonatal em contexto de stresse cirúrgico na avaliação dos efeitos agudos:
 - 4.1. Não prejudicou o crescimento do neonato;
 - 4.2. Não prejudicou o desenvolvimento físico do neonato;
 - 4.3. Não prejudicou o comportamento reflexo do neonato;
 - 4.4. Diminuiu significativamente a atividade locomotora do neonato.
5. A administração repetida de midazolam em fase precoce do período neonatal em contexto de stresse cirúrgico na avaliação de resultados em idade infantil pré-desmame:
 - 5.1. Promoveu o ganho significativo de peso corporal;
 - 5.2. Não alterou o desenvolvimento físico normal;
 - 5.3. Não alterou significativamente o comportamento motor e exploratório;
 - 5.4. Acelerou o sucesso de tarefas comportamentais na manobra de suspensão em arame;
 - 5.5. Não alterou significativamente o comportamento ansioso;

- 5.6. Prejudicou a memória de reconhecimento de um novo objeto;
 - 5.7. Não alterou significativamente o desenvolvimento de competências relacionadas com coordenação motora e equilíbrio testado em rotarod de aceleração.
6. A administração repetida de midazolam em fase precoce do período neonatal em contexto de stresse cirúrgico na avaliação dos efeitos histopatológicos cerebrais em P21:
- 6.1. Diminuiu a densidade neuronal de camada celular V do córtex peri-rinal.
 - 6.2. Não alterou significativamente a densidade neuronal do giro dentado do hipocampo.
 - 6.3. Não provocou alterações significativas no córtex do cerebelo:
 - 6.3.1. Não atrasou o desaparecimento da camada granular externa;
 - 6.3.2. Não alterou significativamente a densidade neuronal da camada granular interna;
 - 6.3.3. Não diminuiu significativamente o número de células de Purkinje mas aumentou o número de células de Purkinje em neurodegenerescência.

Em síntese, os nossos resultados sugerem que a administração repetida de fentanil ou de midazolam a ratos submetidos a stresse cirúrgico em fase de imaturidade cerebral altera o crescimento e o desenvolvimento normais de ratos infantis. Estes fármacos tiveram impacto variável, positivo ou negativo, nos diferentes parâmetros estudados, sendo de destacar aspetos globalmente positivos para o fentanil, com aparente melhoria de aquisição de competências cognitivas (memória), de equilíbrio e motoras e aspetos cognitivos desfavoráveis para o midazolam que afetou negativamente a memória.

Os nossos resultados podem contribuir para apoiar o uso neonatal de fentanil, quando indicado, ou seja, em ambientes pós-cirúrgicos, incluindo em recém-nascidos prematuros. No que se refere ao midazolam a sua utilização deverá ser restringida à menor exposição possível, até esclarecimento dos seus efeitos no neurodesenvolvimento humano. No entanto, a extrapolação dos nossos dados para o contexto clínico deve ser feita com cautela, como em qualquer estudo com animais.

ESTUDO B

ANESTESIA PEDIÁTRICA EM PERÍODO DE IMATURIDADE CEREBRAL E PERTURBAÇÕES DO NEURODESENVOLVIMENTO - REVISÃO SISTEMÁTICA

Estudo publicado na Acta Médica Portuguesa.²¹⁹

B.1 JUSTIFICAÇÃO DO ESTUDO

Alertas têm surgido na literatura médica sobre a associação entre resultados desfavoráveis no neurodesenvolvimento a longo prazo e exposição a cirurgia sob anestesia geral de crianças gravemente doentes em fase precoce da vida pós-natal, especialmente naquelas com patologia da prematuridade ou malformações congénitas.^{137,138,220–223} Além de estudos em animais sugerindo neurotoxicidade por A/A/S, diversas observações epidemiológicas sugerem que fármacos usados em contexto de anestesia clínica pediátrica podem exercer efeitos indesejáveis sobre o sistema nervoso central (SNC) imaturo, isto é, abrangendo crianças nos primeiros anos de vida pós-natal.^{224,225} No entanto, falta a síntese e análise crítica desses estudos.

B.2 OBJETIVOS

Determinar, através de uma revisão sistemática, se há evidência de que a exposição a anestésicos de crianças em fase de imaturidade cerebral produz perturbações persistentes do neurodesenvolvimento.

B.3 MÉTODOS

Pesquisámos a MEDLINE/PubMed, SciELO e Cochrane Library, desde 30 de abril de 1990 até 30 de abril de 2013. Utilizámos as palavras-chave e os operadores booleanos (*Pediatric anesthesia* OR *Pediatric anesthetic* OR *Developing brain*

anesthetic OR Developing brain anesthesia) AND Behavior disorders, com os filtros *species: Humans e Abstract available*.

Como critérios de inclusão considerámos as publicações de estudos referentes a efeitos persistentes no neurodesenvolvimento após exposição a anestésicos de crianças com imaturidade cerebral, isto é, publicações contendo informação sobre subgrupos de exposição nos primeiros 4 anos de idade. Foram excluídas as publicações de estudos de exposição pré-natal e específicos para cirurgias ou patologias particulares.

A partir dos artigos encontrados através destes critérios usámos ainda a função “related articles” da PubMed. Incluímos referências adicionais, elegíveis pelos nossos critérios de inclusão e exclusão, provenientes desta pesquisa e de estudos relevantes citados.

A análise crítica das publicações foi efetuada independentemente por dois investigadores. Nos casos em que estes não estavam de acordo, a decisão de inclusão ou não foi tomada através de consenso entre ambos.

De cada artigo selecionado colhemos dados referentes ao tipo de estudo, área geográfica, número de casos, idade e número de exposições anestésicas, contextos cirúrgicos, pontos fortes e limitações do estudo.

B.4 RESULTADOS

A pesquisa inicial, limitada a humanos e no período referido, originou 502 publicações para as palavras-chave escolhidas. Após a leitura do título e resumo dos artigos encontrados, a seleção incluiu numa primeira fase 13 publicações cujo objetivo primário visara identificar perturbações de neurodesenvolvimento a longo prazo em crianças expostas a anestésicos em período de imaturidade do SNC.^{137,220,224–234} Destas, excluímos 3 estudos: um, por se referir a intervenções cirúrgicas em crianças grandes prematuras ou com muito baixo peso ao nascer,¹³⁷ o outro por se limitar a crianças com intervenção cirúrgica por malformação congénita cardíaca grave²²⁰ e o terceiro por se tratar de uma meta-análise bayesiana.²³⁴ A seleção final incluiu 10 publicações de estudos retrospectivos de coorte.^{224–233}

Dos 10 estudos retrospectivos (Tabela II.B.1), três provieram da Europa (Holanda e Dinamarca), três da Universidade de Colúmbia (Nova Iorque, Estados Unidos da América) e quatro da Clínica Mayo (Rochester, Estados Unidos da América).

Tabela II.B.1 - Resultados de estudos epidemiológicos de coorte avaliando perturbações do neurodesenvolvimento após exposição a anestésicos em fase de imaturidade cerebral

Estudo	Nº total/ Idade Exposição/ Idade Avaliação	Grupos de estudo	Resultados
Bartels, ²³³ 2009, Holanda	2286/ <3 anos e <12 anos/ 12 anos de idade	Qualquer tipo de cirurgia; 1143 pares de gêmeos monozigóticos	Ausência de causalidade entre exposição anestesiológica antes dos 3 anos de idade e deficiência da aprendizagem.
Kalkman ²²⁶ 2009, Holanda	243/ <6 anos/ 11 a 14 anos após anestesia	Patologia urológica simples; 178 anestesiados < 2 anos vs. 65 anestesiados > 2 anos	Sem diferença estatisticamente significativa de distúrbio do neurocomportamento entre o grupo operado antes ou após os 2 anos de idade.
Hansen ²²⁷ 2011, Dinamarca	17264/ <1 ano/ 15 a 16 anos de idade	Reparação de HI; 2689 expostos a anestesia <1 ano vs. 14575 não expostos a anestesia <1 ano	Desempenho acadêmico sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos, após correção para variáveis de confusão.
DiMaggio ²²⁴ 2009, EUA (Universidade de Columbia)	5433/ <3anos/ até 3 anos após anestesia	Reparação de HI; 383 expostos a anestesia <3 anos vs. 5050 não expostos a anestesia <3 anos	Aumento para o dobro de diagnóstico de distúrbios do comportamento e do desenvolvimento em crianças operadas.
DiMaggio ²²⁸ 2011, EUA (Universidade de Columbia)	10450/ <3 anos/ até 6 anos após anestesia	Diversos tipos de cirurgia; 304 expostos a anestesia <3 anos vs. 10146 irmãos não expostos a anestesia <3 anos	Aumento de 60% no diagnóstico de distúrbios do desenvolvimento ou comportamento em crianças expostas a cirurgia comparadas com os irmãos não expostos. Risco 1,6 vezes maior para qualquer número de exposições, aumentando desde 1,1 a 4 vezes com o número de exposições.
Ing ²²⁹ 2012 EUA (Universidade de Columbia) e Austrália	2608/ <3 anos/ 10 anos de idade	Qualquer tipo de cirurgia; 321 expostos a anestesia <3 anos vs. 2287 não expostos a anestesia <3 anos	Aumento de risco de distúrbio da linguagem (1,9 vezes) e cognitivo (1,7 vezes) incluindo para uma única exposição.
Wilder ²²⁵ 2009, EUA (Clínica Mayo)	5357/ <4 anos/ até 19 anos de idade	Qualquer tipo de cirurgia; 593 expostos a anestesia <4 anos vs. 4764 não expostos a anestesia <4 anos	Exposição repetida à anestesia/cirurgia duplica o risco subsequente de distúrbios de aprendizagem. Exposição a uma única anestesia não foi associada a risco aumentado.

Sprung ²³⁰ 2009, EUA (Clínica Mayo)	5320/ Parto/ até 19 anos de idade	497 nascidos por cesariana vs. 4823 nascidos por parto vaginal	Risco idêntico de distúrbio subsequente de aprendizagem após parto vaginal ou exposição a anestesia geral ou loco-regional durante a cesariana. O risco de distúrbio de aprendizagem pode ser menor em crianças expostas à anestesia regional em cesariana comparação com as nascidas por parto vaginal.
Flick ²³¹ 2011, EUA (Clínica Mayo)	1050/ <2 anos/ até 19 anos de idade	Qualquer tipo de cirurgia; 350 expostos a anestesia <2 anos vs. 700 controles emparelhados (de uma população de n=8548) não expostos a anestesia <2 anos	Exposição repetida à anestesia antes dos 2 anos, mesmo após correção para o estado de saúde, é fator de risco independente para diagnóstico subsequente de distúrbio de aprendizagem, para pior resultado em testes de grupo de desempenho cognitivo e para a necessidade de programas escolares de educação individual dirigidos a alterações de linguagem mas não para aqueles dirigidos a distúrbios comportamentais/emocionais.
Sprung ²³² 2012, EUA (Clínica Mayo)	5357/ <2 anos/ até 19 anos de idade	Qualquer tipo de cirurgia; 350 expostos a anestesia <2 anos vs. 5007 não expostos a expostos a anestesia <2 anos	Exposição repetida à anestesia/cirurgia aumenta risco subsequente de transtorno de déficit de atenção e hiperatividade, mesmo após correção para confundidores.

HI= hérnia inguinal; EUA= Estados Unidos da América

O primeiro estudo apresentado na Tabela 1, da autoria de investigadores da Universidade Vrije de Amesterdão,²³³ usando coorte de gémeos monozigóticos identificados pelo registo “Young-Netherlands Twin Register”, tem os grupos de estudo descritos de forma incompleta por impossibilidade de inferir dados da sua apresentação. De facto, a conclusão deste estudo, negando a causalidade entre exposição anestésica e deficiência da aprendizagem, foi contestada sobretudo pelo grupo de investigadores da Clínica Mayo que lhe apontaram diversos problemas de desenho, interpretação e apresentação.²³⁵ Este estudo visou explorar a causalidade entre exposição anestésica em idade de imaturidade cerebral e o nível de aprendizagem subsequente, tendo sido identificados em questionário enviado aos pais os seguintes grupos: gémeos discordantes para anestesia (1 exposto e outro não), gémeos concordantes para anestesia (ambos expostos) e gémeos concordantes para não exposição anestésica (ambos não expostos) antes dos 3 anos de idade. A graduação dos níveis de aprendizagem foi

efetuada com base em informação dos educadores e aplicando testes de neurodesenvolvimento estandardizados. Este estudo mostrou que o nível de aprendizagem foi significativamente menor nos gémeos concordantes para intervenção cirúrgica antes dos 3 anos de idade em comparação com concordantes para não exposição a anestesia. Contudo, a análise mostrou que esse nível de aprendizagem não alcançou diferença estatisticamente significativa nos gémeos discordantes para intervenção cirúrgica. Como fatores de robustez do estudo foram apontados designadamente a inclusão de gémeos monozigóticos e a amplitude nacional da base de dados. Como principais limitações são apontadas, além das já mencionadas anteriormente, o desenho retrospectivo, o potencial de não reconhecimento de variáveis de confusão e a homogeneidade étnica.

Dos restantes dois estudos europeus apresentados na Tabela II.B.1, um, da autoria de investigadores do Centro Médico Universitário de Utrecht na Holanda,²²⁶ visou explorar a causalidade entre exposição anestésica em idade de imaturidade do sistema nervoso central e distúrbio subsequente do comportamento. Usando uma base de dados deste Hospital foi selecionada uma coorte de crianças saudáveis operadas por patologia urológica não *major* antes dos 6 anos de idade, tendo sido comparado o comportamento e neurodesenvolvimento com base em questionário validado enviado aos pais de crianças operadas, pelo menos 11 anos após a cirurgia. O estudo comparou um grupo de crianças expostas à anestesia antes dos 2 anos de idade com um grupo com intervenção cirúrgica após os 2 anos, tendo mostrado aumento não significativo de distúrbios de comportamento nas crianças operadas antes dos 2 anos de idade. Como principais limitações são apontadas o desenho retrospectivo, o potencial de não reconhecimento de variáveis de confusão, a avaliação realizada pelos pais e não por clínicos, a homogeneidade étnica, a apresentação de resultados referentes a anestésias realizadas na década de 90 com anestésicos entretanto largamente substituídos e a pequena amostra com falta de poder estatístico (considerado pelos autores um estudo preliminar).

O outro estudo europeu, da autoria de investigadores da Universidade Odense da Dinamarca,²²⁷ usando uma base de registo nacional identificou uma coorte de crianças expostas a anestesia para cirurgia a hérnia inguinal nos primeiros doze meses de vida, num período de cinco anos, a qual foi comparada com 5% da amostra populacional incluindo controlos randomizados para a idade. A avaliação e quantificação dos níveis de aprendizagem foi efetuada em testes estandardizados para o país de origem, tendo

sido determinada a percentagem de crianças que não atingiram os valores normais. O estudo mostrou que a percentagem de crianças expostas à anestesia geral para realização de cirurgia no primeiro ano de vida e que não atingiu um nível normal de aprendizagem, embora menor, não alcançou diferença estatisticamente significativa em comparação com o grupo de controlo, após correção para múltiplas variáveis de confusão, incluindo a associação com outras anomalias congénitas. Como fator de robustez do estudo foi realçada a amplitude nacional da base de dados e do grupo de controlo. Como principais limitações são apontadas o desenho retrospectivo, o potencial de não reconhecimento de variáveis de confusão, a homogeneidade étnica, utilização de um único teste de avaliação do nível de aprendizagem e o facto de não terem sido excluídas quer do grupo teste quer do grupo controlo crianças expostas a anestesia no primeiro ano de vida para outro tipo de cirurgia que não reparação de hérnia inguinal (como perceptível na resposta dos autores a críticas efetuadas pelo grupo da Clínica Mayo).²³⁶

Do grupo da Universidade de Colúmbia, DiMaggio e colaboradores,²²⁴ usando uma base de registos da “New York State Medicaid” publicaram um estudo retrospectivo de coorte de crianças operadas a hérnia inguinal antes dos 3 anos de idade, com avaliação posterior do neurodesenvolvimento. Esse estudo mostrou que, após o ajuste para as variáveis de confusão, as crianças expostas à anestesia/cirurgia antes dos 3 anos de idade tinham o dobro de probabilidade de virem a ter um diagnóstico de distúrbio de desenvolvimento ou de comportamento em comparação com as crianças não operadas. Usando a mesma base de registos, o grupo da Universidade de Colúmbia,²²⁸ em outro estudo epidemiológico retrospectivo de coorte de irmãos expostos ou não a anestesia para cirurgia antes dos 3 anos de idade, após o ajuste para variáveis de confusão, mostrou que a associação da exposição a anestesia com distúrbio subsequente do neurodesenvolvimento era 60% maior no grupo dos operados em comparação com os irmãos não operados e que o risco aumentava com o número de exposições. Este estudo excluiu anestésias para neurocirurgia, cirurgia cardíaca, cirurgia do palato ou cirurgia diafragmática por serem consideradas de risco para desenvolvimento dos *outcomes* avaliados. Ainda o mesmo grupo, em associação com investigadores australianos,²²⁹ usando a “Western Australian Pregnancy Cohort”, num estudo retrospectivo de coorte de crianças expostas a anestesia para cirurgia de qualquer tipo antes dos 3 anos de idade em comparação com as não expostas mostrou, após o ajuste para as características demográficas, que a exposição à anestesia foi associada a um maior risco de deficiência na linguagem e cognição, mesmo com uma única exposição. Como fatores de robustez

são apontados a amplitude das bases de dados e dos grupos de controlo e, no estudo de Ing e colaboradores,²²⁹ o diagnóstico de perturbação do neurodesenvolvimento baseado num extenso conjunto de testes neurocognitivos realizados prospetivamente e ainda, nos estudos de DiMaggio e colaboradores,^{224,228} os dados referentes a anestésias realizadas no século XXI. As principais limitações deste conjunto de publicações são o desenho retrospectivo e o potencial de não reconhecimento de variáveis de confusão em todos, e ainda, nos estudos de DiMaggio e colaboradores,^{224,228} o uso de códigos de companhias de seguros para identificar as perturbações de neurodesenvolvimento e, no estudo de DiMaggio e colaboradores de 2009,²²⁴ o facto de não terem sido excluídas do grupo controlo as crianças expostas a anestesia nos primeiros 3 anos de vida para outro tipo de cirurgia que não reparação de hérnia inguinal e de os resultados serem limitados a, no máximo, 3 anos após a cirurgia.

Quatro dos 10 estudos retrospectivos identificados nesta revisão provieram da Clínica Mayo em Rochester,^{225,230-232} tendo como base registos da população residente de Olmsted County, Minnesota. No estudo de Wilder e colaboradores,²²⁵ os autores utilizaram informação de avaliação realizada em crianças com dificuldade de aprendizagem incluída naquele registo populacional. Neste estudo foi investigada a associação entre a exposição à anestesia para qualquer tipo de cirurgia antes dos 4 anos de idade e dificuldades de aprendizagem subsequentes, tendo-se verificado que a exposição à anestesia/cirurgia foi um fator de risco significativo para o desenvolvimento posterior de distúrbios de aprendizagem em crianças com múltiplas exposições a anestésicos, mas não para uma única exposição. Sprung e colaboradores²³⁰ obtiveram, do mesmo registo populacional, dados para comparar crianças nascidas por cesariana sob anestesia geral ou loco-regional ou nascidas por parto vaginal. O estudo mostrou que o risco de desenvolvimento de dificuldades de aprendizagem não aumentou em crianças nascidas por cesariana sob qualquer dos tipos de anestesia, o que sugere que uma breve exposição perinatal a fármacos anestésicos não afeta negativamente os resultados do neurodesenvolvimento a longo prazo. No entanto, os autores observaram um menor risco potencial de distúrbio de aprendizagem em crianças nascidas por cesariana cujas mães foram submetidas a anestesia regional em comparação com as nascidas por parto vaginal, tendo sido tal resultado atribuído a possível enviesamento de seleção. Numa tentativa de esclarecer este último resultado, Flick e colaboradores,²³⁷ avaliaram retrospectivamente a coorte desta base de dados de adolescentes nascidos por via vaginal de mães submetidas a analgesia de trabalho de parto por técnicas de

abordagem do neuroeixo, tendo concluído que a exposição a este tipo de analgesia materna não alterou o risco de desenvolver distúrbio de aprendizagem em comparação com os controlos não expostos. Noutro estudo, Flick e colaboradores²³¹ procuraram determinar se os efeitos de múltiplas exposições a anestesia demonstrados anteriormente nesta população persistiam quando se tinham em conta diferenças no estado de saúde e se também se verificavam em testes de desempenho cognitivo em grupo e na necessidade de um programa escolar de educação individual dirigido a distúrbios de comportamento/emocionais ou dirigido a alterações de linguagem. Este estudo mostrou, pela avaliação retrospectiva de coorte da base populacional já mencionada com controlos emparelhados, que a exposição repetida à anestesia/cirurgia antes dos 2 anos de idade, mas não a exposição única, foi um fator de risco independente para diagnóstico subsequente de distúrbio de aprendizagem, para pior resultado em testes de desempenho cognitivo em grupo e para a necessidade de um programa escolar de educação individual dirigido a alterações de linguagem, mesmo após a correção para o estado de saúde, mas que estas crianças não tiveram maior necessidade de programas escolares de educação individual dirigidos a distúrbios de comportamento/emocionais. Finalmente, outro estudo de Sprung e colaboradores,²³² retrospectivo de coorte da mesma base populacional, mostrou que a exposição repetida à anestesia/cirurgia antes dos 2 anos de idade aumentou o risco subsequente de transtorno de déficite de atenção e hiperatividade mesmo após correção para variáveis de confusão. Na discussão correlacionam estes resultados com os de Flick e colaboradores²³¹ referindo que os distúrbios encontrados não eram, em geral, suficientemente graves para indicarem a necessidade de programas escolares de educação individual dirigidos a distúrbios de comportamento/emocionais. A robustez deste conjunto de estudos assentou especialmente no facto de incluírem registos médicos e educacionais interligados. As principais limitações apontadas são o desenho retrospectivo, o potencial de não reconhecimento de variáveis de confusão, a homogeneidade étnica e a apresentação de resultados referentes a técnicas realizadas na década de 80 com fármacos entretanto largamente substituídos.

B.5 DISCUSSÃO

Em contraste com os estudos provenientes da Universidade de Colúmbia e da Clínica Mayo, todos sugerindo alteração do neurodesenvolvimento por exposição de

criança pequena à anestesia, os estudos publicados por investigadores europeus, designadamente de Kalkman,²²⁶ Bartels²³³ e Hansen,²²⁷ não são concordantes. A acrescentar a esta informação, um dos estudos por nós excluído desta análise também não mostrou associação entre sedação/analgesia e perturbação do neurodesenvolvimento em contexto de cirurgia por malformação congénita cardíaca severa.²²⁰ Neste estudo, a análise de regressão logística não mostrou associação significativa entre exposição antes das primeiras 6 semanas de vida a sedação/analgesia, em contexto de cirurgia por malformações congénitas cardíacas severas, e atraso mental, motor ou de linguagem em avaliação do neurocomportamento efetuado 18 meses a 24 meses após essa exposição.²²⁰

Outro estudo excluído desta revisão sistemática, uma meta-análise do grupo da Universidade de Colúmbia de 6 coortes retrospectivas com mais de 20000 doentes operados até aos 5 anos, concluiu que a evidência epidemiológica sugere um risco moderadamente elevado de resultados adversos de comportamento ou de desenvolvimento em crianças que foram expostas à anestesia/cirurgia durante a primeira infância, mas com evidência incerta.²³⁴

Todas as publicações encontradas reportam estudos retrospectivos por motivos éticos e sacrificam ou os prazos de avaliação do neurodesenvolvimento (num caso apenas 3 anos após a exposição a anestesia) ou a atualidade das anestésias em estudo (em alguns casos realizadas há 30 anos), e portanto com fármacos já em desuso e em condições diversas das usadas hoje em dia.

A existência de variáveis de confusão, incluindo os efeitos combinados de anestesia e cirurgia, comorbilidades, homogeneidade étnica e diferenças históricas em fármacos usados e no tipo de monitorização anestésica,²³⁸ apesar de quase incontornável, compromete ainda mais a validade dos estudos publicados. De realçar o esforço realizado por grupos de investigadores que procuraram diminuir o enviesamento, como se verificou no estudo de Flick²³¹ que reinterpretou dados anteriores incluindo controlos emparelhados e aferindo os resultados para o estado de saúde.

Por outro lado, existem incongruências no desenho dos estudos, nomeadamente, em alguns, a possibilidade de as crianças dos grupos de controlo terem sido anestesiadas para outras cirurgias que não a visada até à idade em estudo por insuficiência de critérios de exclusão, e, em todos, de poderem ter sido expostas a anestesia/cirurgia logo após o fim da idade em estudo quando ainda é possível a imaturidade cerebral. Por

exemplo, ao se estudar as crianças expostas a anestesia até aos 2 anos de idade existe a maior garantia de que estes cérebros são realmente imaturos, no entanto o grupo de controlo pode incluir crianças expostas aos 3 anos que noutros estudos são consideradas no grupo de teste. Urge assim definir o conceito de idade de imaturidade cerebral humana, nomeadamente para permitir maior uniformidade dos estudos nesta área.

Outra limitação da revisão da literatura nesta área é o facto de os vários estudos incidirem sobre distúrbios diferentes e utilizarem métodos diversos para avaliar alterações cognitivas e de comportamento nas crianças incluídas (CITO-elementary test,²³³ Child Behavior Checklist,²²⁶ exames nacionais do nono ano e classificação de professores,²²⁷ codificação CID-9 para problemas de desenvolvimento,^{224,228} registos populacionais^{225,230-232}), o que dificulta a comparação.

As numerosas limitações dos poucos estudos clínicos disponíveis fazem com que a informação reportada ainda se considere insuficiente para mudar a prática clínica atual, sendo necessários mais contributos.²³⁹

B.6 CONCLUSÕES

A nossa revisão sistemática não permitiu provar ou negar a existência de neurotoxicidade na anestesia pediátrica de grupos vulneráveis. Associada à dificuldade em estabelecer nexo de causalidade entre as perturbações de aprendizagem ou outras do foro neurocognitivo e anestesia em criança com cérebro imaturo nos estudos retrospectivos entretanto realizados, e porque o diagnóstico destas perturbações é relativamente raro no universo global da anestesia pediátrica, e ainda porque atualmente se reconhece o efeito neurotóxico de dor não tratada neste grupo pediátrico, mantêm-se as recomendações para providenciar analgesia ou anestesia geral quando necessária, à criança, independentemente da idade. Nas crianças em fase de imaturidade cerebral recomenda-se no entanto que, se exequível, sejam diferidos os procedimentos, sejam ponderadas alternativas à anestesia geral e seja minimizada a duração da anestesia tanto quanto possível.^{104,238}

ESTUDO C

MORBIMORTALIDADE PERIOPERATÓRIA NO PRIMEIRO ANO DE IDADE - REVISÃO SISTEMÁTICA (1997-2012)

Estudo aceite para publicação na Revista Brasileira de Anestesiologia.¹³²

C.1 JUSTIFICAÇÃO DO ESTUDO

A melhoria da sobrevivência a patologias congênitas bem como o desenvolvimento de novas técnicas cirúrgicas em pediatria levaram a um aumento do número de cirurgias realizadas em crianças com idade inferior a um ano, muitas das quais em neonatos extremamente vulneráveis.¹⁴¹ A anestesia de doentes pediátricos com menos de um ano de idade tem particularidades muito próprias e os resultados de estudos pediátricos em crianças mais velhas não lhes são necessariamente aplicáveis.

Apesar de o risco de complicações anestésicas estar presumivelmente associado às características da população, o estudo da morbimortalidade relacionada com os cuidados anestésicos/cirúrgicos à população pediátrica com menos de um ano de idade tem especial relevância pela sua frequência e pelo impacto considerável sobre a saúde dos doentes. A caracterização do perfil epidemiológico da morbimortalidade nesta faixa etária, por constituir um instrumento de avaliação da qualidade da assistência em saúde, pode melhorar a prática anestésica neste grupo de características muito particulares, constituindo mais um contributo para a redução da morbimortalidade.¹⁴²⁻¹⁴⁵

C.2 OBJETIVOS

Analisar, através de uma revisão sistemática, o perfil epidemiológico da morbimortalidade relacionada com a anestesia geral no primeiro ano de vida, com diferenciação por subgrupos etários de vulnerabilidade (primeiro mês de idade e 1 a 12 meses de idade).

C.3 MÉTODOS

Pesquisámos a MEDLINE/PubMed desde 1 de janeiro de 1997 a 31 de outubro de 2012 para encontrar artigos originais sobre mortalidade ou morbidade *major* associadas ao período perioperatório de crianças com menos de um ano de idade. Utilizámos as palavras-chave e os operadores booleanos “*Anesthesia-related*” AND “*Mortality*” e “*Anesthesia-related*” AND “*Morbidity*”, com os filtros *species: Humans e Abstract available*.

Como critérios de inclusão considerámos os estudos de incidência de mortalidade precoce ou de paragem cardíaca perioperatória ou de eventos críticos/adversos de diversos tipos, conforme definidos pelos diferentes autores, com informação relativa ao subgrupo específico com idade inferior a um ano (grupo < 1 A). Foram excluídos os estudos limitados a uma técnica loco-regional, procedimento cirúrgico ou patologia particular.

A partir dos artigos encontrados através destes critérios usámos ainda a função “related articles” da PubMed. Incluímos referências adicionais, elegíveis pelos nossos critérios de inclusão e exclusão, provenientes desta pesquisa e de estudos relevantes citados.

A análise crítica das publicações foi efetuada independentemente por dois investigadores. Nos casos em que estes não estavam de acordo, a decisão de inclusão ou não foi tomada através de consenso entre ambos.

De cada artigo selecionado foram colhidos dados referentes ao tipo de estudo, área geográfica, número de casos, número de anestésias, tipos de cirurgias incluídos, mortalidade e morbidade *major* perioperatórias. Quando especificada a idade 0 a 30 dias e a idade 1 a 12 meses estes dados também foram colhidos. Em relação à mortalidade foram colhidos dados sobre taxa de mortalidade por 10 mil anestésias e períodos de ocorrência da morte: no bloco operatório/unidade de cuidados pós-anestésicos ou no pós-operatório em qualquer período nos primeiros 30 dias. A partir dos dados disponíveis dos estudos elegíveis foi determinada a mortalidade total para cada um dos períodos de ocorrência considerados. Em relação à morbidade *major* foram colhidos dados sobre taxa de paragem cardíaca perioperatória. Além deste evento crítico foi colhida informação relativa a eventos críticos/adversos de diversos tipos (definidos pelos respetivos autores) sempre que referidos na publicação analisada.

C.4 RESULTADOS

A pesquisa inicial de publicações, limitada a humanos e no período referido, originou para as combinações “*Anesthesia-related*” AND “*Mortality*” e “*Anesthesia-related*” AND “*Morbidity*” respectivamente 104 e 144 artigos. Após a leitura do título ou do resumo destes artigos e de outros relevantes pesquisados através da função “related articles” e de referências citadas, a seleção incluiu 20 artigos reportando mortalidade ou morbidade perioperatórias relacionadas com a anestesia de crianças com menos de um ano de idade. A análise completa destes artigos originou a exclusão de uma revisão sistemática.¹⁴² Assim, os dados do nosso estudo representam a compilação de informação proveniente de 19 artigos.^{146,240–257} Em 16 estudos de incidência,^{146,240–254} dois reportavam séries onde se encontravam doentes também incluídos em publicações anteriores: o estudo de Braz 2006²⁵⁰ continha dados de Braz 2004²⁵¹ e o de Kawashima 2002²⁴⁸ continha dados de Morita 2001.²⁴⁰ A análise desses dados foi feita de forma a complementar a informação mas não a duplicar. As restantes 3 publicações^{255–257} referem-se a bases de dados multicêntricas de casos reportados. Todos os estudos são grau de recomendação de evidência científica B de acordo com a classificação de Oxford.²⁵⁸

A Tabela II.C.1 compila os perfis de mortalidade e paragens cardíacas nos diferentes subgrupos etários dentro do primeiro ano de idade. Os dados referentes aos estudos de mortalidade são apresentados nas Tabelas II.C.2 e II.C.3 e os dados referentes aos estudos de morbidade nas Tabelas II.C.4 e II.C.5.

Tabela II.C.1 - Perfis epidemiológicos de paragem cardíaca e mortalidade nos subgrupos com menos de um ano de idade

Idade	Período de ocorrência	Taxa por 10 mil anestésias	Nº de estudos para o cálculo (nº total de anestésias)	Varição por 10 mil anestésias
Mortalidade				
<1A	BO/UCPA	30	2 (13634)	11,4 a 38,9
	Primeiras 24h	53	2 (20661)	35,1 a 59,7
	Primeiros 2 dias	18,5	1 (4863)	18,5
	Primeiros 30 dias	135	1 (15255)	135
0-30d	BO/UCPA	144,7	1 (1451)	144,7
	Primeiros 7 dias	ND	2 (ND)	26,94 a 74,10
	Primeiros 30 dias	367,4	1 (2831)	367,4
1-12M	BO/UCPA	19,2	1 (7807)	19,2
	Primeiros 7 dias	ND	2 (ND)	5,91 a 6,63
	Primeiros 30 dias	82,1	1 (12424)	82,1
Paragem cardíaca				
<1A	BO/UCPA	38,6	5 (25392)	8,9 a 87,1
	Primeiras 24h	48,1	1 (5406)	48,1
0-30d	BO/UCPA	165,4	2 (2297)	158,5-177,3
1-12M	BO/UCPA	30,5	2 (10175)	23,1-55,1

Nº= número; BO= Bloco Operatório; UCPA= Unidade de Cuidados Pós-Anestésicos; d= dias; M=meses; ND= informação não disponível.

Mortalidade

As taxas de mortalidade relatadas na literatura incluída no estudo são apresentadas nas Tabelas II.C.1 e II.C.2. Na Tabela II.C.3 estão selecionados os estudos que indicam causas de morte.

Tabela II.C.2 - Incidência de mortalidade intra e pós-operatória precoce em crianças com idade inferior a um ano

Autor/s (ano); tipo de publicação; período de investigação e local	Mortes incluídas na colheita de dados	Número de procedimentos e idade máxima	Mortalidade geral no estudo/ 10000 anestésias	Subgrupos de idade inferior a 1A		
				Idade	Número de anestésias	Incidência /10000 anestésias
Morita <i>et al.</i> (2001); ²⁴⁰ R-M; 1999; Japão	Primeiros 7 dias	732788 anestésias em todas as idades	ND	0-30d 1-12M	3509 13580	74,10 6,63
Morita <i>et al.</i> (2002); ²⁴¹ R-M; 2000; Japão	Primeiros 7 dias	910757 anestésias em todas as idades	ND	0-30d 1-12M	ND ND	26,94 5,91
Chan e Auler (2002); ²⁴² R-1C; 1998-1999; Brasil	Primeiras 24h	82641 anestésias em todas as idades	51	0-30d 1-12M	ND ND	288 129
Flick <i>et al.</i> (2007); ²⁴³ R-1C; 1988-2005; EUA	BO e UCPA	92881 anestésias em crianças até 18 anos	6,8	0-30d 1-12M Geral <1A	1451 7807 9258	144,7 19,2 38,9
Bunchungmongkol <i>et al.</i> (2007); ²⁴⁴ P-M; 2003- 2004; Tailândia	Primeiras 24h	25098 anestésias em crianças até 15 anos	15,9	0-12M	5406	35,1
Ahmed <i>et al.</i> (2009); ²⁴⁵ R-1C; 1992-2006; Paquistão	BO e UCPA	20216 anestésias em crianças até 18 anos	3,46	0-12M	4376	11,4
Bharti <i>et al.</i> (2009); ²⁴⁶ R-1C; 2003- 2008; Índia	Primeiros 2 dias	12158 anestésias em crianças até 18 anos	10,7	0-12M	4863	18,5
Van der Griend <i>et al.</i> (2011); ²⁴⁷ R-1C; 2003-2008; Austrália	24h e em 30 dias	101855 anestésias em crianças até 18 anos	24h:13,4 30d:34,5	24h: 0-30d 1-12M Geral <1A 30d: 0-30d 1-12M Geral <1A	2831 12424 15255 2831 12424 15255	180,1 32,2 59,7 367,4 82,1 135,0

R-M= retrospectivo multi-institucional; R-1C= retrospectivo 1 centro; ND= informação não disponível; M= meses; d= dias; h=horas; BO= Bloco Operatório; UCPA= Unidade de Cuidados Pós-Anestésicos; EUA= Estados Unidos da América.

Tabela II.C.3 - Contexto da mortalidade em crianças com idade inferior a um ano relatada na literatura nos últimos 15 anos

Autor/s (ano); tipo de publicação	Grupo etário	Nº de mortes	Idade / contexto relatado
Relatos referentes a mortes relacionadas com anestesia			
Kawashima <i>et al.</i> (2002); ²⁴⁸ R-M	0-12M	0	Nenhuma morte relacionada com anestesia
Bunchungmonkol <i>et al.</i> (2009); ¹⁴⁶ P-M	0-30d	1	1 d / bradicardia após oxigenação inadequada por pneumotórax em pós-operatório de toracotomia por fístula traqueoesofágica
	1-12M	1	6 M / bradicardia em contexto de aparente hipovolemia em craniotomia emergente
Ahmed <i>et al.</i> (2009); ²⁴⁵ R-1C	0-30d	0	Nenhuma morte relacionada com anestesia
	1-12M	1	8 M / ventilação inadequada após extubação
Van der Griend <i>et al.</i> (2011); ²⁴⁷ R-1C	0-30d	1	13 d / doença cardíaca congénita
	1-12M	2	4 M / ex-prematuro com trissomia 21 e cardiopatia congénita 4 M / patologia neurológica degenerativa
Relatos referentes a mortes no intra e pós-operatório precoce no geral			
Kawashima <i>et al.</i> (2002); ²⁴⁸ R-M	0-12M	26	ND / 21 mortes relacionadas com complicações pré-operatórias (17 por eventos cardiovasculares, incluindo 11 de doença cardíaca congénita) ND / 5 mortes relacionadas com a cirurgia
Flick <i>et al.</i> (2007); ²⁴³ * R-1C	0-30d	4 (em 17 anos)	2,11 e 25 d / hemorragia maciça 1 d / por tamponamento pericárdico durante cateterização central
	1-12M	0	Nenhuma morte em cirurgia não cardíaca

R-M= retrospectivo multi-institucional; P-M= prospetivo multi-institucional; R-1C= retrospectivo 1 centro; M= meses; d= dias; ND= informação não disponível; *=informação referente à cirurgia não cardíaca.

Mortalidade em Crianças no Primeiro Ano de Idade

Cinco²⁴³⁻²⁴⁷ dos 8 estudos da Tabela II.C.2 disponibilizam informação sobre mortalidade global por 10 mil anestésias no primeiro ano de idade (<1A ou 0-12M). Verifica-se uma grande variabilidade, desde 11,4 a 38,9 por 10 mil anestésias no intraoperatório e pós-operatório imediato (em média 30 mortes por 10 mil anestésias, calculada com base em duas grandes séries^{243,245} que perfizeram 13634 anestésias) e de 35,1 a 59,7 por 10 mil anestésias até às primeiras 24 horas após a anestesia (em média 53 mortes por 10 mil anestésias, calculada com base em duas grandes séries^{244,247} que

perfizaram 20661 anestésias). A taxa de mortalidade nos primeiros 2 dias após a anestésia, analisada num estudo²⁴⁶ abrangendo a faixa pediátrica até aos 18 anos e com 4863 anestésias no primeiro ano de idade, foi 18,5 por 10 mil anestésias. Num outro estudo²⁴⁷ abrangendo a faixa pediátrica até aos 18 anos e com 15255 anestésias no primeiro ano de idade, a taxa de mortalidade aos 30 dias após a anestésia foi 135 por 10 mil anestésias.

A análise dos resultados dos estudos encontrados permite realçar os seguintes aspetos:

(1) A definição de morte intra e pós-operatória precoce ou relacionada com anestésia não é consensual na literatura, mas, independentemente do critério usado, os estudos com abrangência de múltiplos grupos etários encontraram maior taxa de mortalidade em crianças com menos de um ano de idade, quando comparada com crianças mais velhas.

(2) Os dados apresentados na Tabela II.C.2 que apontam taxas de mortalidade bastante mais altas nos estudos de Chan *et al.*,²⁴² Van der Griend *et al.*²⁴⁷ e Flick *et al.*²⁴³ devem ser lidos neste contexto de variabilidade de critérios, uma vez que se referem ao total dos casos anestésados, incluindo cirurgia cardíaca e, no caso de Chan *et al.*,²⁴² transplantes. Van der Griend *et al.*²⁴⁷ e Flick *et al.*²⁴³ apresentam também nas suas publicações a taxa de mortalidade em cirurgia não cardíaca, que desce de 59,7 para 39,7/10 mil anestésias nas primeiras 24 horas no caso do estudo de Van der Griend *et al.*²⁴⁷ e de 38,9 para 5/10 mil anestésias no estudo de Flick *et al.*²⁴³

Mortalidade em Subgrupos de Crianças com Idade Inferior a Um Ano de Idade (0-30 dias e 1-12 meses)

As Tabelas II.C.1 e II.C.2 disponibilizam dados relevantes sobre taxas de mortalidade no primeiro mês de idade e entre 1 e 12 meses de idade e na Tabela II.C.3 estão seleccionados os estudos que indicam causas de morte.

Cinco^{240-243,247} dos 8 estudos seleccionados para a avaliação da taxa de mortalidade disponibilizam dados para análise deste desfecho nos subgrupos primeiro mês de idade (0-30 dias) e 1 a 12 meses de idade (1-12M).

As taxas de mortalidade no intraoperatório e pós-operatório imediato de anestésias de neonatos e de crianças com 1 a 12 meses de idade, analisadas num estudo²⁴³ abrangendo crianças da faixa etária pediátrica até aos 18 anos de idade, com 1451 anestésias em neonatos e 7807 anestésias em crianças com idades desde 1 a 12

meses, foram respetivamente 144,7 e 19,2 por 10 mil anestésias. Nas primeiras 24 horas, as taxas de mortalidade apresentadas em dois dos estudos^{242,247} variaram desde 180,1 a 288 por 10 mil anestésias nos neonatos e desde 32,2 a 129 por 10 mil anestésias em crianças com idades de 1 a 12 meses. As taxas de mortalidade nos primeiros 7 dias, analisadas em 2 estudos,^{240,241} variaram desde 26,94 a 74,10 e desde 5,91 a 6,63 por 10 mil anestésias, respetivamente em neonatos e em crianças com idades de 1 a 12 meses. Num outro estudo,²⁴⁷ abrangendo a faixa pediátrica até aos 18 anos e com 2831 anestésias em neonatos e 12424 anestésias na criança de 1 a 12 meses, as taxas de mortalidade aos 30 dias foram, respetivamente, 367,4 e 82,1 por 10 mil anestésias.

Realçam-se os seguintes aspetos:

(1) Tal como na análise da taxa de mortalidade no primeiro ano de idade, a análise das taxas de mortalidade nos 2 subgrupos desta faixa etária revela as mesmas diferenças metodológicas e a necessidade de avaliação crítica à luz desta variabilidade. A análise destes perfis mostra que o pico de risco de mortalidade se situou consistentemente no grupo de anestesia em neonatos, quando comparado com o grupo de pequenos lactentes mais velhos.

(2) Da análise dos dados de Kawashima *et al.*²⁴⁸ que se referem à compilação e análise dos dados apresentados por Morita *et al.*²⁴⁰ relativos ao estudo anual de mortalidade e morbidade no Japão em 1999, a mortalidade foi mais alta em crianças com idade inferior a um mês, no entanto a mortalidade em crianças com idade entre 1 e 12 meses, ainda que mais alta que a de crianças mais velhas, foi ultrapassada pela encontrada em indivíduos com idade entre 66 e 85 anos e superior a 85 anos.

(3) Embora vários estudos se refiram às causas mais frequentes de morte e aos fatores de risco, a maioria não disponibiliza ou analisa estes dados nas diversas faixas etárias, pelo que são raros os dados específicos para as crianças com menos de um ano de idade e, os que existem, em geral referem-se apenas às mortes consideradas relacionadas com anestesia. Esta informação foi compilada na Tabela II.C.3.

Morbilidade Perioperatória

Relativamente à morbidade perioperatória, os estudos mostram grande disparidade entre os dados disponíveis. Alguns autores optaram por analisar as paragens cardíacas em contexto perioperatório (Tabela II.C.4), enquanto outros analisaram um conjunto mais vasto de eventos críticos/adversos (Tabela II.C.5).

Tabela II.C.4 - Incidência de paragem cardíaca perioperatória em crianças com idade inferior a um ano

Autor/s (ano); tipo de publicação; período de investigação e local	Paragens cardíacas	Número de procedimentos, idade máxima	Incidência geral no estudo/ 10000 anestésias	Subgrupos de idade inferior a 1A		
				Idade	Número de anestésias	Incidência /10000 anestésias
Morita <i>et al.</i> (2001); ²⁴⁰ R-M; 1999; Japão	ND	732788 anestésias em todas as idades	ND	0-30d 1-12M	3509 13580	54,1 8,8
Morita <i>et al.</i> (2002); ²⁴¹ R-M; 2000; Japão	ND	910757 anestésias em todas as idades	ND	0-30d 1-12M	ND ND	28,3 8,54
Murat <i>et al.</i> (2004); ²⁴⁹ P-1C; 2000- 2002; França	BO e UCPA	24165 anestésias em crianças até 15 anos	3,3	<1A	3681	10,9
Braz <i>et al.</i> (2006); ²⁵⁰ P-1C; 1996- 2005; Brasil	BO e UCPA	53718 anestésias em todas as idades	34,6	0-30d 1-12M Geral <1A	846 2368 3214	177,3 55,1 87,1
Flick <i>et al.</i> (2007); ²⁴³ R-1C; 1988- 2005; EUA	BO e UCPA	92881 anestésias em crianças até 18 anos	8,6	0-30d 1-12M Geral <1A	1451 7807 9258	158,5 23,1 44,3
Bunchungmongkol <i>et al.</i> (2007); ²⁴⁴ P-M; 2003-2004; Tailândia	Primeiras 24 horas	25098 anestésias em crianças até 15 anos	19,9	<1A	5406	48,1
Ahmed <i>et al.</i> (2009); ²⁴⁵ R-1C; 1992-2006; Paquistão	BO e UCPA	20216 anestésias em crianças até 18 anos ^{a)}	4,95	<1A	4376	18,3
Bharti <i>et al.</i> (2009); ²⁴⁶ R-1C; 2003-2008; Índia	BO e UCPA	12158 anestésias em crianças até 18 anos	22,2	<1A	4863	35

R-M= retrospectivo multi-institucional; P-1C=prospetivo 1 centro; R-1C= retrospectivo 1 centro; P-M= prospetivo multi-institucional; ND= informação não disponível; BO=Bloco Operatório; UCPA=Unidade de Cuidados Pós-Anestésicos; EUA= Estados Unidos da América; =:dias; M:meses; ^{a)} =casos de cirurgia cardíaca excluídos.

Tabela II.C.5 - Incidência de eventos críticos/adversos perioperatórios em crianças com idade inferior a um ano

Autor/s (ano); tipo de publicação; período de investigação e local	Período de ocorrência	Número de procedimentos, idade máxima	Incidência geral no estudo	Subgrupos de idade inferior a 1 ano		
				Idade	Número de anestésias	Incidência
Tay <i>et al.</i> (2001); ²⁵² P-1C; 1997- 1999; Singapura	ND	10000 anestésias pediátricas	2,78%	<1A	1022	8,6%
Morita <i>et al.</i> (2001); ²⁴⁰ R-M; 1999; Japão	ND	732788 anestésias em todas as idades	ND	0-30d 1-12m	ND ND	1,68% 0,48%
Morita <i>et al.</i> (2002); ²⁴¹ R-M; 2000; Japão	ND	910757 anestésias em todas as idades	ND	0-30d 1-12m	ND ND	0,7% 0,42%
Murat <i>et al.</i> (2004); ²⁴⁹ P-1C; 2000- 2002; França	BO e UCPA	24165 anestésias em crianças até 15 anos	3,1% no BO 4,8% na UCPA	<1A	3681	3,6% no BO 1,47% na UCPA
Edomwonyi <i>et al.</i> (2006); ²⁵³ P-1C; 12 meses, ano não especificado; Nigéria	BO e UCPA	270 anestésias em crianças até 16 anos	24%	0-30d 1-12m	15 69	26,7% 6-8,7%
Bunchungmongkol <i>et al.</i> (2007); ²⁴⁴ P-M; 2003-2004; Tailândia	Primeiras 24 horas	25098 anestésias em crianças até 15 anos	1,9%	<1A	5406	4,6%
Samaké <i>et al.</i> (2010); ²⁵⁴ P-1C; Março-Setembro 2004; Mali	ND	107 anestésias em crianças até 12 anos	39%	<1A	107	30,8%

P-1C= prospectivo 1 centro; R-M= retrospectivo multi-institucional; P-M= prospectivo multi-institucional; ND= informação não disponível; BO= Bloco Operatório; UCPA= Unidade de Cuidados Pós-Anestésicos.

Definição de evento crítico ou evento adverso: Ref.²⁵² - respiratórios, cardiovasculares, relacionados com equipamento, relacionados com fármacos, relacionados com anestesia regional e outros incluindo convulsões, morte e lesões dentárias; Ref.^{240,241} - paragem cardíaca, hipotensão severa, hipoxemia severa; Ref.²⁴⁹ - respiratórios, cardiovasculares, neurológicos, relacionados com anestesia regional e outros incluindo anafilaxia, hipertermia maligna, erro de dose, bloqueio neuromuscular prolongado, hipo ou hipertermia, vômitos, hemorragia pós-operatória e falha de equipamento; Ref.²⁵³ - cardiovasculares, respiratórios, neurológicos e gastrointestinais (náuseas e vômitos pós-operatórios); Ref.²⁴⁴ - aspiração pulmonar, intubação esofágica sintomática, dessaturação superior a 3 minutos, reintubação, intubação difícil (mais de 3 tentativas ou mais de 10 minutos), intubação falhada, coma/convulsão, lesões nervosas, paragem cardíaca, morte, anafilaxia, erro de medicação, falha de equipamento; Ref.²⁵⁴ - respiratórios, cardiovasculares, neurológicos (atraso no acordar) e gastrointestinais (vômitos pós-operatórios).

Morbilidade Perioperatória no Primeiro Ano de Idade

Na Tabela II.C.4, seis^{243-246,249,250} dos 8 artigos referenciados disponibilizam informação relativa à taxa de paragem cardíaca por 10 mil anestésias no primeiro ano de idade. Destes seis, 5 referem-se ao bloco operatório e unidade de cuidados pós-anestésicos e 1 às primeiras 24 horas. A Tabela II.C.1 apresenta o perfil de paragens cardíacas nos diferentes subgrupos do primeiro ano de idade.

Verifica-se que a taxa de paragem cardíaca por 10 mil anestésias no bloco operatório e unidade de cuidados pós-anestésicos variou desde 8,9²⁴⁹ a 87,1,²⁵⁰ (em média 38,6 paragens cardíacas por 10 mil anestésias, calculada com base em cinco grandes séries^{243,245,246,249,250} que perfizeram 25392 anestésias), e num estudo²⁴⁴ referente às primeiras 24 horas foi de 48,1 por 10 mil anestésias num universo de 5406 anestésias.

Quanto à taxa de eventos críticos/adversos perioperatórios de diversos tipos, relacionados com os procedimentos anestésicos (Tabela II.C.5), esta variou desde 4,6% e 30,8%.

Da análise crítica referente aos dados das Tabelas II.C.4 e II.C.5 e literatura relacionada destacam-se os seguintes aspetos:

(1) Tal como em relação à mortalidade, os critérios usados para o cálculo da incidência de paragem cardíaca ou de eventos críticos/adversos variaram, existindo assim discrepância nos valores apresentados, os quais devem ser interpretados no seu contexto. Por exemplo, a incidência de paragem cardíaca apresentada por Flick *et al.*²⁴³ é a total, incluindo cirurgia cardíaca. Neste estudo, em crianças com menos de um ano de idade, a incidência de paragem cardíaca considerando apenas cirurgia não cardíaca foi de 8,7 por 10 mil anestésias, 5 vezes menor do que a incidência total.

(2) Em todos os estudos encontrados, a incidência de paragem cardíaca e de eventos críticos/adversos de diversos tipos foi mais alta em crianças com idade inferior a um ano do que em crianças mais velhas.^{146,240,241,243-246,248-254}

(3) A frequência de paragens cardíacas na faixa etária a que se refere o nosso estudo em relação à frequência em crianças mais velhas também é relevante, sendo que, nos estudos disponíveis, 50 a 80% do total de paragens cardíacas em idade pediátrica ocorreu em doentes com menos de um ano de idade.^{243-246,249-251} Da mesma forma, Morray *et al.*²⁵⁵ no seu estudo baseado no registo de dados POCA (*Pediatric Perioperative Cardiac Arrest Registry*), referem que mais de metade das paragens cardíacas reportadas entre 1994 e 1997, de hospitais dos Estados Unidos da América e

Canadá, ocorreu em crianças com menos de um ano (169 em 289 crianças). Neste estudo, a idade como fator independente de patologia associada não foi preditiva de mortalidade após paragem cardíaca.

(4) Bhananker *et al.*²⁵⁶ apresentaram em 2007 uma atualização do registo de dados POCA, onde é perceptível a diminuição da percentagem relativa de paragens cardíacas reportadas em crianças com idade inferior a um ano em relação aos dados de anos anteriores apresentados por Morray *et al.*,²⁵⁵ no entanto sem a informação do número de anestésias realizadas nos hospitais em questão não é possível calcular e comparar incidências.

(5) MacLennan *et al.*²⁵⁷ identificaram 606 eventos críticos reportados em pediatria entre 2006 e 2008 no Reino Unido, dos quais 102 (16,8%) em crianças com idade inferior a um ano. Como se trata de uma compilação de casos reportados de vários hospitais, também não é possível calcular a incidência nesta população.

Morbilidade Perioperatória em Subgrupos de Crianças com Idade Inferior a Um Ano (0-30 dias e 1-12 meses)

Na Tabela II.C.4, quatro^{240,241,243,250} de 8 artigos disponibilizam informação relativa à taxa de paragens cardíacas por 10 mil anestésias no primeiro mês de idade (0-30 dias) e entre 1 e 12 meses de idade. A Tabela II.C.1 apresenta os perfis epidemiológicos de paragem cardíaca nos subgrupos 0-30 dias e 1-12 meses de idade.

No primeiro mês de idade a taxa de paragem cardíaca variou entre 28,3 e 177,3 por 10 mil anestésias e de 1 a 12 meses de idade variou entre 8,54 e 55,1 por 10 mil anestésias. Dos 2 estudos^{243,250} que disponibilizaram dados completos para o cálculo de número de casos de paragem cardíaca perioperatória, ocorreram em média 165,4 casos de paragem cardíaca no bloco operatório e unidade de cuidados pós-anestésicos por 10 mil anestésias no primeiro mês de idade, para um universo global de 2297 anestésias, e em média 30,5 casos por 10 mil anestésias entre 1 e 12 meses de idade, para um universo global de 10175 anestésias.

No primeiro mês de idade a taxa de eventos críticos/adversos de diversos tipos (Tabela II.C.5) variou entre 0,7 e 26,7% das anestésias, e entre 1 e 12 meses de idade variou entre 0,42 e 8,7% das anestésias.

Da análise crítica referente aos dados das Tabelas II.C.4 e II.C.5 e da literatura relacionada destacam-se os seguintes aspetos:

(1) Tal como para o grupo de crianças no primeiro ano de idade, os critérios usados para o cálculo da incidência de paragem cardíaca ou de eventos críticos/adversos nos subgrupos 0-30 dias e 1 a 12 meses variaram, registando-se assim discrepância nos valores apresentados, os quais devem ser interpretados no seu contexto. Por exemplo, mais uma vez, a incidência de paragem cardíaca apresentada por Flick *et al.*²⁴³ é a total, incluindo cirurgia cardíaca. Neste estudo, em crianças com menos de um mês de idade a sua incidência foi muito mais alta em cirurgia cardíaca (434,8/10 mil anestésias) do que em cirurgia não cardíaca (39,4/10 mil anestésias).

(2) Bhananker *et al.*²⁵⁶ referem que foram reportadas 93 paragens cardíacas durante anestesia ou no recobro imediato em crianças até 18 anos, das quais 21 em neonatos e 53 em doentes com idades entre 1-12 meses, ao registo de dados POCA entre 1998 e 2004.

Etiologia e Contexto da Morbilidade Perioperatória em Crianças com Idade Inferior a Um Ano

Relativamente à etiologia e contexto das paragens cardíacas nas crianças com menos de um ano, estes maioritariamente são apenas especificados nos casos considerados pelos respetivos autores como relacionados com anestesia.

Assim, no estudo de Ahmed *et al.*,²⁴⁵ das 8 paragens cardíacas ocorridas abaixo de um ano de idade, 3 foram atribuídas a causas anestésicas, nomeadamente por hipovolemia, ventilação inadequada (já referida na análise da mortalidade) e bradicardia após administração de succinilcolina, tendo todas sido consideradas evitáveis.

No seu estudo de 9 anos, Braz *et al.*²⁵⁰ reportaram que todas as paragens cardíacas relacionadas com anestesia em crianças com idade inferior a um ano foram devidas a ventilação ineficaz e ocorreram em doentes com patologia relevante associada, com classificação de estado físico ASA 3 ou 4. Nenhuma morte no estudo foi relacionada com a anestesia.

As 7 paragens cardíacas identificadas por Flick *et al.*²⁴³ foram devidas a hipoxemia (n=1), hemorragia maciça (n=3), possível embolia gasosa (n=1), complicações relacionadas com cateterização central (n=2), muitas vezes em contextos graves como ilustrado pela classificação do estado físico ASA 4 ou 5 em 5 casos.

No estudo de Bunchungmongkol *et al.*,¹⁴⁶ além dos dois casos resultantes em morte já descritos anteriormente, provocados por oxigenação insuficiente e hipovolemia, as restantes 5 paragens cardíacas relacionadas com anestesia em crianças

com menos de um ano foram motivadas por erros de medicação (n=3) e oxigenação inadequada (n=2).

Nos estudos anuais japoneses^{240,241,248} a incidência de paragem cardíaca em crianças com menos de um ano de idade (e com mais expressão em neonatos) foi maioritariamente atribuída a patologia coexistente. Nenhuma paragem cardíaca em neonatos foi associada a anestesia. De notar que nos casos de 1999, após a ocorrência de paragem cardíaca, 80,8% dos neonatos morreram, mostrando que a ressuscitação cardiovascular neste grupo é excecionalmente difícil.²⁴⁸

Em relação aos diversos eventos críticos/adversos na população abaixo de um ano de idade, os dados na literatura são, mais uma vez, muito dispersos, fruto da grande diversidade de dados colhidos e da população nos estudos não se restringir a esta idade.

Na sua avaliação de 1000 anestésias pediátricas, Tay *et al.*²⁵² encontraram uma incidência de 2,8% de laringospasmo em crianças com menos de um ano, significativamente mais alta do que em crianças mais velhas.

Murat *et al.*²⁴⁹ e Edomwonyi *et al.*²⁵³ referem nos seus estudos uma maior frequência de eventos cardíacos e respiratórios em crianças com idade inferior a um ano, quer no bloco operatório quer na unidade de cuidados pós-anestésicos, acrescentando este último que os eventos adversos ocorreram com mais frequência na indução anestésica.

Por outro lado, Bunchungmongkol *et al.*²⁴⁴ relatam que nesta faixa etária os eventos críticos aconteceram mais frequentemente durante a anestesia, sendo a dessaturação o mais comum. Neste estudo, crianças com menos de um ano tiveram significativamente maior incidência de atraso na deteção de intubação esofágica (0,17%), dessaturação (2,2%), reintubação (0,42%), paragem cardíaca (0,65%), morte (0,65%) e erro de medicação (0,07%).

C.5 DISCUSSÃO

Nesta revisão sistemática, compreendendo 15 anos de estudos publicados na literatura científica indexada da especialidade, salientamos como achados principais:

(1) a mortalidade e morbilidade de crianças submetidas a anestesia geral com menos de um ano de idade são superiores às registadas nas anestésias de crianças mais velhas;

(2) a mortalidade e morbidade das crianças operadas sob anestesia geral no período neonatal são superiores às registradas nas crianças anestesiadas acima deste período;

(3) no que respeita especificamente a paragens cardíacas, a incidência abaixo de um ano de idade é superior à registrada nas anestésias de crianças mais velhas.

Verificou-se ainda a inexistência de estudos limitados ao período neonatal e ao primeiro ano de idade e a grande variabilidade de metodologias para estudo dos mesmos conceitos.

Embora haja vários estudos de morbidade e mortalidade em contexto anestésico-cirúrgico que contêm dados de incidência relativos à população de crianças com idade inferior a um ano e mesmo neonatal, esta revisão sistemática permitiu compilar as diversas informações existentes de modo a possibilitar, por um lado, a sua análise conjunta e comparação com o conhecimento empírico pré-existente e, por outro lado, a identificação das questões não respondidas. Apesar dos estudos usados serem de grau de recomendação de evidência científica B, a maioria incluiu dezenas de milhares de anestésias nas suas séries.

No que se refere à metodologia dos diversos estudos, uma diferença relevante na definição dos dados colhidos prende-se com o período de ocorrência do incidente: apenas intraoperatório, no bloco operatório e na unidade de cuidados pós-anestésicos, nas primeiras 24 horas, nos primeiros dois dias, na primeira semana ou no primeiro mês de pós-operatório. Por outro lado, não há consenso na literatura relativamente à definição de morte e morbidade em contexto anestésico/operatório. Vários autores referem-se a morte relacionada com anestesia, mas também esta é determinada de diversas formas: relacionada com o papel do anestesista ou com a técnica anestésica, com fatores sob o controlo do anestesista, com fatores tanto cirúrgicos como anestésicos, entre outros. Tendo em conta o carácter multifatorial, a análise de dados poderá ser mais informativa se todos os fatores forem considerados ao invés de tentar apenas enfatizar os potencialmente relacionados com a anestesia. Igualmente, a prevenção do risco é mais provável se maior importância for dada à ocorrência de morte e morbidade *major* durante todo o processo perioperatório e não apenas ao risco da anestesia em particular.²⁴⁷

Também a discussão das causas e fatores de risco é frequentemente limitada a um espetro maior de idades. Dos dados relatados na literatura especificamente referentes a crianças com menos de um ano de idade, a mortalidade e morbidade no

contexto anestésico parece estar mais relacionada com complicações cardiovasculares e respiratórias, o que é coerente com a fisiologia desta faixa etária. Esta tendência parece substituir as mortes de estudos mais antigos sobretudo relacionadas com a medicação anestésica, atribuídas frequentemente ao halotano, fármaco depressor miocárdico especialmente em crianças mais novas e com cardiopatia congénita, que entretanto caiu em desuso.^{255,256,259} Com a utilização de novos fármacos mais seguros passaram a evidenciar-se as mortes por hemorragia e fluidoterapia desadequada e problemas respiratórios. A perda de volume vascular é muitas vezes subestimada em crianças pequenas e, por outro lado, pelo seu menor volume circulatório, estes doentes são mais sensíveis à hidratação inadequada, tanto excessiva como insuficiente. Por outro lado, a idade é um fator de risco para complicações respiratórias por duas razões principais: aumento da tendência para colapso periférico por maior complacência da parede torácica e tónus vagal aumentado com resposta rápida de apneia e laringospasmo à irritação dos recetores presentes na via aérea por secreções, intubação traqueal e aspiração. A hipoxia resultante está, nesta idade, intimamente relacionada com paragem cardíaca.

De uma forma geral, as séries pediátricas mostram uma maior incidência de paragens cardíacas (1,4-4,6 por 10 mil anestésias) quando comparadas com 1 caso por 10 mil intervenções nas séries de adultos.²⁶⁰ Dentro do primeiro ano o nosso estudo aponta incidências muito mais altas, com peso particularmente elevado das ocorridas na idade neonatal (165,4 por 10 mil anestésias).

As complicações técnicas encontradas relacionadas com a colocação de cateteres centrais, embora de incidência desconhecida no contexto perioperatório, já são conhecidas de outros contextos, nomeadamente em estudos realizados em cuidados intensivos pediátricos, justificando-se pela anatomia do coração nos primeiros meses de vida com paredes mais finas e mais suscetíveis a trauma.²⁶¹ Alguns autores recomendam o uso de ecografia para aumentar a segurança da técnica.²⁶¹

Uma implicação clínica comum a diversos estudos encontrados na literatura, quer dirigidos a mortalidade quer a morbilidade anestésica pediátrica, é a recomendação de que a anestesia pediátrica, nomeadamente de crianças mais novas, seja realizada por anestesistas com experiência neste grupo etário.^{142-145,245,247,255,262}

A análise de dados gerais de casos pediátricos de idades mais abrangentes não é necessariamente aplicável à anestesia no período neonatal e antes do primeiro ano de idade. Assim, é necessário realizar grandes estudos randomizados multicêntricos

específicos para estas idades de modo a minimizar os fatores de confusão e vieses e, assim, mais corretamente ajustar a prática clínica de modo a aumentar a segurança.

C.6 CONCLUSÕES

A literatura corrente indica grande variabilidade nos índices de mortalidade e morbidade na faixa etária em análise bem como nos seus subgrupos. No entanto, apesar da óbvia heterogeneidade metodológica e ausência de estudos específicos, os perfis epidemiológicos de morbimortalidade relacionada com a anestesia de crianças no primeiro ano de idade mostram frequência mais alta de morbimortalidade nesta faixa etária, com os maiores picos de incidência na anestesia de neonatos.

ESTUDO D

MORBIMORTALIDADE EM ANESTESIA/CIRURGIA NEONATAL: ANÁLISE DE FATORES DE RISCO DE MORTALIDADE PRECOCE E DE COMPLICAÇÕES OPERATÓRIAS NUM SISTEMA OTIMIZADO DE PRESTAÇÃO DE CUIDADOS DE SAÚDE AO RECÉM-NASCIDO CIRÚRGICO

Este estudo contém excertos de dois artigos publicados.^{263,264}

D.1 JUSTIFICAÇÃO DO ESTUDO

Apesar da oferta de cuidados altamente diferenciados em unidades de cuidados intensivos neonatais e das melhorias nas técnicas anestésicas/cirúrgicas observadas nos últimos 50 anos, a cirurgia neonatal continua a ser uma causa importante de morbidade e mortalidade, especialmente na população com patologia crítica,²⁶⁵⁻²⁶⁷ numa era de tendência para diminuição da mortalidade materno/infantil entre os países membros das Nações Unidas,²⁶⁸⁻²⁷³ nomeadamente em Portugal.²⁶⁸⁻²⁷² Estes neonatos são muitas vezes imaturos e gravemente doentes,²⁷⁴ apresentando-se com associações de vários fatores de risco. Certas variáveis iniciais adversas - como a baixa idade gestacional, peso de nascimento reduzido e comprometimento grave do estado de saúde neonatal - foram associadas a risco crescente de agravamento de resultados de saúde de morbidade e mortalidade neonatal e infantil.^{268,275} Embora se reconheça a importância da análise da influência de tais variáveis na morbimortalidade, estes aspetos não têm sido amplamente estudados, excetuando alguns estudos limitados a uma única patologia ou cirurgia. Especificamente, não existem dados disponíveis relativos a preditores de mortalidade pós-operatória em neonatos sujeitos a anestesia geral para diversos tipos de cirurgia e, no que concerne à análise de fatores preditivos de complicações pós-operatórias em neonatos, esta é ainda incompleta. Em especial não foi realizada a categorização das complicações pós-operatórias por graus de gravidade utilizando o sistema de classificação já usado em estudos pediátricos de várias áreas cirúrgicas. Este, apresentado por Clavien,²⁷⁶ e revisto mais tarde,²⁷⁷ categoriza as complicações pós-operatórias desde o grau I a V, de acordo com a sua necessidade de tratamento.

D.2 OBJETIVOS

O objetivo principal do estudo foi quantificar a mortalidade da anestesia neonatal até ao 30º dia de pós-operatório num centro de cuidados otimizados ao recém-nascido cirúrgico e determinar os fatores de risco pré e intra-operatórios que lhe possam estar associados.

Outros objetivos foram quantificar a incidência e gravidade das complicações pós-operatórias dentro dos primeiros 30 dias após procedimentos cirúrgicos neonatais sob anestesia geral, usando o sistema de classificação de Clavien-Dindo e determinar os fatores de risco pré e intra-operatórios que lhe possam estar associados.

D.3 MÉTODOS

População de doentes e procedimentos

Realizámos um estudo retrospectivo dos recém-nascidos submetidos a anestesia geral para procedimentos cirúrgicos, internados na Unidade de Cuidados Intensivos do Hospital Pediátrico de Coimbra (UCIP) entre 01 de Janeiro de 2000 e 31 de Dezembro de 2010, após obter permissão institucional para rever a informação clínica dos doentes, obedecendo às normas de proteção individual de dados e aos requisitos éticos exigidos pelo seu Centro Hospitalar.

Foram considerados casos elegíveis os que preencheram os seguintes critérios: doentes recém-nascidos submetidos a procedimentos cirúrgicos sob anestesia geral durante o período neonatal (0-28 dias de vida), admitidos na UCIP no pré-operatório ou nas primeiras 6 horas pós-operatórias e cuja cirurgia foi concluída no Hospital Pediátrico de Coimbra (HPC). Excluíram-se os seguintes casos: 1) doentes recém-nascidos submetidos a cirurgia fora do HPC; 2) doentes recém-nascidos que foram submetidos a anestesia/sedação não associada a procedimentos cirúrgicos, 3) doentes recém-nascidos submetidos a cirurgia no HPC mas sem admissão na UCIP.

A informação para este estudo foi colhida a partir de uma base de dados mantida prospetivamente pela UCIP, incluindo dados demográficos e dados clínicos de todos os

recém-nascidos nela internados. A análise desta base de dados foi completada com a revisão dos processos clínicos individuais.

A UCIP do HPC é uma unidade regional de cuidados terciários para cerca de 100 doentes recém-nascidos por ano, incluindo todos os casos cirúrgicos. Esta UCIP médico-cirúrgica articula-se com centros de cuidados perinatais terciários e com um serviço especializado de transporte neonatal e pediátrico de emergência para transferir os recém-nascidos em risco de outras unidades de saúde dentro da sua área de referência. No HPC a equipa de prestadores de cuidados de saúde é altamente especializada no tratamento de neonatos em risco de vida, incluindo cirurgiões e anestesiólogos pediátricos. Todas as especialidades de cirurgia neonatal estão disponíveis no mesmo hospital, exceto para cirurgia cardíaca de coração aberto que é realizada fora das instalações do HPC.

Para cada doente foram colhidos dados demográficos, detalhes do pré, intra e pós-operatório e resultados de morbimortalidade.

Resultados e Variáveis de Interesse

Foram definidos os seguintes dados de interesse:

- a) Mortalidade precoce (dentro dos primeiros 30 dias de pós-operatório) e mortalidade intra-hospitalar (morte ocorrendo durante o internamento hospitalar).
- b) Identificação, quantificação e classificação de complicações pós-operatórias que ocorreram nos primeiros 30 dias após a cirurgia neonatal, utilizando a classificação de Clavien-Dindo²⁷⁷ (Tabela II.D.1) e identificação de fatores de risco pré e intra-operatórios para complicações pós-operatórias graves, definidas como complicações graus III a V.

Tabela II.D.1 - Classificação Clavien-Dindo de complicações cirúrgicas²⁷⁷

Grau	Definição
I	Qualquer desvio do curso pós-operatório normal sem necessidade de intervenção para além da administração de antieméticos, antipiréticos, analgésicos, diuréticos, eletrólitos ou fisioterapia [#]
II	Complicação requerendo tratamento farmacológico com outros medicamentos além dos que são permitidos para as complicações de grau I
III	Complicação requerendo intervenção cirúrgica, endoscópica ou radiológica
III-a	Intervenção sem necessitar de anestesia geral
III-b	Intervenção sob anestesia geral
IV	Complicação com perigo de vida requerendo admissão em unidade de cuidados intensivos
IV-a	Disfunção de órgão único (incluindo diálise)
IV-b	Disfunção multi-órgão
V	Complicação resultando em morte do doente

[#] Este grau também inclui infeções cutâneas drenadas sem anestesia geral.

Para a avaliação da morbimortalidade alguns dados (idade gestacional, peso ao nascer, índice de Apgar) foram dicotomizados em dados categóricos de acordo com limites de gravidade utilizados na literatura,^{278,279} para análise estatística. A análise do peso de nascimento foi realizada através de gráficos específicos de género e gestação descritos anteriormente.²⁸⁰ A indicação cirúrgica adquirida foi definida como condição cirúrgica que ocorreu após o nascimento. A complicação pós-operatória grau V na classificação Clavien-Dindo foi definida como resultando na morte do doente.²⁷⁷ A variável de dias na UCIP foi definida como o número de dias passados na UCIP do HPC. Complicações foram definidas como eventos adversos não considerados inerentes à condição pré-operatória cirúrgica. Cirurgia abdominal foi definida como qualquer procedimento cirúrgico realizado na cavidade abdominal.

Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software SPSS versão 19.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). As variáveis categóricas são apresentadas como valores absolutos (percentuais). As variáveis quantitativas são apresentadas como mediana e diferença interquartis (IQ).

Para a análise da mortalidade consideraram-se 2 grupos com base na sua presença vs. ausência e para a análise das complicações pós-operatórias também se consideraram 2 grupos: um grupo incluiu doentes com complicações Clavien-Dindo graus III a V (complicações graves) e o outro grupo (utilizado como grupo de controlo) incluiu os doentes que não tiveram complicações ou que tiveram complicações de grau I ou II.

Inicialmente todos os fatores potencialmente associados com mortalidade aos 30 dias de pós-operatório (listados na Tabela II.D.5 dos resultados) foram analisados (presença vs. ausência) através do teste exato de Fisher ou χ^2 , conforme indicado. O mesmo foi efetuado na análise das complicações pós-operatórias, tendo-se analisado comparativamente as variáveis relacionadas com as características demográficas ao nascer e no ato cirúrgico e relacionadas com o procedimento operatório nos grupos com e sem complicações graves (como apresentado na Tabela II.D.9). As variáveis quantitativas foram analisadas através do teste Mann-Whitney U após avaliação da normalidade da distribuição usando os testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk. Para cada análise (mortalidade e complicações pós-operatórias), os fatores que apresentaram diferença significativa, e que não apresentavam forte relação clínica com outras variáveis significativas, foram posteriormente introduzidos no modelo respetivo de regressão logística usando o método *backward stepwise (conditional)* do programa estatístico SPSS.

Para os diferentes modelos foram realizados os testes de Hosmer-Lemeshow e omnibus para determinar respetivamente a qualidade do ajuste e desempenho de cada modelo. Variáveis com *odds ratio* e intervalos de confiança de 95% [IC] diferentes de 1 foram considerados como tendo uma associação significativa e independente com a variável em análise (mortalidade ou morbidade).

Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

D.4 RESULTADOS

Doentes e características operatórias

Dos 1055 recém-nascidos internados na UCIP entre 1 de Janeiro de 2000 e 31 de Dezembro de 2010, 437 (41%) doentes preencheram os critérios de inclusão. Nestes

neonatos, 558 intervenções foram realizadas sob anestesia geral, para um total de 636 procedimentos cirúrgicos.

Os dados demográficos e características clínicas dos doentes ao nascimento são apresentados na Tabela II.D.2. Da ampla lista de procedimentos cirúrgicos realizados, destacam-se algumas intervenções pela sua prevalência e gravidade, listadas na Tabela II.D.3.

Tabela II.D.2 - Características ao nascer dos 437 neonatos

Característica	n	%
Sexo		
Masculino	244	56
Feminino	193	44
Peso de nascimento, gramas (mediana 2760, limites 440–4350):		
<1500	62	14
1500-2499	105	24
≥2500	270	62
Idade de gestação, semanas (mediana 37, limites 24-41):		
<32	66	14
32-36	112	24
≥37	259	62
Relação peso ao nascer/idade de gestação		
Percentil <10	67	14
Percentil >90	17	4
Percentis 10-90	353	82
Apgar		
7-10 aos 5 minutos	412	94
<7 aos 5 minutos	16	4
Sem registo	9	2
Malformações congénitas	356	82
Síndromes, associações ou anomalias genéticas:	49	11
Mielomeningocele e Chiari II	16	-
VATER/VACTERL	11	-
Trissomia 21	11	-
Trissomia 18	1	-
Síndrome de Charge	2	-
Síndrome de Treacher Collins	2	-
Fibrose quística	2	-
Outros [¥]	4	-

n= número de casos; ¥= síndromes de Lenz, Alagille, Beckwith Wiedemann e Goldenhar: 1 de cada.

Tabela II.D.3 – Situações cirúrgicas mais relevantes entre as 636 operações realizadas

Patologia	n
Defeitos congênitos do diafragma	52
Atresia do esôfago/fístula traqueoesofágica	48
Enterocolite necrosante/perfuração intestinal	39
Obstrução/atresia do intestino delgado	80
Malformações anorretais	31
Doença de Hirschsprung	18
Onfalocelo	26
Gastrosquise	38
Extrofia de bexiga	8
Malformação quística adenomatoide do pulmão	5
Hidrocefalia	68
Mielomeningocelo	32
Atresia das coanas	8
Tumores congênitos	8
Persistência do canal arterial	10

n= número de casos.

A maioria das intervenções (85%) foram realizadas no bloco operatório sob anestesia balanceada, anestesia intravenosa ou anestesia inalatória, no entanto, em casos selecionados, os recém-nascidos foram submetidos a procedimentos cirúrgicos na UCIP sob anestesia intravenosa. Nestes são incluídos recém-nascidos sujeitos a técnicas especiais (nomeadamente ventilação de alta frequência oscilatória no caso de algumas hérnias diafragmáticas congénitas), recém-nascidos demasiado instáveis para transportar para o bloco operatório ou aqueles sujeitos a intervenções simples, como a colocação de acesso vascular central, atresiotomia com balão para doença cardíaca congénita ou colocação de dreno torácico por derrame pleural.

A anestesia intravenosa foi mantida geralmente usando uma combinação de midazolam e fentanil e a inalatória com sevoflurano.

Durante o período de estudo, seguindo sempre o estado da arte, as técnicas de tratamento de neonatos cirúrgicos não se alteraram significativamente e a mortalidade intra-hospitalar permaneceu estável.

A mediana de internamento na UCIP foi de 7 dias (variação 1-204 dias).

Mortalidade

Vinte e oito dos 437 doentes (6,4%) morreram no hospital. Destes, 22 doentes (5% dos neonatos incluídos no estudo) morreram no primeiro mês de pós-operatório (até 30 dias), incluindo nove doentes que morreram até ao segundo dia pós-operatório. As causas de morte intra-hospitalar são apresentadas na Tabela II.D.4. Quase dois terços (61%) de todos os óbitos hospitalares ocorreram em prematuros.

Tabela II.D.4 - Causas de morte pós-operatória intra-hospitalar

Causa de morte	Todas (n=28)	Mortalidade aos 30 dias (n=22)
Peritonite	12	10
Hemorragia de sistema nervoso central	5	4
Insuficiência respiratória	4	2
Insuficiência cardíaca	2	2
Sépsis neonatal	2	2
Hipoventilação de causa central	1	-
Insuficiência renal aguda	1	1
Síndrome do compartimento abdominal	1	1

n= número de casos.

Avaliação inicial dos Fatores Associados com Mortalidade aos 30 Dias de Pós-Operatório

Como referido, nos primeiros 30 dias após a cirurgia ocorreram 22 mortes (5%). Foram detetadas diferenças significativas entre esses doentes e os que sobreviveram (Tabela II.D.5).

Tabela II.D.5 - Características dos RN que morreram até aos 30 dias de pós-operatório e dos que não morreram e sua associação com morte na análise estatística inicial

Fatores	Mortalidade		OR (95%IC) [¥]	P [#]
	Sim, n (n=22)	Não, n (n=415)		
Características do doente ao nascer				
Sexo masculino, n= 244	15	229	1,7 (0,7-4,4)	0,231
IG <37 s, n=178	14	164	2,7 (1,1-6,5)	0,025*
PN <2500g, n=167	15	152	3,7 (1,5-9,3)	0,003*
PN <1500g e IG <32 s, n=56	9	47	5,4 (2,2-13)	<0,001*
P IG (<percentil 10), n=67	6	61	2,2 (0,8-5,8)	0,111
G IG (>percentil 90), n=17	3	14	4,5 (1,2-17)	0,048*
Mais de uma malformação congénita, n=91	3	88	0,6 (0,17-2)	0,590
Características do doente na cirurgia				
1ª operação antes 1ºs 8 dias de vida, n=309	12	297	0,48 (0,2-1)	0,087
> 1 intervenção anestésica/cirúrgica, n=95	4	91	0,8 (2,6-2,4)	0,797
Indicação cirúrgica adquirida, n=99	12	87	4,5 (1,9-11)	<0,001*
Classificação ASA 3 a 5, n=207	21	186	25,8 (3-194)	<0,001*
Anestesia [§] (cada vs. outras)				
Balanceada, n=372	15	357	0,35 (0,14-0,9)	0,022*
Intravenosa, n=75	8	57	3 (1,2-7,3)	0,014*
Inalatória, n=8	1	7	2,8 (0,3-23,6)	0,341
Cirurgia para (cada vs. outras):				
Atresia do esófago, n=42	1	41	0,4 (0,06-3)	0,710
Defeitos da parede abdominal, n=49	3	46	1,3 (0,4-4,4)	0,726
Hérnia diafragmática congénita, n=42	2	40	0,9 (0,2-4)	1,000
Enterocolite necrosante, n=31	8	23	9,7 (3,7-26)	<0,001*
Obstrução duodenal, n=25	0	25	0,94 (0,92-0,96)	0,628
Atresia do intestino delgado, n=16	0	16	0,96 (0,94-0,98)	1,000
Malformações anorretais, n=30	1	29	0,6 (0,08-5)	1,000
Doença de Hirschsprung, n=6	0	6	0,99 (0,97-1)	1,000
Hidronefrose, n=4	1	3	6,5 (0,65-66)	0,187
Malformações cardíacas, n=31	1	30	0,6 (0,08-4,7)	1,000
Hidrocefalia adquirida, n=30	1	29	0,6 (0,08-5)	1,000
Mielomeningocele, n=27	0	27	0,93 (0,91-0,96)	0,384
Cirurgia abdominal, n=225	19	206	6,4 (1,9-22)	0,001*
Cirurgia torácica, n=62	0	62	0,85 (0,82-0,9)	0,056
Duração da cirurgia >2h, n=177	7	170	0,67 (0,27-1,7)	0,394
RCR intraoperatória, n=2	2	0	1,1 (0,96-1)	0,002*

RN= recém-nascidos; n= número de casos; OR= *odds ratio*; IC= intervalo de confiança; ¥= associação da presença vs. ausência de cada fator com a mortalidade aos 30 dias; §= em pelo menos uma intervenção; IG= idade de gestação; s= semanas; P IG= pequeno para a idade de gestação; G IG= grande para a idade de gestação; classificação ASA= estado físico pelo sistema de classificação da Sociedade Americana de Anestesiologia; RCR= manobras de ressuscitação cardiorrespiratória;#= P correspondente a teste exato de Fisher (itálico) ou χ^2 ; *= estatisticamente significativo.

A análise inicial mostrou que a presença de nascimento pré-termo (menos de 37 semanas de gestação), baixo peso ao nascer (menos de 2500 gramas), associação de muito baixo peso ao nascer (menos de 1500 gramas) e de muito prematuro (menos de 32 semanas de gestação), grande para a idade gestacional, indicação cirúrgica por patologia adquirida após o nascimento, classificação do estado físico da Sociedade Americana de Anestesiologistas (classificação ASA) 3 a 5 em pelo menos um dos procedimentos, anestesia intravenosa ou balanceada, cirurgia abdominal, enterocolite necrosante/perfuração intestinal e necessidade de manobras de ressuscitação cardiopulmonar intra-operatória estavam significativamente associadas a um maior risco de mortalidade (Tabela II.D.5), quando comparados com a ausência do fator. Por outro lado, várias outras características clínicas, apresentadas na Tabela II.D.5, também estudadas na análise inicial, não foram significativamente associadas com mortalidade aos 30 dias de pós-operatório.

Análise de Regressão Logística Para Mortalidade

As características não significativamente associadas a mortalidade ou com forte relação clínica com outras variáveis significativas mais representativas foram excluídas do modelo de regressão logística para evitar a redução da relevância estatística. Especificamente, os confundidores prematuro, anestesia balanceada, cirurgia abdominal e ressuscitação cardiopulmonar não foram incluídos por terem forte relação clínica com uma ou mais das características selecionadas (respetivamente com muito prematuro, anestesia intravenosa, enterocolite necrosante/perfuração gastrointestinal e classificação ASA 3 a 5).

O nosso modelo, composto pela associação de peso de nascimento muito baixo e de muito prematuro, indicação cirúrgica adquirida, classificação ASA 3 a 5, anestesia intravenosa e enterocolite necrosante/perfuração gastrointestinal, foi finalizado em 4 passos pelo método *backward stepwise* e mostrou bom desempenho e boa adequação, respetivamente, pelos testes omnibus ($\chi^2_{(2)}=35.187; P< 0,001$) e de Hosmer-Lemeshow ($\chi^2_{(2)} = 0,096, P= 0,953$).

A Tabela II.D.6 resume os dois fatores de risco independentes (classificação ASA 3 a 5 e enterocolite necrosante/perfuração gastrointestinal em recém-nascidos operados) para mortalidade dentro de 30 dias da cirurgia. A associação de muito baixo peso e de muito prematuro, indicação cirúrgica adquirida e anestesia intravenosa perderam significado estatístico (respetivamente $P= 0,392$; $P= 0,305$; $P= 0,129$).

Tabela II.D.6 - Fatores de risco independentes para mortalidade aos 30 dias de pós-operatório entre as admissões cirúrgicas na UCIP

Fator de Risco	Mortalidade em 30 dias		P
	Odds ratio	95% IC	
Classificação ASA 3 a 5 [#]	19,268	2,523 – 147,132	0,004
NEC/Perfuração [#]	5,291	1,962 – 14,266	0,001

UCIP= unidade de cuidados intensivos pediátrica; IC= intervalo de confiança; #= a referência usada foi a ausência do fator; NEC= enterocolite necrosante.

Complicações Pós-Operatórias

Dos 437 recém-nascidos submetidos a procedimentos anestésicos/cirúrgicos, 242 (55%) não apresentaram qualquer complicação pós-operatória. Trezentas e setenta complicações foram registradas até ao 30º dia de pós-operatório num total de 195 crianças, das quais 99 (23%) apresentaram 121 complicações graves (intervalo, 1-3, mediana 1 complicação grave).

As complicações categorizadas de acordo com a classificação de Clavien-Dindo são apresentadas na Tabela II.D.7 e o tipo e tempo de ocorrência de complicações são apresentados na Tabela II.D.8.

Tabela II.D.7 – Categorização de 370 complicações baseada no sistema de classificação de Clavien-Dindo

Categorização/Grau	n (%)
Complicações menores	
Grau I	36 (9,7)
Grau II	213 (57,6)
Complicações graves	
Grau IIIa	22 (5,9)
Grau IIIb	64 (17,3)
Grau Iva	13 (3,5)
Grau Ivb	12 (3,2)
Grau V	10 (2,7)

n= número de casos

Tabela II.D.8 – Tipo e tempo de ocorrência das complicações

Tipo de complicação	Grave (CCD≥III) (n=121), %	Menor (CCD I-II) (n=249),%	Tempo dias, mediana (variação)
Cardiovascular	12,4	11,6	0 (0-17)
Respiratória	20,7	6,8	2,5 (0-25)
Gastrointestinal	22,3	1,6	6 (0-28)
Renal	1,6	3,2	1 (0-5)
Neurológica	5,8	2,8	5 (0-24)
Metabólica	0	21,7	0 (0-23)
Hematológica	0,8	29,3	0 (0-15)
Infeciosa	11,6	18,5	6 (0-25)
Técnica	24,8	4,4	6 (0-17)

n= número de casos; CCD= Classificação de Clavien-Dindo.

Dois terços de todas as complicações foram de grau I ou grau II e foram, na sua maioria, hematológicas, metabólicas e infecciosas. Das 121 complicações graves, 86 necessitaram de intervenção cirúrgica, endoscópica ou radiológica (grau III), 25 eram potencialmente fatais, com disfunção uni ou multi-órgão (grau IV) e 10 resultaram na morte do doente (grau V). As principais complicações foram predominantemente técnicas (25%), gastrointestinais (22%) e respiratórias (21%). Dentre todas as complicações pós-operatórias, cerca de metade (51%) foram identificadas nas primeiras 48 horas, 37% entre o 2º e o 9º dias e os restantes 12% entre o 10º e o 30º dias.

As complicações graves de grau V foram responsáveis por 41% (9/22) das mortes nos primeiros 30 dias de pós-operatório.

Variáveis Pré e Intra-operatórias Preditivas de Complicações Graves Precoces

O efeito das variáveis pré e intraoperatórias sobre a ocorrência e gravidade das complicações pós-operatórias é apresentado na Tabela II.D.9.

Tabela II.D.9 – Características dos neonatos que apresentaram complicações graves (graus \geq III) e dos que não tiveram complicações ou que tiveram complicações menores e sua associação com complicações graves dentro de 30 dias após a cirurgia

Fatores	Complicações de Clavien-Dindo		P [#]
	\geq III, n=99	Não ou I-II, n=338	
Características do doente ao nascer			
Sexo masculino, n= 244	56	188	0,868
Prematuro < 32 s IG, n=66	22	44	0,024*
P IG (<percentil10), n=67	18	49	0,371
G IG (>percentil 90), n=17	5	12	0,497
Apgar aos 5 minutos < 7, n=16 [¥]	5/97	11/331	0,403
>1 malformação congénita, n=91	20	71	0,862
Características do doente no ato operatório			
Idade na 1ª cirurgia, dias de vida [¥]	2 (8)	3 (8)	0,256
Peso na 1ª cirurgia, kg [¥]	2,6 (1,2)	2,8 (1,3)	0,026*
>1 intervenção anestésica/cirúrgica, n=95	56	39	<0,001*
Características operatórias (em pelo menos um procedimento por doente)			
Indicação cirúrgica adquirida, n=99	22	77	0,907
Classificação ASA 3 a 5, n=207	67	140	<0,001*
Anestesia [§] (cada vs. outras)			
Balanceada, n=372	85	287	0,816
Intravenosa, n=75	25	50	0,015*
Inalatória, n=8	1	7	0,426
Cirurgia para (cada vs. outras):			
Atresia do esófago, n=42	8	34	0,557
Defeitos de parede abdominal, n=49	17	32	0,033*
Hérnia diafragmática congénita, n=42	17	25	0,004*
Enterocolite necrosante, n=31	13	18	0,008*
Obstrução duodenal, n=25	8	17	0,250
Atresia intestino delgado, n=16	7	9	0,040*
Malformações anorretais, n=30	2	28	0,030*
Doença de Hirschsprung, n=6	3	3	0,133
Hidronefrose congénita, n=4	2	2	0,222
Malformações cardíacas, n=31	6	25	0,649
Hidrocefalia adquirida, n=30	8	22	0,586
Mielomeningocele, n=27	3	24	0,102
Cirurgia abdominal, n=225	70	155	<0,001*
Cirurgia torácica, n=62	12	50	0,503
Duração da cirurgia >2h, n=177	47	130	0,108

n= número de casos; ¥= Mediana e diferença interquartis; s IG= semanas de idade de gestação; ¥= nove casos com valores de Apgar em falta foram excluídos da análise desta variável; P IG= pequeno para a idade de gestação; G IG= grande para a idade de gestação; >1= mais do que 1; classificação ASA= estado físico estratificado pelo sistema de classificação Associação Americana de Anestesiologistas; *= estatisticamente significativo; #= P correspondente a teste Mann-Whitney U para as variáveis idade e peso na 1ª cirurgia e, para as restantes variáveis, a teste exato de Fisher (itálico) ou χ^2 .

A ocorrência de complicações graves (graus III a V) foi significativamente associada a parto prematuro com menos de 32 semanas de idade gestacional (P= 0,024) e a um peso operatório significativamente menor na primeira cirurgia (P= 0,026). Da mesma forma, crianças com mais de uma intervenção anestésica/cirúrgica (P< 0,001), classificação ASA 3 a 5 (P< 0,001), anestesia intravenosa (P= 0,015), reparação cirúrgica de hérnia diafragmática congênita (P= 0,004), defeitos congênitos da parede (P= 0,033), enterocolite necrosante (P= 0,008), atresia do intestino delgado (P= 0,040), malformação anorretal (P= 0,030) e cirurgia abdominal (P< 0,001) foram significativamente mais propensas a apresentar complicações graves. Por outro lado, as restantes variáveis da Tabela II.D.9, também testadas na análise inicial, não foram significativamente associadas a complicações graves.

Análise de Regressão Logística de Fatores de Risco para Complicações Graves

Com base na análise inicial foram incluídas as seguintes variáveis no nosso modelo de regressão logística para determinar os fatores preditivos das complicações pós-operatórias graves: nascimento prematuro com menos de 32 semanas de gestação, peso operatório na primeira cirurgia, mais do que uma intervenção anestésica/cirúrgica, classificação ASA 3 a 5, anestesia intravenosa, cirurgia abdominal e cirurgia de hérnia diafragmática congênita, enterocolite necrosante, defeitos congênitos da parede abdominal (onfalocelo/gastrosquise), atresia intestinal e malformações anorretais. O nosso modelo apresentou bom desempenho e boa adequação, respetivamente pelo teste omnibus ($\chi^2_{(2)} = 111,853$, P< 0,001) e pelo teste de Hosmer-Lemeshow ($\chi^2_{(2)} = 0,347$, P= 0,987).

Apenas quatro fatores mantiveram significado estatístico na análise de regressão logística (Tabela II.D.10): mais do que uma intervenção anestésica/cirúrgica, reparação cirúrgica de hérnia diafragmática congênita, prematuridade com menos de 32 semanas de gestação e cirurgia abdominal.

Por outro lado, peso operatório na primeira cirurgia (P= 0,995), classificação ASA 3 a 5 (P= 0,121), anestesia intravenosa (P= 0,139), enterocolite necrosante (P= 0,461), defeitos congênitos da parede abdominal (onfalocelo/gastrosquise) (P= 0,380), atresia intestinal (P= 0,280) e malformações anorretais perderam significado estatístico (P= 0,103).

Tabela II.D.10 – Fatores preditivos independentes para complicações pós-operatórias graves aos 30 dias de pós-operatório (precoce) entre os neonatos cirúrgicos admitidos na UCIP

Fator	Complicação pós-operatória grave precoce		
	<i>Odds ratio</i>	95% IC	<i>P</i>
Mais do que uma intervenção	12,008	6,795 - 21,223	<0,001
Reparação de HDC	3,843	1,732 - 8,526	0,001
Prematuro <32 s IG	2,666	1,355 - 5,245	0,005
Cirurgia abdominal	2,541	1,462 - 4,416	0,001

UCIP= unidade de cuidados intensivos do Hospital Pediátrico de Coimbra; HDC= hérnia diafragmática congénita; <32 s IG= menor que 32 semanas de idade de gestação; IC= intervalo de confiança.

D.5 DISCUSSÃO

Análise da mortalidade

Numa grande coorte de recém-nascidos criticamente doentes submetidos a anestesia/procedimentos cirúrgicos no centro em avaliação, o presente estudo foi o primeiro a demonstrar que classificação ASA 3 ou superior e enterocolite necrosante/perfuração gastrointestinal são fatores de risco independentes para mortalidade aos 30 dias de pós-operatório na população específica de neonatos cirúrgicos. Além disso, verificou-se que a mortalidade hospitalar global foi de 6,4% e que a taxa de mortalidade aos 30 dias foi de 5%. A causa mais comum de mortalidade foi disfunção de múltiplos órgãos, geralmente relacionada com prematuridade.

Comparados com os doentes que sobreviveram ao primeiro mês pós-operatório, os doentes falecidos neste período de tempo eram mais prematuros, mais leves e mais doentes (com pior estado físico) e eram mais propensos a ter cirurgia abdominal por doenças adquiridas associadas à prematuridade, como a enterocolite necrosante/perfuração intestinal. Provavelmente devido ao seu pior estado físico, manobras de ressuscitação cardiopulmonar intra-operatórias foram mais vezes necessárias durante os seus procedimentos. Mais de um terço das mortes ocorreram no primeiro mês de pós-operatório, contudo a mortalidade foi principalmente devida a complicações relacionadas com a doença prévia. Anestesia e cirurgia neonatal neste

cenário são suscetíveis de ter por si só um impacto negativo na condição pós-operatória, o que, por sua vez, pode influenciar a sobrevivência.

Na nossa série, houve uma mortalidade global intra-hospitalar de 6,4% e uma taxa de mortalidade aos 30 dias de 5%. Esta mortalidade geral, relativa a uma população cirúrgica de risco, está dentro da prevalência dos países considerados desenvolvidos, que é geralmente abaixo de 10%.²⁸¹ Colocando os resultados em contexto, hoje em dia, a mortalidade neonatal cirúrgica mundial é variável, em particular em função do nível de desenvolvimento do país. Dois grandes estudos mostraram 6,7%²⁸² e 7,5%,²⁸¹ respetivamente na Coreia do Sul e Japão, o que se compara favoravelmente com 35% e 45% em estudos da Índia²⁸³ e Nigéria.^{284,285}

Na nossa coorte, apesar do grande número de doentes com doenças críticas (45,5% classificados como ASA 3 ou superior), não houve mortes intra-operatórias. Isso provavelmente reflete a melhoria global em saúde em Portugal no período em estudo, reconhecida no relatório de 2011 da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico (OCDE),²⁶⁸ que mostrou uma redução impressionante nas taxas de mortalidade neonatal, apesar do aumento de nascimentos prematuros.^{268,270,286} Estes resultados bem sucedidos neste grupo de doentes complicados parecem estar relacionados com a disponibilidade de recursos muito especializados, nomeadamente os desempenhados por equipas médicas dedicadas, incluindo neonatologistas, cirurgiões e anestesistas pediátricos, e com instalações hospitalares bem equipadas. Assim, os procedimentos de estabilização ótimos e o acesso a cuidados especializados irão, provavelmente, melhorar os resultados em recém-nascidos submetidos à cirurgia neonatal em geral.²⁸⁷

Diversos fatores foram associados a mortalidade pós-operatória aos 30 dias na avaliação estatística inicial, mas apenas dois permaneceram significativos no nosso modelo de regressão logística: classificação ASA 3 a 5 e enterocolite necrosante/perfuração intestinal. Relativamente ao primeiro, uma classificação ASA alta foi o mais forte preditor de mortalidade, como era de esperar,²⁸⁸ confirmando a utilidade deste sistema de estratificação do estado físico. A mortalidade pós-operatória aos 30 dias foi 19 vezes maior entre as crianças com classificação ASA 3 ou superior. No que se refere à enterocolite necrosante, uma patologia fatal principalmente associada a imaturidade e baixo peso de nascimento,²⁸⁹⁻²⁹³ os nossos resultados foram bastante consistentes com outros que relatam alta morbidade e mortalidade pós-operatórias após cirurgia por esta patologia, dada a sua progressão para sépsis abdominal com

falência de múltiplos órgãos.²⁹³⁻²⁹⁵ No estudo atual, enterocolite necrosante foi a principal causa primária de mortalidade intra-hospitalar após cirurgia neonatal, respondendo por 41% de todas as causas de mortalidade aos 30 dias de pós-operatório. Adicionalmente, o risco de morte aos 30 dias de pós-operatório foi 5 vezes maior.

Estudos na literatura mostraram que outros fatores associados à mortalidade em recém-nascidos incluem baixo peso ao nascer e nascimento pré-termo.^{268,296} Estes fatores são conhecidos por atuar por si mesmos como características de risco que pioram os resultados de saúde, particularmente no extremo inferior da viabilidade da idade gestacional e do peso ao nascer.²⁹⁷ No entanto, o impacto desses dados demográficos sobre a mortalidade neonatal cirúrgica permanece subinvestigado, mesmo sendo mais comumente encontrados em doentes graves do que em outros recém-nascidos. Apesar de a avaliação estatística inicial mostrar diferença significativa na mortalidade aos 30 dias na presença de muito baixo peso de nascimento em muito prematuro quando comparada com a ausência deste fator, os nossos resultados não apoiam a hipótese de uma associação causal independente entre estas variáveis, sugerindo o envolvimento de outros fatores.²⁹⁸ Uma possível explicação para a ausência de associação causal independente entre muito baixo peso de nascimento em muito prematuro e mortalidade aos 30 dias encontrada nesta série é a já mencionada oferta otimizada de cuidados de saúde infantis verificada em Portugal no período de estudo, recentemente reportada pelos indicadores da OCDE de 2011,²⁶⁸ que pode ter diminuído a incidência de certos eventos relacionados com a experiência cirúrgica, tais como hipotermia perioperatória, desidratação, hipotensão, desequilíbrios eletrolíticos e aumento das necessidades de transfusão, para os quais este grupo é mais suscetível e que estão associados a um agravamento dos resultados.

Análise das complicações

No que concerne à análise das complicações pós-operatórias, o presente estudo tem dois achados principais. Em primeiro lugar, as crianças com procedimentos anestésicos/cirúrgicos neonatais tiveram uma incidência alta (23%) de complicações graves (complicações graus III a V da classificação de Clavien-Dindo). Em segundo lugar, foram encontrados quatro fatores de risco independentes para complicações graves em recém-nascidos operados: mais do que uma intervenção anestésica/cirúrgica,

cirurgia de hérnia diafragmática congênita, prematuridade com menos de 32 semanas de gestação e cirurgia abdominal.

Este estudo mostra que a cirurgia neonatal continua a ser um contexto importante de morbidade grave, mesmo num centro de referência para esta cirurgia. Um dos objetivos do estudo foi quantificar a incidência de várias complicações de procedimentos anestésicos/cirúrgicos neonatais, proporcionando aos médicos da unidade de cuidados intensivos, cirurgiões e anestesistas, a informação necessária sobre esta realidade para a sua prática clínica e para o devido esclarecimento dos pais sobre os riscos da cirurgia neonatal. Também se deve realçar que este estudo é o primeiro a determinar a taxa de complicações pós-operatórias graves na sequência de uma ampla variedade de procedimentos cirúrgicos neonatais. Além disso, permitiu a sistematização e categorização por graus de gravidade através do uso de um sistema de classificação cirúrgica conhecido para categorização de complicações pós-operatórias em cirurgia geral. Desde 2004 essa classificação foi usada em múltiplos estudos de adultos e em vários estudos pediátricos, confirmando ser uma ferramenta confiável para medir os resultados em saúde.^{299,300} No entanto, que seja do nosso conhecimento, embora tenham sido publicados recentemente diversos estudos utilizando esta classificação,²⁹⁹ existem poucos em cirurgia pediátrica³⁰¹⁻³⁰³ e nenhum referente ao período neonatal. Uma dimensão adicional deste estudo foi o uso sistemático deste sistema de classificação para caracterizar a gravidade das complicações numa série de neonatos operados, em que todos compartilhavam as características comuns de ter cirurgia realizada sob anestesia geral para tratamento de uma grande variedade de problemas clínicos no período neonatal e estadia pós-operatória na UCIP. No estudo atual foi fornecido detalhe suficiente pelo sistema de classificação de Clavien-Dindo, tendo-se estimado uma taxa de 23% de complicações graves, incluindo uma taxa de 2,3% de complicações de grau V. Além disso, este sistema de classificação revelou facilidade de utilização.

O progresso em cirurgia neonatal com atingimento de um elevado grau de sucesso e relatos cada vez mais baixos de resultados adversos foi negativamente influenciado por diversos fatores demográficos que se sabe estarem relacionados com maior risco de complicações pós-operatórias graves, e que são muito prevalentes nesta população. A prematuridade e baixo peso ao nascer são exemplos desses fatores.³⁰⁴⁻³⁰⁸ Além do facto de estas condições serem muitas vezes associadas a um processo stressante para os profissionais de saúde no bloco operatório, mesmo para os mais experientes, esses neonatos geralmente são criticamente doentes, criando um ambiente

hostil com maior propensão para complicações. Em concordância com outros estudos que analisaram os resultados pós-operatórios em bebés prematuros em contextos cirúrgicos específicos,^{304,307} o nascimento prematuro com menos de 32 semanas de gestação influenciou significativamente um resultado adverso no pós-operatório de cirurgia neonatal nas análises estatísticas inicial e de regressão logística. No estudo atual, esta característica aumentou em 2,6 vezes a probabilidade de ter uma complicação pós-operatória grave.

Entre os vários problemas clínicos enfrentados pela população cirúrgica neonatal, os neonatos submetidos a cirurgia abdominal para tratamento de uma grande variedade de condições foram significativamente mais propensos a apresentar importantes complicações pós-operatórias. Destes, podemos especificar cirurgia para enterocolite necrosante²⁹¹ e cirurgia para várias doenças congénitas,^{20,309-311} nomeadamente para onfalocelo/gastrosquise²⁰ e atresia intestinal.³⁰⁹ Enquanto todos estes fatores perderam significado estatístico no nosso modelo de regressão logística, a cirurgia para a correção do defeito diafragmático congénito foi um forte fator preditivo de complicações graves. No nosso estudo, as crianças que necessitaram de reparação de defeitos diafragmáticos congénitos apresentaram significativamente maior probabilidade de complicações pós-operatórias. Neste e em outros estudos,^{310,311} a reparação de defeitos diafragmáticos foi realizada ou por cirurgia abdominal ou torácica e verificou-se que a abordagem cirúrgica por via abdominal levou frequentemente a complicações gastrointestinais que necessitaram de reoperação abdominal.³¹⁰

Pontos fortes e limitações do estudo

Identificámos algumas limitações ao nosso estudo. O projeto foi retrospectivo, podendo introduzir viéses na classificação. Além disso, os dados utilizados referem-se a um único centro e a população do estudo é limitada a doentes internados na unidade de cuidados intensivos, não considerando por um lado a maior morbilidade específica das patologias operadas fora do HPC (procedimentos de coração aberto) e, por outro lado, a menor morbilidade dos recém-nascidos submetidos a procedimentos cirúrgicos menos complexos, sem doença crítica ou fatores de risco suficientemente graves para justificar a admissão em unidade de cuidados intensivos. Além disso, embora este estudo inclua um bom número de doentes, relata o registo da gravidade das complicações ocorridas no

pós-operatório em toda a cirurgia neonatal, que é muito ampla e que inclui afeções e malformações congénitas com diferentes prognósticos e complicações.

Estas limitações são superadas pelos pontos fortes do estudo. Em primeiro lugar, muito poucos estudos podem ser encontrados na literatura abordando especificamente a população cirúrgica neonatal,^{132,267,282-285} nenhum foca o impacto de fatores de risco clínicos nos resultados ou inclui um conjunto tão variado de patologias cirúrgicas e nenhum aborda especificamente, como este, as complicações da população cirúrgica neonatal, fazendo-o em termos de quantificação e sistematização em categorias e também pelo estabelecimento de associações com fatores de risco. A novidade da utilização do sistema de Clavien-Dindo à cirurgia neonatal e sua aparente utilidade na avaliação dos resultados nesta população é, no entanto, contrabalançada pela necessidade de novos estudos para avaliar essa classificação de acordo com as diferentes malformações e afeções do período neonatal. Em segundo lugar, o estudo foi baseado numa base de dados prospetiva muito completa, que incluiu detalhes demográficos e clínicos de uma grande coorte de doentes cirúrgicos neonatais de uma vasta área do nosso país colhidos por mais de uma década, tendo permitido a colheita de potenciais fatores de risco das características de nascimento e clínicas. Em terceiro lugar, o nosso trabalho é representativo da população neonatal cirúrgica portuguesa de UCIs terciárias, dada a nossa grande área de influência e a semelhança das características demográficas e clínicas apresentadas em estudos descritivos prévios de uma UCI pediátrica e neonatal terciária do sul de Portugal.^{267,270}

D.6 CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou uma incidência de mortalidade intra-hospitalar global de 6,4% em lactentes submetidos a cirurgia neonatal que, apesar de se situar dentro da prevalência dos países considerados desenvolvidos, talvez ainda permita melhorias. A mortalidade aos 30 dias de pós-operatório, quantificada em 5%, foi particularmente associada a doenças relacionadas com a prematuridade, como a enterocolite necrosante, e com classificação ASA 3 ou superior, que constituíram fatores de risco independentes. Pela primeira vez uma ampla análise sistematizada de complicações pós-operatórias numa grande variedade de procedimentos cirúrgicos neonatais mostrou que as crianças com procedimentos anestésicos/cirúrgicos neonatais

tiveram uma incidência alta (23%) de complicações pós-operatórias graves, tendo sido encontrados quatro fatores de risco independentes em recém-nascidos operados: mais do que uma intervenção anestésica/cirúrgica, cirurgia de hérnia diafragmática congênita, prematuridade com menos de 32 semanas de gestação e cirurgia abdominal.

Este é o único estudo, de que temos conhecimento, que fornece informações sobre incidência e fatores preditivos de morbidade grave e mortalidade na população neonatal cirúrgica, demonstrando que a cirurgia neonatal continua a ser um contexto importante de morbimortalidade, mesmo num centro de referência para esta cirurgia. O reconhecimento dos fatores de risco independentes de morbimortalidade em cirurgia neonatal pode ajudar os médicos a gerir mais adequadamente essa população de alto risco e diminuir a incerteza de prognóstico, permitindo uma melhor compreensão do risco, comunicação mais informada com os pais e previsão mais precisa dos eventuais resultados.

III

Considerações Finais

1 DISCUSSÃO CONJUNTA

Nesta Tese, efetuámos extensa revisão do Estado da Arte sobre os efeitos da anestesia, analgesia e sedação em ser imaturo, identificámos lacunas de conhecimento científico e selecionámos as que podiam beneficiar do nosso contributo pelo aporte de novos conhecimentos. Para cumprimento deste objetivo geral aliámos a investigação translacional à investigação clínica.

Os estudos de contributo pessoal permitiram demonstrar que:

A) A administração repetida de fentanil ou de midazolam a ratos submetidos a stresse cirúrgico em fase de imaturidade cerebral alterou o crescimento e o desenvolvimento normais de ratos infantis, bem como originou histopatologia de regiões relacionadas do SNC. Estes fármacos tiveram impacto variável, positivo ou negativo, nos diferentes parâmetros estudados, sendo de destacar aspetos globalmente positivos para o fentanil, com melhoria de aquisição de competências cognitivas (memória), e desfavoráveis para o midazolam que afetou negativamente a memória e o comportamento ansioso.

B) São poucos os estudos clínicos de associação entre alteração de neurodesenvolvimento e exposição de criança pequena a anestesia/cirurgia, todos apresentam limitações e as suas conclusões não são concordantes, mantendo-se a incerteza sobre a relevância clínica da neurotoxicidade em anestesia pediátrica de grupos vulneráveis. Associada à dificuldade em estabelecer nexos de causalidade entre as perturbações de aprendizagem ou outras do foro neurocognitivo e anestesia em criança com cérebro imaturo nos estudos retrospectivos encontrados, e porque o diagnóstico destas perturbações é relativamente raro no universo global da anestesia pediátrica, e ainda porque atualmente se reconhece o efeito neurotóxico de dor não tratada neste grupo pediátrico, mantêm-se as recomendações para providenciar analgesia ou anestesia geral quando necessária, à criança, independentemente da idade. Nas crianças em fase de imaturidade cerebral recomenda-se no entanto que, se possível, sejam diferidos os

procedimentos, sejam ponderadas alternativas à anestesia geral e seja minimizada a duração da anestesia tanto quanto possível.

C) A literatura corrente, indica grande variabilidade nos índices de mortalidade e morbidade em crianças submetidas a anestesia/cirurgia com menos de um ano de idade bem como nos seus subgrupos (0-30 dias e 1 a 12 meses). No entanto, apesar da óbvia heterogeneidade metodológica e ausência de estudos específicos para esta idade, os perfis epidemiológicos de morbimortalidade relacionada com a anestesia/cirurgia de crianças no primeiro ano de idade mostram frequência mais alta de morbimortalidade nesta faixa etária, com os maiores picos de incidência na anestesia de neonatos. São necessários estudos específicos da população cirúrgica neonatal e até ao primeiro ano de vida.

D) A incidência de mortalidade intra-hospitalar global em lactentes submetidos a cirurgia neonatal num centro regional de cuidados terciários representativo da população neonatal cirúrgica portuguesa de unidades terciárias de cuidados intensivos pediátricos foi de 6,4%, encontrando-se dentro da prevalência dos países considerados desenvolvidos, com maiores recursos económicos. A mortalidade aos 30 dias de pós-operatório foi 5% tendo-se identificado enterocolite necrosante e classificação ASA 3 a 5 como fatores de risco independentes. Pela primeira vez, uma ampla análise sistematizada de complicações pós-operatórias numa grande variedade de procedimentos cirúrgicos neonatais mostrou que as crianças com procedimentos anestésicos/cirúrgicos neonatais tiveram uma incidência alta (23%) de complicações pós-operatórias graves, tendo sido encontrados quatro fatores de risco independentes em recém-nascidos operados: mais do que uma intervenção anestésica/cirúrgica, cirurgia de hérnia diafragmática congénita, prematuridade com menos de 32 semanas de gestação e cirurgia abdominal.

O nosso contributo pessoal no âmbito pré-clínico procurou colmatar a lacuna nesta área sobre o impacto no neurodesenvolvimento da administração prolongada em contexto de stresse cirúrgico de fentanil e midazolam - dois dos fármacos mais usados em anestesia cirúrgica neonatal e na analgesia e sedação em cuidados intensivos pediátricos. Estes resultados podem contribuir para apoiar o uso neonatal de fentanil, quando indicado, incluindo em recém-nascidos prematuros. No que se refere ao midazolam a sua utilização deverá ser restringida à menor exposição possível, até esclarecimento dos seus efeitos no neurodesenvolvimento humano. No entanto, a extrapolação dos nossos dados para o contexto clínico deve ser feita com cautela, como

em qualquer estudo com animais. De forma preocupante estes resultados não espelham as autorizações das entidades competentes para o uso dos fármacos em questão em idade neonatal. De facto, o uso de fentanil só é autorizado após os 2 anos tanto pelo Infarmed como pela FDA, embora esta última reconheça o seu uso “*off-the-label*”, enquanto o midazolam está autorizado pelas duas entidades para uso para sedação com ventilação mecânica em todas as idades, ou seja, está autorizado para uso em neonatos. É, assim, urgente esclarecer os efeitos a longo prazo no desenvolvimento normal do SNC em humanos e/ou encontrar alternativas seguras ao midazolam nesta idade.

O nosso contributo pessoal de âmbito clínico centrou-se na análise epidemiológica das perturbações do neurodesenvolvimento da anestesia pediátrica em período de imaturidade cerebral e na análise epidemiológica da morbimortalidade por anestesia geral para cirurgia no primeiro ano de vida e em particular no período neonatal, através de revisões sistemáticas da literatura e ainda num estudo retrospectivo de uma coorte de recém-nascidos com doença crítica submetidos a cirurgia sob anestesia geral em idade neonatal num centro com cuidados de saúde otimizados.

No que concerne ao estudo das perturbações do neurodesenvolvimento por anestesia em período de imaturidade cerebral, evidenciada em estudos animais, incluindo o nosso estudo, a dificuldade em transpor esses resultados para a clínica aumentou a atração por estudos epidemiológicos de cariz retrospectivo, que permitem respostas mais rápidas e relativamente válidas recorrendo a séries amplas. Estes estudos emergiram nos últimos anos mas os seus resultados ainda estão dispersos e sem análise crítica contextual, tendo sido este o objetivo da nossa revisão sistemática da literatura.

Dez estudos retrospectivos cumpriram os critérios de inclusão. Destes, 7 sugerem alteração do neurodesenvolvimento por exposição de criança pequena à anestesia, por oposição aos resultados obtidos pelos restantes 3. Embora maioritariamente utilizem bases de dados amplas, os estudos encontrados são retrospectivos, variam nos grupos teste, incluem variáveis de confusão por vezes contornáveis e alguns apresentam incorreções na escolha da população teste e controlo que podem comprometer a fiabilidade dos resultados.

As numerosas limitações dos poucos estudos clínicos disponíveis fazem com que a informação reportada ainda se considere insuficiente para mudar a prática clínica atual. No entanto, sendo indiscutível que se mantêm as recomendações para providenciar anestesia quando necessária, independentemente da idade, os alertas encontrados na literatura são preocupantes, existindo indicação para que sempre que

possível sejam ponderadas alternativas que possam contribuir para diminuir os riscos da exposição anestésica.

Neste contexto, e enquanto se aguardam os resultados de novos estudos, com desenhos ambidirecionais, retrospectivos/prospetivos a serem desenvolvidos no âmbito dos projetos PANDA (*Pediatric Anesthesia NeuroDevelopment Assesment*)¹³⁹ e GAS (*General Anesthesia Spinal*),¹⁴⁰ as recomendações são providenciar cuidados cirúrgicos apropriados sob anestesia, sedação e analgesia em todas as idades pediátricas, naturalmente tendo em atenção os alertas que vêm sendo gerados.

A outra revisão sistemática da literatura que efetuámos sobre morbimortalidade perioperatória no primeiro ano de idade teve como objetivo completar a informação sobre o maior risco de morbimortalidade anestésica associada a idade inferior a um ano e especificamente o período neonatal. De facto, embora muitos reconheçam empiricamente a existência deste maior risco, não há na literatura estudos específicos para estas subpopulações pediátricas, encontrando-se a limitada informação disponível dispersa e não dirigida em estudos de idades mais abrangentes. Assim, 8 estudos cumpriram os critérios de inclusão para o estudo da mortalidade precoce, dos quais 3 foram realizados em população de todas as idades, incluindo adultos, e 5 em idade pediátrica. Relativamente à morbidade pós-operatória 8 estudos, incluindo 6 pediátricos, referiram-se a paragem cardíaca peri-operatória em crianças até aos 12 meses e 7 estudos, dos quais 5 pediátricos, referiram-se à incidência de outros eventos críticos/adversos.

Ambas as revisões sistemáticas demonstraram ainda a grande variedade de metodologias para o estudo dos mesmos *outcomes*, revelando a necessidade de definir conceitos e uniformizar definições neste contexto para que os estudos realizados possam ser comparáveis e efetivamente contribuam para o conhecimento global numa área em que a segurança é fulcral, as respostas são urgentes e a investigação é complexa por motivos éticos. De facto, pela leitura das publicações encontradas e pelas limitações identificadas verifica-se que o desenho dos estudos em anestesia neonatal deve ser cuidadosamente planeado. O desenho prospetivo, apesar de mais desejável, é muitas vezes difícil ou impossível por motivos éticos e logísticos e impõe necessidade de maior tempo para que os dados se tornem disponíveis, pelo que são mais frequentemente encontrados estudos retrospectivos nesta área, cujas desvantagens podem ser parcialmente suplantadas pelo uso de grandes bases de dados mantidas de forma prospetiva e organizada. Por outro lado, existem confundidores inevitáveis, dado que é

impossível separar anestesia de cirurgia e cirurgia de patologia e uma vez que não é ético expor neonatos a cirurgia sem anestesia, ou a anestesia sem cirurgia, ou a cirurgia sem patologia, pelo que se torna ainda mais premente procurar excluir ao máximo os fatores enviesantes que são evitáveis. Assim, é importante, quer em estudos retrospectivos quer em estudos prospetivos, escolher criteriosamente o grupo de estudo, garantir a inexistência de casos no grupo controlo com exposições iguais ou semelhantes à estudada ainda que sem critérios para se incluírem no grupo teste (mesmo sacrificando o número total de casos de estudo na investigação) e usar medidas de tempo e classificações descritas na literatura, de forma a permitir compreensão global e melhor comparação com outros centros.

Procurando contribuir com resposta para a necessidade de estudos na população cirúrgica neonatal, demonstrada no estudo C, realizámos o estudo D. Este é o primeiro estudo, de que temos conhecimento, que fornece informações sobre incidência e fatores preditivos de morbidade grave e mortalidade na população neonatal cirúrgica, demonstrando que a cirurgia neonatal continua a ser um contexto importante de morbimortalidade, mesmo num centro de referência para esta cirurgia. Perante a evidência de morbimortalidade elevada nesta população, também apontada pelo estudo C e corroborada pelos nossos resultados, a identificação de fatores de risco é um contributo importante para a eventual prevenção da sua ocorrência. O reconhecimento dos fatores de risco independentes de morbimortalidade em cirurgia neonatal pode ajudar os médicos a gerir mais adequadamente essa população muito vulnerável e diminuir a incerteza de prognóstico, permitindo uma melhor compreensão do risco, comunicação mais informada com os pais e previsão mais precisa dos eventuais resultados. No nosso estudo, foram identificados dois fatores de risco independentes (classificação ASA 3 a 5 e enterocolite necrosante/perfuração intestinal em recém-nascidos operados) para mortalidade dentro de 30 dias da cirurgia e quatro fatores de risco independentes (reoperação, operação por hérnia diafragmática congénita, prematuridade menor que 32 semanas de idade gestacional e cirurgia abdominal) para complicações pós-operatórias graves dentro de 30 dias da cirurgia. Embora empiricamente estes fatores de risco não surpreendam, é importante a sua identificação científica baseada na evidência, uma vez que outros fatores que se esperaria poderem estar ligados a maior risco de mortalidade precoce ou morbidade não o estavam nesta série e que também se excluiu a associação independente de características das quais se desconhecia o eventual impacto.

2 CONCLUSÃO FINAL

Durante muitos anos não se questionou a segurança da anestesia geral, analgesia e sedação em pediatria. Contudo, há emergência clínica e laboratorial de informação contrária recente, sugerindo que os doentes pediátricos com sistema nervoso central em desenvolvimento e associando comorbilidades têm alto risco de mortalidade e morbidade *major*, nomeadamente de disfunção cognitiva, subsequente a procedimentos realizados sob fármacos anestésicos, sedativos ou analgésicos opióides. Outros estudos e este sugerem, como observado em análise sistemática da literatura de morbimortalidade *major* precoce após anestesia/cirurgia no primeiro ano de vida e em estudo retrospectivo de coorte de recém-nascidos sujeitos a cirurgia neonatal sob anestesia geral, que as crianças com doença cirúrgica expostas a anestesia geral, sedação e analgesia durante o período crítico de desenvolvimento do SNC têm risco alto de morbimortalidade pós-operatória, tendo-se identificado fatores de risco independentes para mortalidade e morbidade que ajudam na orientação destes doentes. Esta Tese reforça ainda o alerta para que a exposição repetida a fármacos opióides e benzodiazepinas em contexto de imaturidade e stresse cirúrgico pode originar distúrbios subsequentes persistentes do neurodesenvolvimento, como observado em modelo animal.

Mais do que tentar atribuir responsabilidades isoladas a anestesia ou cirurgia por efeitos adversos é importante reconhecer estas entidades como indissociáveis no neonato cirúrgico e identificar os seus fatores de risco conjuntos para se poder atuar sobre estes.

O uso de anestesia, analgesia e sedação em ser imaturo é um imperativo que não pode ser evitado nas situações exigindo cirurgia, portanto é urgente e bem-vindo todo o contributo que possa aumentar o conhecimento científico nesta área.

A autora reconhece que, com a presente investigação, há um futuro promissor para uma melhor compreensão da anestesia, analgesia e sedação em criança com sistema nervoso central em desenvolvimento e que os estudos sobre os resultados de morbimortalidade precoces e do neurodesenvolvimento a longo prazo após a exposição a anestésicos/analgésicos/sedativos são cruciais e podem contribuir para uma conceção científica racional de regimes farmacológicos específicos para crianças pequenas.

3 PERSPETIVAS FUTURAS

Embora a presente Tese inclua avanços no conhecimento na área da anestesia/cirurgia neonatal, com o objetivo máximo de contribuir para a segurança a curto e longo prazo dos procedimentos anestésicos nesta idade, ainda são necessários diversos estudos clínicos e pré-clínicos que permitam esclarecer o risco, identificar suas fontes e desenvolver estratégias para as diminuir ou mesmo eliminar.

Nomeadamente, o nosso estudo experimental levanta questões relativas ao impacto no neurodesenvolvimento do ser imaturo exposto a midazolam ou fentanil, fármacos amplamente usados na prática clínica, tornando mandatórios, além do estudo da sua farmacocinética e farmacodinâmica nesta faixa etária em clínica humana, estudos de investigação neurobiológica. Por outro lado, mantém-se a falta de conhecimento relativa aos efeitos a longo prazo no neurodesenvolvimento, tanto em estudos pré-clínicos como clínicos de outros fármacos comumente usados em A/A/S de neonatos além dos visados nesta tese e das várias associações realizadas.

Adicionalmente, são também necessários estudos multicêntricos idealmente com avaliação prospetiva, dirigidos às populações neonatal e lactente, em diferentes grupos (prematuros, doentes cirúrgicos com ou sem neuroinflamação).

IV REFERÊNCIAS

1. Infopedia. Enciclopédia e Dicionários Porto Editora. [Internet]. Porto Ed. 2013. Available from: <http://www.infopedia.pt/lingua-portuguesa/>
2. Morch ET, Major RH. Anaesthesia (early uses of this word). *Curr Res Anesth Analg.* 33(1):64–8.
3. Morton WJ. Memoranda relating to the discovery of surgical anesthesia, and Dr. William T.G. Morton's relation to this event (1905). Reprinted from the *Post-graduate* for April, 1905, 20: 333-353.
4. American Society of Anesthesiologists. Continuum of Depth of Sedation: Definition of General Anesthesia and Levels of Sedation/Analgesia. [Internet]. 2009. Available from: <http://www.asahq.org/For-Healthcare-Professionals/Standards-Guidelines-and-Statements.aspx>
5. Becker DE. Pharmacokinetic considerations for moderate and deep sedation. *Anesth Prog.* 2011;58(4):166–72; quiz 173.
6. Tavares J. Anestésicos gerais e anestésicos locais. In: Osswald W, Guimarães S, editors. *Ter Medicam e suas bases Farm.* 4th ed. Porto: Porto Editora; 2001. p. 202–21.
7. Walther-Larsen S, Rasmussen LS. The former preterm infant and risk of post-operative apnoea: recommendations for management. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2006 Aug;50(7):888–93.
8. Lee HL, Jain L. Physiology of infants with very low birth weight. *Semin Pediatr Surg.* 2000 May;9(2):50–5.
9. REES GJ. Neonatal anaesthesia. *Br Med Bull.* 1958 Jan;14(1):38–41.
10. Bush GH. An appreciation of Dr. Gordon Jackson Rees FRCA, FRCP, FRCPCH: pioneer of paediatric anaesthesia. *Paediatr Anaesth.* 2001 May;11(3):379–81.
11. Holzman RS. An appreciation of Robert Moors Smith MD, an icon of pediatric anesthesiology. *Paediatr Anaesth.* 2010 Aug;20(8):767–70.
12. Campbell S, Wilson G, Engelhardt T. Equipment and monitoring--what is in the future to improve safety? *Paediatr Anaesth.* 2011 Jul;21(7):815–24.
13. Anand KJS, Aranda J V, Berde CB, Buckman S, Capparelli E V, Carlo W, et al. Summary proceedings from the neonatal pain-control group. *Pediatrics.* 2006 Mar;117(3 Pt 2):S9–S22.

14. Truchon R. Anaesthetic considerations for laparoscopic surgery in neonates and infants: a practical review. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol.* 2004 Jun;18(2):343–55.
15. Saxena KN. Anaesthesia for fetal surgeries. *Indian J Anaesth.* 2009 Oct;53(5):554–9.
16. Lopes MF. Cirurgia da atresia do esófago. Especial referência à preservação do esófago nativo no hiato-longo. Estudo clínico e experimental. Tese de Doutorado. Universidade de Coimbra; 2005.
17. Pinheiro PFM, Simões e Silva AC, Pereira RM. Current knowledge on esophageal atresia. *World J Gastroenterol.* 2012 Jul 28;18(28):3662–72.
18. Wójcicki P, Drozdowski PH. In utero surgery--current state of the art--part II. *Med Sci Monit.* 2011 Dec;17(12):RA262–70.
19. Ruano R, Peiro JL, da Silva MM, Campos JADB, Carreras E, Tannuri U, et al. Early fetoscopic tracheal occlusion for extremely severe pulmonary hypoplasia in isolated congenital diaphragmatic hernia: preliminary results. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2013 Jul;42(1):70–6.
20. Christison-Lagay ER, Kelleher CM, Langer JC. Neonatal abdominal wall defects. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2011 Jun;16(3):164–72.
21. De la Hunt MN. The acute abdomen in the newborn. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2006 Jun;11(3):191–7.
22. Fitzgibbons SC, Ching Y, Yu D, Carpenter J, Kenny M, Weldon C, et al. Mortality of necrotizing enterocolitis expressed by birth weight categories. *J Pediatr Surg.* 2009 Jun;44(6):1072–5; discussion 1075–6.
23. Hillier SC, Krishna G, Brasoveanu E. Neonatal anesthesia. *Semin Pediatr Surg.* 2004 Aug;13(3):142–51.
24. Clyman RI, Couto J, Murphy GM. Patent ductus arteriosus: are current neonatal treatment options better or worse than no treatment at all? *Semin Perinatol.* 2012 Apr;36(2):123–9.
25. Peiró JL, Encinas JL. [Fetal surgery of myelomeningocele: from experimental results to clinical evidence]. *Cir Pediatr.* 2012 Jan;25(1):1–3.
26. Adzick NS. Fetal surgery for myelomeningocele: trials and tribulations. Isabella Forshall Lecture. *J Pediatr Surg.* 2012 Feb;47(2):273–81.
27. Martins P, Castela E. Transposition of the great arteries. *Orphanet J Rare Dis.* 2008 Jan;3:27.
28. Brusseau R, McCann ME. Anaesthesia for urgent and emergency surgery. *Early Hum Dev.* 2010 Nov;86(11):703–14.

29. Wolf AR. Ductal ligation in the very low-birth weight infant: simple anesthesia or extreme art? *Pediatr Anesth.* 2012 Jun 10;22(6):558–63.
30. Sweetman SC, editor. *Martindale. The Complete Drug Reference. Thirty-six.* Pharmaceutical Press; 2009. p. 1779–97.
31. Lago P, Garetti E, Boccuzzo G, Merazzi D, Pirelli A, Pieragostini L, et al. Procedural pain in neonates: the state of the art in the implementation of national guidelines in Italy. Bosenberg A, editor. *Pediatr Anesth.* 2013 May 10;23(5):407–14.
32. Sohn VY, Zenger D, Steele SR. Pain management in the pediatric surgical patient. *Surg Clin North Am.* 2012 Jul;92(3):471–85, vii.
33. Hudak ML, Tan RC. Neonatal drug withdrawal. *Pediatrics.* 2012 Mar;129(2):e540–60.
34. Fine G. Anesthetic Management of the Neonate having Emergency Surgery. Refresh course SPA (society *Pediatr Anesth Pediatr Anesthesiol* 2007 winter Meet. 2007.
35. Taneja B, Srivastava V, Saxena K. Physiological and anaesthetic considerations for the preterm neonate undergoing surgery. *J Neonatal Surg.* 2012;1(1):14.
36. Anand KJ, Hickey PR. Halothane-morphine compared with high-dose sufentanil for anesthesia and postoperative analgesia in neonatal cardiac surgery. *N Engl J Med.* 1992 Jan 2;326(1):1–9.
37. Hall RW. Anesthesia and Analgesia in the NICU. *Clin Perinatol.* 2012;39:239–54.
38. Woolf CJ, Salter MW. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science.* 2000 Jun 9;288(5472):1765–9.
39. Walker SM, Franck LS, Fitzgerald M, Myles J, Stocks J, Marlow N. Long-term impact of neonatal intensive care and surgery on somatosensory perception in children born extremely preterm. *Pain.* 2009 Jan;141(1-2):79–87.
40. Franck LS, Ridout D, Howard R, Peters J, Honour JW. A comparison of pain measures in newborn infants after cardiac surgery. *Pain. ELSEVIER SCIENCE BV;* 2011;152(8):1758–65.
41. Walco GA, Cassidy RC, Schechter NL. Pain, hurt, and harm. The ethics of pain control in infants and children. *N Engl J Med.* 1994 Aug 25;331(8):541–4.
42. Walker SM. Pain in children: recent advances and ongoing challenges. *Br J Anaesth.* 2008 Jul;101(1):101–10.
43. Hall RW, Shbarou RM. Drugs of Choice for Sedation and Analgesia in the Neonatal ICU. *Clin Perinatol.* 2009;36:215–26.

44. Infomed - Base de dados de medicamentos. Infarmed - Autoridade Nacional de Medicamentos e Produtos de Saúde, I.P. [Internet]. 2013. Available from: <http://www.infarmed.pt/infomed/inicio.php>
45. Professional Drug Information database [Internet]. 2013. Available from: <http://www.drugs.com/pro/>
46. Gormley S, Crean P. Basic principles of anaesthesia for neonates and infants. *BJA CEPD Rev.* 2001;1(5):130–3.
47. Alcorn J, McNamara PJ. Pharmacokinetics in the newborn. *Adv Drug Deliv Rev.* 2003 Apr 29;55(5):667–86.
48. Kearns GL, Abdel-Rahman SM, Alander SW, Blowey DL, Leeder JS, Kauffman RE. Developmental pharmacology--drug disposition, action, and therapy in infants and children. *N Engl J Med.* 2003 Oct 18;349(12):1157–67.
49. Anderson BJ, Meakin GH. Scaling for size: some implications for paediatric anaesthesia dosing. *Paediatr Anaesth.* 2002 Mar;12(3):205–19.
50. Ferguson SA, Ward WL, Paule MG, Hall RW, Anand KJ. A pilot study of preemptive morphine analgesia in preterm neonates: effects on head circumference, social behavior, and response latencies in early childhood. *NeurotoxicolTeratol.* 2012;34(1872-9738 (Electronic)):47–55.
51. De Graaf J, Van Lingen RA, Simons SHP, Anand KJS, Duivenvoorden HJ, Weisglas-Kuperus N, et al. Long-term effects of routine morphine infusion in mechanically ventilated neonates on children's functioning: five-year follow-up of a randomized controlled trial. *Pain. International Association for the Study of Pain;* 2011;152(6):1391–7.
52. Flamant C, Denizot S, Caillaux G, Frondas A, Migraine A, Rozé J-C. [Analgesia and sedation in premature newborns]. *Soins Pédiatr Pueric.* (256):24–5.
53. De Graaf J, van Lingen RA, Valkenburg AJ, Weisglas-Kuperus N, Groot Jebbink L, Wijnberg-Williams B, et al. Does neonatal morphine use affect neuropsychological outcomes at 8 to 9 years of age? *Pain.* 2013 Mar;154(3):449–58.
54. Smith MC, Williamson J, Yaster M, Boyd GJC, Heitmiller ES. Off-label use of medications in children undergoing sedation and anesthesia. *Anesth Analg.* 2012 Nov;115(5):1148–54.
55. Hsu B, Brazelton T. Off-label medication use in an academic hospital pediatric critical care unit. *WMJ Off Publ State Med Soc Wisconsin.* 2009;108(7):343–8.
56. Chang LW, Dudley AW, Katz J. Pathological changes in the nervous system following in utero exposure to halothane. *Environ Res.* 1976 Feb;11(1):40–51.

57. Hagberg H, Peebles D, Mallard C. Models of white matter injury: comparison of infectious, hypoxic-ischemic, and excitotoxic insults. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 2002 Jan;8(1):30–8.
58. Laudénbach V, Calo G, Guerrini R, Lamboley G, Benoist JF, Evrard P, et al. Nociceptin/orphanin FQ exacerbates excitotoxic white-matter lesions in the murine neonatal brain. *J Clin Invest.* 2001 Feb;107(4):457–66.
59. Sabir H, Bishop S, Cohen N, Maes E, Liu X, Dingley J, et al. Neither Xenon nor Fentanyl Induces Neuroapoptosis in the Newborn Pig Brain. *Anesthesiology.* 2013 Aug;119(2):345–57.
60. Vutskits L, Gascon E, Tassonyi E, Kiss JZ. Clinically relevant concentrations of propofol but not midazolam alter in vitro dendritic development of isolated gamma-aminobutyric acid-positive interneurons. *Anesthesiology.* 2005 May;102(5):970–6.
61. Young C, Jevtovic-Todorovic V, Qin Y-Q, Tenkova T, Wang H, Labruyere J, et al. Potential of ketamine and midazolam, individually or in combination, to induce apoptotic neurodegeneration in the infant mouse brain. *Br J Pharmacol.* 2005 Sep;146(2):189–97.
62. Koch SC, Fitzgerald M, Hathway GJ. Midazolam potentiates nociceptive behavior, sensitizes cutaneous reflexes, and is devoid of sedative action in neonatal rats. *Anesthesiology.* 2008 Jan;108(1):122–9.
63. McClaine RJ, Uemura K, de la Fuente SG, Manson RJ, Booth J V, White WD, et al. General anesthesia improves fetal cerebral oxygenation without evidence of subsequent neuronal injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2005 Aug;25(8):1060–9.
64. Jevtovic-Todorovic V, Hartman RE, Izumi Y, Benshoff ND, Dikranian K, Zorumski CF, et al. Early exposure to common anesthetic agents causes widespread neurodegeneration in the developing rat brain and persistent learning deficits. *J Neurosci.* 2003 Feb 1;23(3):876–82.
65. Boscolo A, Milanovic D, Starr JA, Sanchez V, Oklopčić A, Moy L, et al. Early exposure to general anesthesia disturbs mitochondrial fission and fusion in the developing rat brain. *Anesthesiology.* 2013 May;118(5):1086–97.
66. Bajic D, Commons KG, Soriano SG. Morphine-enhanced apoptosis in selective brain regions of neonatal rats. *Int J Dev Neurosci.* 2013 Jun;31(4):258–66.
67. Slikker W, Zou X, Hotchkiss CE, Divine RL, Sadovova N, Twaddle NC, et al. Ketamine-induced neuronal cell death in the perinatal rhesus monkey. *Toxicol Sci.* 2007 Jul;98(1):145–58.
68. Zou X, Patterson TA, Divine RL, Sadovova N, Zhang X, Hanig JP, et al. Prolonged exposure to ketamine increases neurodegeneration in the developing monkey brain. *Int J Dev Neurosci.* 2009 Nov;27(7):727–31.

69. Paule MG, Li M, Allen RR, Liu F, Zou X, Hotchkiss C, et al. Ketamine anesthesia during the first week of life can cause long-lasting cognitive deficits in rhesus monkeys. *Neurotoxicol Teratol.* 33(2):220–30.
70. Brambrink AM, Back SA, Riddle A, Gong X, Moravec MD, Dissen GA, et al. Isoflurane-induced apoptosis of oligodendrocytes in the neonatal primate brain. *Ann Neurol.* 2012 Oct;72(4):525–35.
71. Bai X, Yan Y, Canfield S, Muravyeva MY, Kikuchi C, Zaja I, et al. Ketamine enhances human neural stem cell proliferation and induces neuronal apoptosis via reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway. *Anesth Analg.* 2013 Apr;116(4):869–80.
72. Liu F, Paule MG, Ali S, Wang C. Ketamine-induced neurotoxicity and changes in gene expression in the developing rat brain. *Curr Neuropharmacol.* 2011 Mar;9(1):256–61.
73. Liu F, Patterson TA, Sadovova N, Zhang X, Liu S, Zou X, et al. Ketamine-induced neuronal damage and altered N-methyl-D-aspartate receptor function in rat primary forebrain culture. *Toxicol Sci.* 2013 Feb;131(2):548–57.
74. Cattano D, Young C, Straiko MMW, Olney JW. Subanesthetic doses of propofol induce neuroapoptosis in the infant mouse brain. *Anesth Analg.* 2008 Jun;106(6):1712–4.
75. Milanovic D, Popic J, Pesic V, Loncarevic-Vasiljkovic N, Kanazir S, Jevtovic-Todorovic V, et al. Regional and temporal profiles of calpain and caspase-3 activities in postnatal rat brain following repeated propofol administration. *Dev Neurosci.* 2010 Jan;32(4):288–301.
76. Pesić V, Milanović D, Tanić N, Popić J, Kanazir S, Jevtović-Todorović V, et al. Potential mechanism of cell death in the developing rat brain induced by propofol anesthesia. *Int J Dev Neurosci.* 2009 May;27(3):279–87.
77. Cui Y, Ling-Shan G, Yi L, Xing-Qi W, Xue-Mei Z, Xiao-Xing Y. Repeated administration of propofol upregulated the expression of c-Fos and cleaved-caspase-3 proteins in the developing mouse brain. *Indian J Pharmacol.* 2011 Nov;43(6):648–51.
78. Briner A, Nikonenko I, De Roo M, Dayer A, Muller D, Vutskits L. Developmental Stage-dependent persistent impact of propofol anesthesia on dendritic spines in the rat medial prefrontal cortex. *Anesthesiology.* 2011 Aug;115(2):282–93.
79. Karen T, Schlager GW, Bendix I, Siffringer M, Herrmann R, Pantazis C, et al. Effect of propofol in the immature rat brain on short- and long-term neurodevelopmental outcome. *PLoS One.* 2013 Jan;8(5):e64480.

80. Creeley C, Dikranian K, Dissen G, Martin L, Olney J, Brambrink A. Propofol-induced apoptosis of neurones and oligodendrocytes in fetal and neonatal rhesus macaque brain. *Br J Anaesth*. 2013 Jun;110 Suppl i29–38.
81. Zou W-W, Xiao H-P, Gu M-N, Liu K-X, Liu Z-Q. Propofol induces rat embryonic neural stem cell apoptosis by activating both extrinsic and intrinsic pathways. *Mol Med Rep*. 2013 Apr;7(4):1123–8.
82. Zou X, Liu F, Zhang X, Patterson TA, Callicott R, Liu S, et al. Inhalation anesthetic-induced neuronal damage in the developing rhesus monkey. *Neurotoxicol Teratol*. 33(5):592–7.
83. Johnson SA, Young C, Olney JW. Isoflurane-induced neuroapoptosis in the developing brain of nonhypoglycemic mice. *J Neurosurg Anesthesiol*. 2008 Jan;20(1):21–8.
84. Briner A, De Roo M, Dayer A, Muller D, Habre W, Vutskits L. Volatile anesthetics rapidly increase dendritic spine density in the rat medial prefrontal cortex during synaptogenesis. *Anesthesiology*. 2010 Mar;112(3):546–56.
85. Brosnan H, Bickler PE. Xenon neurotoxicity in rat hippocampal slice cultures is similar to isoflurane and sevoflurane. *Anesthesiology*. 2013 Aug;119(2):335–44.
86. Cattano D, Williamson P, Fukui K, Avidan M, Evers AS, Olney JW, et al. Potential of xenon to induce or to protect against neuroapoptosis in the developing mouse brain. *Can J Anaesth*. 2008 Jul;55(7):429–36.
87. Satomoto M, Satoh Y, Terui K, Miyao H, Takishima K, Ito M, et al. Neonatal exposure to sevoflurane induces abnormal social behaviors and deficits in fear conditioning in mice. *Anesthesiology*. 2009 Mar;110(3):628–37.
88. Fang F, Xue Z, Cang J. Sevoflurane exposure in 7-day-old rats affects neurogenesis, neurodegeneration and neurocognitive function. *Neurosci Bull*. 2012 Oct;28(5):499–508.
89. Zhou X, Song F-H, He W, Yang X-Y, Zhou Z-B, Feng X, et al. Neonatal exposure to sevoflurane causes apoptosis and reduces nNOS protein expression in rat hippocampus. *Mol Med Rep*. 2012 Sep;6(3):543–6.
90. Wang S-Q, Fang F, Xue Z-G, Cang J, Zhang X-G. Neonatal sevoflurane anesthesia induces long-term memory impairment and decreases hippocampal PSD-95 expression without neuronal loss. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2013 Apr;17(7):941–50.
91. Zheng H, Dong Y, Xu Z, Crosby G, Culley DJ, Zhang Y, et al. Sevoflurane anesthesia in pregnant mice induces neurotoxicity in fetal and offspring mice. *Anesthesiology*. 2013 Mar;118(3):516–26.
92. Harman F, Hasturk AE, Yaman M, Arca T, Kilinc K, Sargon MF, et al. Neuroprotective effects of propofol, thiopental, etomidate, and midazolam in

- fetal rat brain in ischemia-reperfusion model. *Childs Nerv Syst.* 2012 Jul;28(7):1055–62.
93. Bissuel M, Deguines C, Tourneux P. [A national survey on pain management before tracheal intubation in neonates in French type III maternity units]. *Arch Pediatr.* 2013 Feb;20(2):123–9.
 94. Minardi C, Sahillioğlu E, Astuto M, Colombo M, Ingelmo PM. Sedation and analgesia in pediatric intensive care. *Curr Drug Targets.* 2012 Jun;13(7):936–43.
 95. Kissin I, Brown PT, Bradley EL. Sedative and hypnotic midazolam-morphine interactions in rats. *Anesth Analg.* 1990 Aug;71(2):137–43.
 96. Durrmeyer X, Vutskits L, Anand KJS, Rimensberger PC. Use of analgesic and sedative drugs in the NICU: integrating clinical trials and laboratory data. *Pediatr Res.* 2010 Feb;67(2):117–27.
 97. Wang C, Slikker W. Strategies and experimental models for evaluating anesthetics: effects on the developing nervous system. *Anesth Analg.* 2008 Jun;106(6):1643–58.
 98. Jevtovic-Todorovic V. Pediatric anesthesia neurotoxicity: an overview of the 2011 SmartTots panel. *Anesth Analg.* 2011 Nov;113(5):965–8.
 99. Luján R, Shigemoto R, López-Bendito G. Glutamate and GABA receptor signalling in the developing brain. *Neuroscience.* 2005 Jan;130(3):567–80.
 100. Cunha-Oliveira T, Rego AC, Oliveira CR. Cellular and molecular mechanisms involved in the neurotoxicity of opioid and psychostimulant drugs. *Brain Res Rev.* 2008 Jun;58(1):192–208.
 101. Pereira FC, Cunha-Oliveira T, Viana SD, Travassos AS, Nunes S, Silva C, et al. Disruption of striatal glutamatergic/GABAergic homeostasis following acute methamphetamine in mice. *Neurotoxicol Teratol.* 34(5):522–9.
 102. Olney JW, Young C, Wozniak DF, Ikonomidou C, Jevtovic-Todorovic V. Anesthesia-induced developmental neuroapoptosis. Does it happen in humans? *Anesthesiology.* 2004 Aug;101(2):273–5.
 103. Olney JW, Young C, Wozniak DF, Jevtovic-Todorovic V, Ikonomidou C. Do pediatric drugs cause developing neurons to commit suicide? *Trends Pharmacol Sci.* 2004 Mar;25(3):135–9.
 104. Hays SR, Deshpande JK. Newly postulated neurodevelopmental risks of pediatric anesthesia: theories that could rock our world. *J Urol.* 2013 Apr;189(4):1222–8.
 105. Pearn ML, Hu Y, Niesman IR, Patel HH, Drummond JC, Roth DM, et al. Propofol neurotoxicity is mediated by p75 neurotrophin receptor activation. *Anesthesiology.* 2012 Feb;116(2):352–61.

106. Ward CG, Loepke AW. Anesthetics and sedatives: toxic or protective for the developing brain? *Pharmacol Res.* 2012 Mar;65(3):271–4.
107. Patel P, Sun L. Update on neonatal anesthetic neurotoxicity: insight into molecular mechanisms and relevance to humans. *Anesthesiology.* 2009 Apr;110(4):703–8.
108. Loepke AW, McGowan FX, Soriano SG. CON: The toxic effects of anesthetics in the developing brain: the clinical perspective. *Anesth Analg.* 2008 Jun;106(6):1664–9.
109. Clancy B, Finlay BL, Darlington RB, Anand KJS. Extrapolating brain development from experimental species to humans. *Neurotoxicology.* 2007 Sep;28(5):931–7.
110. Dobbing J, Sands J. Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum Dev.* 1979 Mar;3(1):79–83.
111. Vidair CA. Age dependence of organophosphate and carbamate neurotoxicity in the postnatal rat: extrapolation to the human. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2004 Apr 15;196(2):287–302.
112. Werboff J, Gottlieb JS, Havlena A J, Word TJ. Behavioral effects of prenatal drug administration in the white rat. *Pediatrics.* 1961 Feb;27:318–24.
113. Irwin S. Comprehensive observational assessment: Ia. A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse. *Psychopharmacologia.* 1968 Sep 20;13(3):222–57.
114. Hermans RH, Hunter DE, McGivern RF, Cain CD, Longo LD. Behavioral sequelae in young rats of acute intermittent antenatal hypoxia. *Neurotoxicol Teratol.* 1992;14(2):119–29.
115. Altman J, Sudarshan K. Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. *Anim Behav.* 1975 Nov;23(4):896–920.
116. Patin V, Vincent A, Lordi B, Caston J. Does prenatal stress affect the motoric development of rat pups? *Brain Res Dev Brain Res.* 2004 Apr 19;149(2):85–92.
117. Jaiswal AK, Upadhyay SN, Satyan KS, Bhattacharya SK. Behavioural effects of prenatal and postnatal undernutrition in rats. *Indian J Exp Biol.* 1996 Dec;34(12):1216–9.
118. Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol.* 2003 Feb 28;463(1-3):3–33.
119. Wallace K, Veerisetty S, Paul I, May W, Miguel-Hidalgo JJ, Bennett W. Prenatal infection decreases calbindin, decreases Purkinje cell volume and density and

- produces long-term motor deficits in Sprague-Dawley rats. *Dev Neurosci*. 2010 Jan;32(4):302–12.
120. Fan L-W, Chen R-F, Mitchell HJ, Lin RCS, Simpson KL, Rhodes PG, et al. alpha-Phenyl-n-tert-butyl-nitrone attenuates lipopolysaccharide-induced brain injury and improves neurological reflexes and early sensorimotor behavioral performance in juvenile rats. *J Neurosci Res*. 2008 Dec;86(16):3536–47.
 121. Silberman Y, Ariwodola OJ, Chappell AM, Yorgason JT, Weiner JL. Lateral paracapsular GABAergic synapses in the basolateral amygdala contribute to the anxiolytic effects of beta 3 adrenoceptor activation. *Neuropsychopharmacology*. 2010 Aug;35(9):1886–96.
 122. De Castro VL, Chiorato SH, Pinto NF. Relevance of developmental testing of exposure to methamidophos during gestation to its toxicology evaluation. *Toxicol Lett*. 2000 Dec 20;118(1-2):93–102.
 123. Hall CS. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *J Comp Psychol*. 1934;18:385–403.
 124. Handley SL, Mithani S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of “fear”-motivated behaviour. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol*. 1984 Aug;327(1):1–5.
 125. Pellow S, File SE. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol Biochem Behav*. 1986 Mar;24(3):525–9.
 126. Ennaceur A, Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res*. 1988 Nov 1;31(1):47–59.
 127. Chapillon P, Lalonde R, Jones N, Caston J. Early development of synchronized walking on the rotorod in rats. Effects of training and handling. *Behav Brain Res*. 1998 Jun;93(1-2):77–81.
 128. Vutskits L, Davis PJ, Hansen TG. Anesthetics and the developing brain: time for a change in practice? A pro/con debate. *Paediatr Anaesth*. 2012 Oct;22(10):973–80.
 129. Mintz CD, Wagner M, Loepke AW. Preclinical research into the effects of anesthetics on the developing brain: promises and pitfalls. *J Neurosurg Anesthesiol*. 2012 Oct;24(4):362–7.
 130. Kuczkowski KM. Nonobstetric surgery during pregnancy: what are the risks of anesthesia? *Obstet Gynecol Surv*. 2004 Jan;59(1):52–6.
 131. Sun L. Early childhood general anaesthesia exposure and neurocognitive development. *Br J Anaesth*. 2010 Dec;105 Suppl i61–8.

132. Catré D, Lopes M, Viana J, Cabrita A. Morbimortalidade perioperatória no primeiro ano de idade. *Rev Bras Anesthesiol. In Press*. DOI: 10.1016/j.bjan.2013.03.025.
133. Ikonomidou C, Bosch F, Miksa M, Bittigau P, Vöckler J, Dikranian K, et al. Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science*. 1999 Jan 1;283(5398):70–4.
134. Catré D, Lopes MF, Cabrita AS. Lasting developmental effects of neonatal fentanyl exposure in preweanling rats. *Anesthesiol Res Pract*. 2012 Jan;2012:180124.
135. Walker SM, Yaksh TL. Neuraxial analgesia in neonates and infants: a review of clinical and preclinical strategies for the development of safety and efficacy data. *Anesth Analg*. 2012 Sep;115(3):638–62.
136. Golub MS. Labor analgesia and infant brain development. *Pharmacol Biochem Behav*. 1996 Dec;55(4):619–28.
137. Surgery and the tiny baby: sensorineural outcome at 5 years of age. The Victorian Infant Collaborative Study Group. *J Paediatr Child Health*. 1996 Apr;32(2):167–72.
138. Rees CM, Pierro A, Eaton S. Neurodevelopmental outcomes of neonates with medically and surgically treated necrotizing enterocolitis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2007 May;92(3):F193–8.
139. Sun LS, Li G, DiMaggio CJ, Byrne MW, Ing C, Miller TLK, et al. Feasibility and pilot study of the Pediatric Anesthesia NeuroDevelopment Assessment (PANDA) project. *J Neurosurg Anesthesiol*. 2012 Oct;24(4):382–8.
140. Sanders RD, Hassell J, Davidson AJ, Robertson NJ, Ma D. Impact of anaesthetics and surgery on neurodevelopment: an update. *Br J Anaesth*. 2013 Jun;110 Suppl i53–72.
141. Kinouchi K. Anaesthetic considerations for the management of very low and extremely low birth weight infants. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*. 2004 Jun;18(2):273–90.
142. Gonzalez LP, Pignaton W, Kusano PS, Módolo NSP, Braz JRC, Braz LG. Anesthesia-related mortality in pediatric patients: a systematic review. *Clinics (Sao Paulo)*. 2012 Jan;67(4):381–7.
143. Paterson N, Waterhouse P. Risk in pediatric anesthesia. *Paediatr Anaesth*. 2011 Aug;21(8):848–57.
144. Somri M, Coran AG, Hadjittofi C, Parisinos CA, Mogilner JG, Sukhotnik I, et al. Improved outcomes in paediatric anaesthesia: contributing factors. *Pediatr Surg Int*. 2012 Jun;28(6):553–61.

145. Morray JP. Cardiac arrest in anesthetized children: recent advances and challenges for the future. *Paediatr Anaesth*. 2011 Jul;21(7):722–9.
146. Bunchungmongkol N, Punjasawadwong Y, Chumpathong S, Somboonviboon W, Suraseranivongse S, Vasinanukorn M, et al. Anesthesia-related cardiac arrest in children: the Thai Anesthesia Incidents Study (THAI Study). *J Med Assoc Thai*. 2009 Apr;92(4):523–30.
147. Finnegan LP, Connaughton JF, Kron RE, Emich JP. Neonatal abstinence syndrome: assessment and management. *Addict Dis*. 1975 Jan;2(1-2):141–58.
148. Ista E, van Dijk M, Gamel C, Tibboel D, de Hoog M. Withdrawal symptoms in children after long-term administration of sedatives and/or analgesics: a literature review. “Assessment remains troublesome”. *Intensive Care Med*. 2007 Aug;33(8):1396–406.
149. Ista E, van Dijk M, Gamel C, Tibboel D, de Hoog M. Withdrawal symptoms in critically ill children after long-term administration of sedatives and/or analgesics: a first evaluation. *Crit Care Med*. 2008 Aug;36(8):2427–32.
150. Cambonie G, Luc F, Vergnes C, Bongrand P, Lassus P, F. M. Les morphiniques sont-ils en cause dans la leucomalacie périventriculaire du prématuré ? (abstract). *Arch Pediatr*. 1999;6:908.
151. Allegaert K, van de Velde M, van den Anker J. Neonatal clinical pharmacology. *Paediatr Anaesth*. 2013 Apr 26;
152. Portaria nº 1005/92 de 23 de Outubro [Internet]. Available from: http://www.igf.min-financas.pt/inflegal/bd_igf/bd_legis_geral/Leg_geral_docs/PORTARIA_1005_92.htm
153. Council Directive 86/609/EEC [Internet]. Available from: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:31986L0609:en:HTML>
154. European Parliament Directive 2010/63/EU [Internet]. Available from: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32010L0063:EN:NOT>
155. Brennan TJ, Vandermeulen EP, Gebhart GF. Characterization of a rat model of incisional pain. *Pain*. 1996 Mar;64(3):493–501.
156. Claessens SEF, Daskalakis NP, Oitzl MS, de Kloet ER. Early handling modulates outcome of neonatal dexamethasone exposure. *Horm Behav*. 2012 Sep;62(4):433–41.
157. Able JA, Gudelsky GA, Vorhees C V, Williams MT. 3,4-Methylenedioxymethamphetamine in adult rats produces deficits in path integration and spatial reference memory. *Biol Psychiatry*. 2006 Jun 15;59(12):1219–26.

158. Scott HL, Tamagnini F, Narduzzo KE, Howarth JL, Lee Y-B, Wong L-F, et al. MicroRNA-132 regulates recognition memory and synaptic plasticity in the perirhinal cortex. *Eur J Neurosci*. 2012 Oct;36(7):2941–8.
159. Mikula S, Trotts I, Stone JM, Jones EG. Internet-enabled high-resolution brain mapping and virtual microscopy. *Neuroimage*. 2007 Mar;35(1):9–15.
160. BrainMaps: An Interactive Multiresolution Brain Atlas [Internet]. Available from: <http://brainmaps.org/index.php?action=viewslides&datid=94>
161. Kjonigsen LJ, Leergaard TB, Witter MP, Bjaalie JG. Digital atlas of anatomical subdivisions and boundaries of the rat hippocampal region. *Front Neuroinform*. 2011 Jan;5:2.
162. The rat hippocampus atlas [Internet]. Available from: <http://cmbn-approd01.uio.no/zoomgen/hippocampus/Structures/Area35.do>
163. Köktürk S, Yardimoglu M, Celikozlu SD, Dolanbay EG, Cimbiz A. Effect of Lycopersicon esculentum extract on apoptosis in the rat cerebellum, following prenatal and postnatal exposure to an electromagnetic field. *Exp Ther Med*. 2013 Jul;6(1):52–6.
164. Lasky T, Ernst FR, Greenspan J, Wang S, Gonzalez L. Estimating pediatric inpatient medication use in the United States. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*. 2011 Jan;20(1):76–82.
165. Naguib AN, Winch P, Schwartz L, Isaacs J, Rodeman R, Cheatham JP, et al. Anesthetic management of the hybrid stage 1 procedure for hypoplastic left heart syndrome (HLHS). *Paediatr Anaesth*. 2010 Jan;20(1):38–46.
166. Tobias JD. Sedation and analgesia in the pediatric intensive care unit. *Pediatr Ann*. 2005 Aug;34(8):636–45.
167. Klamt JG, de Andrade Vicente WV, Garcia LV, Ferreira CA. Effects of Dexmedetomidine-Fentanyl Infusion on Blood Pressure and Heart Rate during Cardiac Surgery in Children. *Anesthesiol Res Pract*. 2010 Jan;2010.
168. Palot M, Visseaux H, Botmans C. [Conduction anesthesia and the newborn infant]. *Cah Anesthesiol*. 1995 Jan;43(6):547–53.
169. Okon TR, George ML. Fentanyl-induced neurotoxicity and paradoxical pain. *J Pain Symptom Manage*. 2008 Mar;35(3):327–33.
170. Bailey JE, Campagna E, Dart RC. The underrecognized toll of prescription opioid abuse on young children. *Ann Emerg Med*. 2009 Apr;53(4):419–24.
171. Levin TT, Bakr MH, Nikolova T. Case report: delirium due to a diltiazem-fentanyl CYP3A4 drug interaction. *Gen Hosp Psychiatry*. 32(6):648.e9–648.e10.

172. Kofke WA, Garman RH, Stiller RL, Rose ME, Garman R. Opioid neurotoxicity: fentanyl dose-response effects in rats. *Anesth Analg*. 1996 Dec;83(6):1298–306.
173. Kofke WA, Garman RH, Garman R, Rose ME. Opioid neurotoxicity: fentanyl-induced exacerbation of cerebral ischemia in rats. *Brain Res*. 1999 Feb 13;818(2):326–34.
174. Sinz EH, Kofke WA, Garman RH. Phenytoin, midazolam, and naloxone protect against fentanyl-induced brain damage in rats. *Anesth Analg*. 2000 Dec;91(6):1443–9.
175. I Chan LY, Tan CL. Use of intravenous midazolam for sedation in children undergoing ward procedures. *J Singapore Paediatr Soc*. 1992 Jan;34(1-2):30–3.
176. Hughes J, Gill A, Leach HJ, Nunn AJ, Billingham I, Ratcliffe J, et al. A prospective study of the adverse effects of midazolam on withdrawal in critically ill children. *Acta Paediatr*. 1994 Nov;83(11):1194–9.
177. Cravero JP, Blike GT, Beach M, Gallagher SM, Hertzog JH, Havidich JE, et al. Incidence and nature of adverse events during pediatric sedation/anesthesia for procedures outside the operating room: report from the Pediatric Sedation Research Consortium. *Pediatrics*. 2006 Sep;118(3):1087–96.
178. Soriano SG, Anand KJ. Anesthetics and brain toxicity. *Curr Opin Anaesthesiol*. 2005 Jun;18(3):293–7.
179. Harati R, Villégier A-S, Banks WA, Mabondzo A. Susceptibility of juvenile and adult blood-brain barrier to endothelin-1: regulation of P-glycoprotein and breast cancer resistance protein expression and transport activity. *J Neuroinflammation*. 2012 Jan;9:273.
180. Martin TJ, Buechler NL, Kahn W, Crews JC, Eisenach JC. Effects of laparotomy on spontaneous exploratory activity and conditioned operant responding in the rat: a model for postoperative pain. *Anesthesiology*. 2004 Jul;101(1):191–203.
181. Zahn PK, Sluka KA, Brennan TJ. Excitatory amino acid release in the spinal cord caused by plantar incision in the rat. *Pain*. 2002 Nov;100(1-2):65–76.
182. Thornton SR, Smith FL. Characterization of neonatal rat fentanyl tolerance and dependence. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997 Apr;281(1):514–21.
183. Hart G, Harris JA, Westbrook RF. Systemic or intra-amygdala injection of a benzodiazepine (midazolam) impairs extinction but spares re-extinction of conditioned fear responses. *Learn Mem*. 2009 Jan;16(1):53–61.
184. Freo U, Dam M, Ori C. The time-dependent effects of midazolam on regional cerebral glucose metabolism in rats. *Anesth Analg*. 2008 May;106(5):1516–23, table of contents.

185. Albrechet-Souza L, Borelli KG, Almada RC, Brandão ML. Midazolam reduces the selective activation of the rhinal cortex by contextual fear stimuli. *Behav Brain Res.* 2011 Jan 20;216(2):631–8.
186. Márquez-Orozco MC, Gazca-Ramírez MV, de la Fuente-Juárez G, Márquez-Orozco A. Midazolam administered to 8-day-old mouse pups for three weeks induces cerebellar cortex alterations. *Proc West Pharmacol Soc.* 2009 Jan;52:109–11.
187. Zheng H, Zhang Y, Li W, Loh HH, Law P-Y. NeuroD modulates opioid agonist-selective regulation of adult neurogenesis and contextual memory extinction. *Neuropsychopharmacology.* 2013 Apr;38(5):770–7.
188. Barbosa FF, Santos JR, Meurer YSR, Macêdo PT, Ferreira LMS, Pontes IMO, et al. Differential Cortical c-Fos and Zif-268 Expression after Object and Spatial Memory Processing in a Standard or Episodic-Like Object Recognition Task. *Front Behav Neurosci.* 2013 Jan;7:112.
189. Clinton SM, Stead JDH, Miller S, Watson SJ, Akil H. Developmental underpinnings of differences in rodent novelty-seeking and emotional reactivity. *Eur J Neurosci.* 2011 Sep;34(6):994–1005.
190. Agster KL, Burwell RD. Hippocampal and subicular efferents and afferents of the perirhinal, postrhinal, and entorhinal cortices of the rat. *Behav Brain Res.* 2013 Oct 1;254:50–64.
191. Murray EA, Bussey TJ, Saksida LM. Visual perception and memory: a new view of medial temporal lobe function in primates and rodents. *Annu Rev Neurosci.* 2007 Jan;30:99–122.
192. Biagini G, D'Antuono M, Benini R, de Guzman P, Longo D, Avoli M. Perirhinal cortex and temporal lobe epilepsy. *Front Cell Neurosci.* 2013 Jan;7:130.
193. Brown MW, Barker GRI, Aggleton JP, Warburton EC. What pharmacological interventions indicate concerning the role of the perirhinal cortex in recognition memory. *Neuropsychologia.* 2012 Nov;50(13):3122–40.
194. Teicher MH, Anderson CM, Polcari A. Childhood maltreatment is associated with reduced volume in the hippocampal subfields CA3, dentate gyrus, and subiculum. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Feb 28;109(9):E563–72.
195. Masís-Calvo M, Sequeira-Cordero A, Mora-Gallegos A, Fornaguera-Trías J. Behavioral and neurochemical characterization of maternal care effects on juvenile Sprague-Dawley rats. *Physiol Behav.* 2013 Jun 13;118:212–7.
196. Wang H, Gondré-Lewis MC. Prenatal nicotine and maternal deprivation stress de-regulate the development of CA1, CA3, and dentate gyrus neurons in hippocampus of infant rats. *PLoS One.* 2013 Jan;8(6):e65517.

197. Altman J. Morphological development of the rat cerebellum and some of its mechanisms. In: Palay S, Chan-Palay V, editors. *The Cerebellum-New Vistas*. Berlin, Germany: Springer; 1982. p. 8–49.
198. Schmahmann JD, Caplan D. Cognition, emotion and the cerebellum. *Brain*. 2006 Feb;129(Pt 2):290–2.
199. Altman J, Bayer SA. Embryonic development of the rat cerebellum. III. Regional differences in the time of origin, migration, and settling of Purkinje cells. *J Comp Neurol*. 1985 Jan 1;231(1):42–65.
200. Huang LZ, Abbott LC, Winzer-Serhan UH. Effects of chronic neonatal nicotine exposure on nicotinic acetylcholine receptor binding, cell death and morphology in hippocampus and cerebellum. *Neuroscience*. 2007 Jun 8;146(4):1854–68.
201. Altman J. Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. I. The external germinal layer and the transitional molecular layer. *J Comp Neurol*. 1972 Jul;145(3):353–97.
202. Hashimoto K, Kano M. Synapse elimination in the developing cerebellum. *Cell Mol Life Sci*. 2013 Jun 28;
203. Bernocchi G, Bottone MG, Piccolini VM, Dal Bo V, Santin G, De Pascali SA, et al. Developing central nervous system and vulnerability to platinum compounds. *Chemother Res Pract*. 2011 Jan;2011:315418.
204. Burke SN, Hartzell AL, Lister JP, Hoang LT, Barnes CA. Layer V perirhinal cortical ensemble activity during object exploration: a comparison between young and aged rats. *Hippocampus*. 2012 Oct;22(10):2080–93.
205. Wan H, Warburton EC, Zhu XO, Koder TJ, Park Y, Aggleton JP, et al. Benzodiazepine impairment of perirhinal cortical plasticity and recognition memory. *Eur J Neurosci*. 2004 Oct;20(8):2214–24.
206. Bodnar RJ. Endogenous opioids and feeding behavior: a 30-year historical perspective. *Peptides*. 2004 Apr;25(4):697–725.
207. Silveira PP, Xavier MH, Souza FH, Manoli LP, Rosat RM, Ferreira MB, et al. Interaction between repeated restraint stress and concomitant midazolam administration on sweet food ingestion in rats. *Braz J Med Biol Res*. 2000 Nov;33(11):1343–50.
208. Anand KJS, Garg S, Rovnaghi CR, Narsinghani U, Bhutta AT, Hall RW. Ketamine reduces the cell death following inflammatory pain in newborn rat brain. *Pediatr Res*. 2007 Sep;62(3):283–90.
209. Hays SR, Deshpande JK. Newly postulated neurodevelopmental risks of pediatric anesthesia. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2011 Apr;11(2):205–10.

210. Barkus C, McHugh SB, Sprengel R, Seeburg PH, Rawlins JNP, Bannerman DM. Hippocampal NMDA receptors and anxiety: at the interface between cognition and emotion. *Eur J Pharmacol.* 2010 Jan 10;626(1):49–56.
211. Zheng H, Zeng Y, Chu J, Kam AY, Loh HH, Law P-Y. Modulations of NeuroD activity contribute to the differential effects of morphine and fentanyl on dendritic spine stability. *J Neurosci.* 2010 Jun 16;30(24):8102–10.
212. Trojan S, Langmeier M, Maresová D, Mourek J, Pokorný J. Plasticity of the brain in neuroontogenesis. *Prague Med Rep.* 2004 Jan;105(2):97–110.
213. Huang T-Y, Lin L-S, Cho K-C, Chen S-J, Kuo Y-M, Yu L, et al. Chronic treadmill exercise in rats delicately alters the Purkinje cell structure to improve motor performance and toxin resistance in the cerebellum. *J Appl Physiol.* 2012 Sep;113(6):889–95.
214. Tokuda K, O'Dell KA, Izumi Y, Zorumski CF. Midazolam inhibits hippocampal long-term potentiation and learning through dual central and peripheral benzodiazepine receptor activation and neurosteroidogenesis. *J Neurosci.* 2010 Dec 15;30(50):16788–95.
215. De Wildt SN, Kearns GL, Sie SD, Hop WCJ, van den Anker JN. Pharmacodynamics of intravenous and oral midazolam in preterm infants. *Clin Drug Investig.* 2003 Jan;23(1):27–38.
216. Ince I, de Wildt SN, Peeters MYM, Murry DJ, Tibboel D, Danhof M, et al. Critical illness is a major determinant of midazolam clearance in children aged 1 month to 17 years. *Ther Drug Monit.* 2012 Aug;34(4):381–9.
217. Vet NJ, de Hoog M, Tibboel D, de Wildt SN. The effect of critical illness and inflammation on midazolam therapy in children. *Pediatr Crit Care Med.* 2012 Jan;13(1):e48–50.
218. Frölich MA, Zhang K, Ness TJ. Effect of sedation on pain perception. *Anesthesiology.* 2013 Mar;118(3):611–21.
219. Catré D, Lopes M, Cabrita A, Viana J. Anestesia Pediátrica em Período de Imaturidade Cerebral e Perturbação do Neurodesenvolvimento. *Acta Med Port.* 2014;27(3):383–9.
220. Guerra GG, Robertson CMT, Alton GY, Joffe AR, Cave DA, Dinu IA, et al. Neurodevelopmental outcome following exposure to sedative and analgesic drugs for complex cardiac surgery in infancy. *Paediatr Anaesth.* Blackwell Publishing Ltd; 2011;21(9):932–41.
221. Forbess JM, Visconti KJ, Bellinger DC, Howe RJ, Jonas RA. Neurodevelopmental outcomes after biventricular repair of congenital heart defects. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2002 Apr;123(4):631–9.

222. Chorne N, Leonard C, Piecuch R, Clyman RI. Patent ductus arteriosus and its treatment as risk factors for neonatal and neurodevelopmental morbidity. *Pediatrics*. 2007 Jun;119(6):1165–74.
223. Hintz SR, Kendrick DE, Stoll BJ, Vohr BR, Fanaroff AA, Donovan EF, et al. Neurodevelopmental and growth outcomes of extremely low birth weight infants after necrotizing enterocolitis. *Pediatrics*. 2005 Mar;115(3):696–703.
224. DiMaggio C, Sun LS, Kakavouli A, Byrne MW, Li G. A retrospective cohort study of the association of anesthesia and hernia repair surgery with behavioral and developmental disorders in young children. *J Neurosurg Anesthesiol*. 2009 Oct;21(4):286–91.
225. Wilder RT, Flick RP, Sprung J, Katusic SK, Barbaresi WJ, Mickelson C, et al. Early exposure to anesthesia and learning disabilities in a population-based birth cohort. *Anesthesiology*. 2009 Apr;110(4):796–804.
226. Kalkman CJ, Peelen L, Moons KG, Veenhuizen M, Bruens M, Sinnema G, et al. Behavior and development in children and age at the time of first anesthetic exposure. *Anesthesiology*. 2009 Apr;110(4):805–12.
227. Hansen TG, Pedersen JK, Henneberg SW, Pedersen DA, Murray JC, Morton NS, et al. Academic performance in adolescence after inguinal hernia repair in infancy: a nationwide cohort study. *Anesthesiology*. 2011 May;114(5):1076–85.
228. DiMaggio C, Sun LS, Li G. Early childhood exposure to anesthesia and risk of developmental and behavioral disorders in a sibling birth cohort. *Anesth Analg*. 2011 Nov;113(5):1143–51.
229. Ing C, DiMaggio C, Whitehouse A, Hegarty MK, Brady J, von Ungern-Sternberg BS, et al. Long-term differences in language and cognitive function after childhood exposure to anesthesia. *Pediatrics*. 2012 Sep;130(3):e476–85.
230. Sprung J, Flick RP, Wilder RT, Katusic SK, Pike TL, Dingli M, et al. Anesthesia for cesarean delivery and learning disabilities in a population-based birth cohort. *Anesthesiology*. 2009 Aug;111(2):302–10.
231. Flick RP, Katusic SK, Colligan RC, Wilder RT, Voigt RG, Olson MD, et al. Cognitive and behavioral outcomes after early exposure to anesthesia and surgery. *Pediatrics*. 2011 Nov;128(5):e1053–61.
232. Sprung J, Flick RP, Katusic SK, Colligan RC, Barbaresi WJ, Bojanić K, et al. Attention-deficit/hyperactivity disorder after early exposure to procedures requiring general anesthesia. *Mayo Clin Proc*. 2012 Feb;87(2):120–9.
233. Bartels M, Althoff RR, Boomsma DI. Anesthesia and cognitive performance in children: no evidence for a causal relationship. *Twin Res Hum Genet*. 2009 Jun;12(3):246–53.

234. DiMaggio C, Sun LS, Ing C, Li G. Pediatric anesthesia and neurodevelopmental impairments: a Bayesian meta-analysis. *J Neurosurg Anesthesiol.* 2012 Oct;24(4):376–81.
235. Flick RP, Wilder RT, Sprung J, Katusic SK, Voigt R, Colligan R, et al. Anesthesia and cognitive performance in children: no evidence for a causal relationship. Are the conclusions justified by the data? Response to Bartels et al., 2009. *Twin Res Hum Genet.* 2009 Dec;12(6):611–2; discussion 613–4.
236. Flick RP, Warner DO. Hernia repair, anesthetic exposure, and academic performance in children. *Anesthesiology.* 2011 Dec;115(6):1387; author reply 1387–8.
237. Flick RP, Lee K, Hofer RE, Beinborn CW, Hambel EM, Klein MK, et al. Neuraxial labor analgesia for vaginal delivery and its effects on childhood learning disabilities. *Anesth Analg.* 2011 Jun;112(6):1424–31.
238. Williams RK. The pediatrician and anesthesia neurotoxicity. *Pediatrics.* 2011 Nov;128(5):e1268–70.
239. Loepke AW. Developmental neurotoxicity of sedatives and anesthetics: a concern for neonatal and pediatric critical care medicine? *Pediatr Crit Care Med.* 2010 Mar;11(2):217–26.
240. Morita K, Kawashima Y, Irita K, Kobayayashi T, Goto Y, Iwao Y, et al. [Perioperative mortality and morbidity in 1999 with a special reference to age in 466 certified training hospitals of Japanese Society of Anesthesiologists--report of Committee on Operating Room Safety of Japanese Society of Anesthesiologists]. *Masui.* 2001 Aug;50(8):909–21.
241. Morita K, Kawashima Y, Irita K, Iwao Y, Seo N, Tsuzaki K. [Perioperative mortality and morbidity in the year 2000 in 520 certified training hospitals of Japanese Society of Anesthesiologists: with a special reference to age--report of Japanese Society of Anesthesiologists Committee on Operating Room Safety]. *Masui.* 2002 Nov;51(11):1285–96.
242. Chan RPC, Auler Junior JOC. [Retrospective study of anesthetic deaths in the first 24 hours: review of 82,641 anesthetics.]. *Rev Bras Anesthesiol.* 2002 Nov;52(6):719–27.
243. Flick RP, Sprung J, Harrison TE, Gleich SJ, Schroeder DR, Hanson AC, et al. Perioperative cardiac arrests in children between 1988 and 2005 at a tertiary referral center: a study of 92,881 patients. *Anesthesiology.* 2007;106(2):226–237; quiz 413–414.
244. Bunchungmongkol N, Somboonviboon W, Suraseranivongse S, Vasinanukorn M, Chau-in W, Hintong T. Pediatric anesthesia adverse events: the Thai Anesthesia Incidents Study (THAI Study) database of 25,098 cases. *J Med Assoc Thai.* 2007 Oct;90(10):2072–9.

245. Ahmed A, Ali M, Khan M, Khan F. Perioperative cardiac arrests in children at a university teaching hospital of a developing country over 15 years. *Paediatr Anaesth.* 2009 Jun;19(6):581–6.
246. Bharti N, Batra YK, Kaur H. Paediatric perioperative cardiac arrest and its mortality: database of a 60-month period from a tertiary care paediatric centre. *Eur J Anaesthesiol.* 2009 Jun;26(6):490–5.
247. Van der Griend BF, Lister NA, McKenzie IM, Martin N, Ragg PG, Sheppard SJ, et al. Postoperative mortality in children after 101,885 anaesthetics at a tertiary pediatric hospital. *Anesth Analg.* 2011 Jun;112(6):1440–7.
248. Kawashima Y, Seo N, Morita K, Irita K, Iwao Y, Tsuzaki K, et al. Anesthesia-related mortality and morbidity in Japan (1999). *J Anesth.* 2002 Jan;16(4):319–31.
249. Murat I, Constant I, Maud’huy H. Perioperative anaesthetic morbidity in children: a database of 24,165 anaesthetics over a 30-month period. *Paediatr Anaesth.* 2004 Feb;14(2):158–66.
250. Braz LG, Módolo NSP, do Nascimento P, Bruschi BAM, Castiglia YMM, Ganem EM, et al. Perioperative cardiac arrest: a study of 53,718 anaesthetics over 9 yr from a Brazilian teaching hospital. *Br J Anaesth.* 2006 May;96(5):569–75.
251. Braz LG, Braz JRC, Módolo NSP, Nascimento Júnior P do, Shuhama AP, Navarro LHC. [Cardiac arrest during anesthesia at a tertiary teaching hospital: prospective survey from 1996 to 2002.]. *Rev Bras Anesthesiol.* 2004 Dec;54(6):755–68.
252. Tay CL, Tan GM, Ng SB. Critical incidents in paediatric anaesthesia: an audit of 10 000 anaesthetics in Singapore. *Paediatr Anaesth.* 2001 Nov;11(6):711–8.
253. Edomwonyi NP, Ekwere IT, Egbekun R, Eluwa B. Anesthesia-related complications in children. *Middle East J Anesthesiol.* 2006 Jun;18(5):915–27.
254. Samaké B, Keita M, Magalie IMC, Diallo G, Diallo A. [Adverse events of anesthesia in pediatric surgery scheduled at Gabriel Toure hospital]. *Mali Med.* 2010 Jan;25(1):1–4.
255. Morray JP, Geiduschek JM, Ramamoorthy C, Haberkern CM, Hackel A, Caplan RA, et al. Anesthesia-related cardiac arrest in children: initial findings of the Pediatric Perioperative Cardiac Arrest (POCA) Registry. *Anesthesiology.* 2000 Jul;93(1):6–14.
256. Bhananker SM, Ramamoorthy C, Geiduschek JM, Posner KL, Domino KB, Haberkern CM, et al. Anesthesia-related cardiac arrest in children: update from the Pediatric Perioperative Cardiac Arrest Registry. *Anesth Analg. IARS;* 2007;105(2):344–50.

257. MacLennan AI, Smith AF. An analysis of critical incidents relevant to pediatric anesthesia reported to the UK National Reporting and Learning System, 2006-2008. *Paediatr Anaesth*. 2011 Aug;21(8):841-7.
258. Oxford Centre for Evidence-based Medicine - Levels of Evidence [Internet]. 2009. Available from: <http://www.cebm.net/index.aspx?o=1025>
259. Mason LJ. An update on the etiology and prevention of anesthesia-related cardiac arrest in children. *Paediatr Anaesth*. 2004 May;14(5):412-6.
260. Zuercher M, Ummenhofer W. Cardiac arrest during anesthesia. *Curr Opin Crit Care*. 2008 Jun;14(3):269-74.
261. Lee C, Mason L. Complications in paediatric anaesthesia. *Curr Opin Anaesthesiol*. 2006;19(3):262-7.
262. Hoffman GM. Outcomes of pediatric anesthesia. *Semin Pediatr Surg*. 2008 May;17(2):141-51.
263. Catré D, Lopes M, Madrigal A, Oliveiros B, Viana J, Cabrita A. Early Mortality after Neonatal Surgery: Analysis of Risk Factors in an Optimized Health Care System for the Surgical Newborn. *Rev Bras Epidemiol*. 2013;16(4):943-52.
264. Catré D, Lopes M, Madrigal A, Oliveiros B, Cabrita A, Viana J, et al. Predictors of major postoperative complications in neonatal surgery. *Rev Col Bras Cir*. 2013;40(5):363-9.
265. Horbar JD, Carpenter JH, Badger GJ, Kenny MJ, Soll RF, Morrow KA, et al. Mortality and neonatal morbidity among infants 501 to 1500 grams from 2000 to 2009. *Pediatrics*. 2012 Jun;129(6):1019-26.
266. Tomé T, Guimarães H, Bettencourt A, Peixoto JC. Neonatal morbi-mortality in very low birth weight in Europe: the Portuguese experience. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2009 Jan;22 Suppl 3:85-7.
267. Neto MT, Tavares M das N, Serelha M, Casella P. [The surgical face of a neonatal intensive care unit]. *Acta Pediatr Port*. 2010;41(6):241-5.
268. OECD. Health at a Glance 2011: OECD Indicators. OECD Publ. 2011.
269. Muldoon KA, Galway LP, Nakajima M, Kanters S, Hogg RS, Bendavid E, et al. Health system determinants of infant, child and maternal mortality: A cross-sectional study of UN member countries. *Global Health*. 2011 Jan;7:42.
270. Neto MT. Perinatal care in Portugal: effects of 15 years of a regionalized system. *Acta Paediatr*. 2006 Nov;95(11):1349-52.
271. Rocha G, Saldanha J, Macedo I, Areias A, Graça A, Tomé T. [Conditions for neonatal resuscitation in Portuguese delivery rooms: a national survey (2009)]. *Acta Med Port*. 2011 Dec;24 Suppl 2:213-22; quiz 223-8.

272. Reis ZSN, Pereira AC, Correia RJC, Freitas JAS, Cabral ACV, Bernardes J. [Analysis of maternal and child health indicators: the parallel between Portugal and Brazil]. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2011 Sep;33(9):234–9.
273. Mendes A da CG, Sá DA de, Miranda GMD, Lyra TM, Tavares RAW. [The public healthcare system in the context of Brazil's demographic transition: current and future demands]. *Cad Saude Publica.* 2012 May;28(5):955–64.
274. Boat AC, Sadhasivam S, Loepke AW, Kurth CD. Outcome for the extremely premature neonate: how far do we push the edge? *Paediatr Anaesth.* 2011 Jul;21(7):765–70.
275. Boyle EM, Poulsen G, Field DJ, Kurinczuk JJ, Wolke D, Alfirevic Z, et al. Effects of gestational age at birth on health outcomes at 3 and 5 years of age: population based cohort study. *BMJ.* 2012 Jan;344:e896.
276. Clavien PA, Sanabria JR, Strasberg SM. Proposed classification of complications of surgery with examples of utility in cholecystectomy. *Surgery.* 1992 May;111(5):518–26.
277. Dindo D, Demartines N, Clavien P-A. Classification of surgical complications: a new proposal with evaluation in a cohort of 6336 patients and results of a survey. *Ann Surg.* 2004 Aug;240(2):205–13.
278. Lee HC, Subeh M, Gould JB. Low Apgar score and mortality in extremely preterm neonates born in the United States. *Acta Paediatr.* 2010 Dec;99(12):1785–9.
279. Martin JA, Hamilton BE, Sutton PD, Ventura SJ, Mathews TJ, Kirmeyer S, et al. Births: final data for 2007. *Natl Vital Stat Rep.* 2010 Aug 9;58(24):1–85.
280. Olsen IE, Groveman SA, Lawson ML, Clark RH, Zemel BS. New intrauterine growth curves based on United States data. *Pediatrics.* 2010 Feb;125(2):e214–24.
281. Taguchi T. Current progress in neonatal surgery. *Surg Today.* 2008 Jan;38(5):379–89.
282. Lee EJ, Choi KJ. Mortality Analysis of Surgical Neonates : A 20-year Experience by A Single Surgeon. *J Korean Assoc Pediatr Surg.* 2006 Dec 1;12(2):137–46.
283. Gangopadhyay AN, Upadhyaya VD, Sharma SP. Neonatal surgery: a ten year audit from a university hospital. *Indian J Pediatr.* 2008 Oct;75(10):1025–30.
284. Chirdan LB, Ngiloi PJ, Elhalaby EA. Neonatal surgery in Africa. *Semin Pediatr Surg.* 2012 May;21(2):151–9.
285. Faponle AF, Sowande OA, Adejuyigbe O. Anaesthesia for neonatal surgical emergencies in a semi-urban hospital, Nigeria. *East Afr Med J.* 2004 Nov;81(11):568–73.

286. Ventura MT, Gomes M do C. [Descriptive analysis of maternal and neonatal characteristics in the maternity of the Dona Estefânia Hospital between 2005 and 2008]. *Acta Med Port.* 23(5):793–802.
287. Davidson A. The future of pediatric anesthesia. *Paediatr Anaesth.* 2012 Jun;22(6):570–2.
288. Malviya S, Voepel-Lewis T, Chiravuri SD, Gibbons K, Chimbira WT, Nafiu OO, et al. Does an objective system-based approach improve assessment of perioperative risk in children? A preliminary evaluation of the “NARCO”. *Br J Anaesth.* 2011 Mar;106(3):352–8.
289. Clark RH, Gordon P, Walker WM, Laughon M, Smith PB, Spitzer AR. Characteristics of patients who die of necrotizing enterocolitis. *J Perinatol.* 2012 Mar;32(3):199–204.
290. Lee JH. An update on necrotizing enterocolitis: pathogenesis and preventive strategies. *Korean J Pediatr.* 2011 Sep;54(9):368–72.
291. Thyoka M, de Coppi P, Eaton S, Khoo K, Hall NJ, Curry J, et al. Advanced necrotizing enterocolitis part 1: mortality. *Eur J Pediatr Surg.* 2012 Feb;22(1):8–12.
292. Gephart SM, McGrath JM, Effken JA, Halpern MD. Necrotizing enterocolitis risk: state of the science. *Adv Neonatal Care.* 2012 Apr;12(2):77–87; quiz 88–9.
293. Eicher C, Seitz G, Bevot A, Moll M, Goelz R, Arand J, et al. Surgical management of extremely low birth weight infants with neonatal bowel perforation: a single-center experience and a review of the literature. *Neonatology.* 2012 Jan;101(4):285–92.
294. Chiu B, Pillai SB, Almond PS, Beth Madonna M, Reynolds M, Luck SR, et al. To drain or not to drain: a single institution experience with neonatal intestinal perforation. *J Perinat Med.* 2006 Jan;34(4):338–41.
295. Rakshashbuvankar A, Rao S, Minutillo C, Gollow I, Kolar S. Peritoneal drainage versus laparotomy for perforated necrotising enterocolitis or spontaneous intestinal perforation: a retrospective cohort study. *J Paediatr Child Health.* 2012 Mar;48(3):228–34.
296. UNICEF and WHO. *Low Birthweight: Country, Regional and Global Estimates.* 2004.
297. Terzic S, Heljic S. Assessing mortality risk in very low birth weight infants. *Med Arh.* 2012 Jan;66(2):76–9.
298. Wehby GL, Ullrich F, Xie Y. Very low birth weight hospital volume and mortality: an instrumental variables approach. *Med Care.* 2012 Aug;50(8):714–21.

299. Clavien PA, Barkun J, de Oliveira ML, Vauthey JN, Dindo D, Schulick RD, et al. The Clavien-Dindo classification of surgical complications: five-year experience. *Ann Surg.* 2009 Aug;250(2):187–96.
300. Slankamenac K, Graf R, Puhan MA, Clavien P-A. Perception of surgical complications among patients, nurses and physicians: a prospective cross-sectional survey. *Patient Saf Surg.* 2011 Jan;5(1):30.
301. Freilich DA, Cilento BG, Graham D, Zhou J, Retik AB, Nguyen HT. Perioperative risk factors for surgical complications in pediatric urology: a pilot study in preoperative risk assessment in children. *Urology.* 2010 Jul;76(1):3–8.
302. Weinberg AC, Huang L, Jiang H, Tinloy B, Raskas MD, Penna FJ, et al. Perioperative risk factors for major complications in pediatric surgery: a study in surgical risk assessment for children. *J Am Coll Surg.* 2011 May;212(5):768–78.
303. Harraz AM, Shokeir AA, Soliman SA, El-Hefnawy AS, Kamal MM, Kamal AI, et al. Toward a standardized system for reporting surgical outcome of pediatric and adolescent live donor renal allotransplantation. *J Urol.* 2012 Mar;187(3):1041–6.
304. Blume ED, Altmann K, Mayer JE, Colan SD, Gauvreau K, Geva T. Evolution of risk factors influencing early mortality of the arterial switch operation. *J Am Coll Cardiol.* 1999 May;33(6):1702–9.
305. Tsao K, Allison ND, Harting MT, Lally PA, Lally KP. Congenital diaphragmatic hernia in the preterm infant. *Surgery.* 2010 Aug;148(2):404–10.
306. Lai H-S, Lin W-H, Chen H-A, Fan S-Z, Chou H-C. Successful laparotomy in a 432 g extremely low-birth-weight infant with focal intestinal perforations. *Int Surg.* 95(1):57–9.
307. Knottenbelt G, Costi D, Stephens P, Beringer R, Davidson A. An audit of anesthetic management and complications of tracheo-esophageal fistula and esophageal atresia repair. *Paediatr Anaesth.* 2012 Mar;22(3):268–74.
308. Spitz L. Oesophageal atresia. *Orphanet J Rare Dis.* 2007 Jan;2:24.
309. Burjonrappa S, Crete E, Bouchard S. Comparative outcomes in intestinal atresia: a clinical outcome and pathophysiology analysis. *Pediatr Surg Int.* 2011 Apr;27(4):437–42.
310. St Peter SD, Valusek PA, Tsao K, Holcomb GW, Ostlie DJ, Snyder CL. Abdominal complications related to type of repair for congenital diaphragmatic hernia. *J Surg Res.* 2007 Jun 15;140(2):234–6.
311. Safavi A, Synnes AR, O'Brien K, Chiang M, Skarsgard ED, Chiu PPL. Multi-institutional follow-up of patients with congenital diaphragmatic hernia reveals severe disability and variations in practice. *J Pediatr Surg.* 2012 May;47(5):836–41.