

Leína Zorzanelli

**Relação entre padrões hemodinâmicos e mediadores
de inflamação em cardiopatias congênitas com
comunicações sistêmico-pulmonares**

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

Programa de Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. Antonio Augusto Barbosa Lopes

São Paulo

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Zorzaneli, Leina
Relação entre padrões hemodinâmicos e mediadores
de inflamação em cardiopatias congênitas com
comunicações sistêmico-pulmonares / Leina Zorzaneli.
-- São Paulo, 2019.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Cardiologia.
Orientador: Antonio Augusto Barbosa Lopes.

Descritores: 1.Cardiopatias congênitas
2.Circulação pulmonar 3.Hipertensão pulmonar
4.Síndrome de Down 5.Mediadores da inflamação
6.Citocinas 7.Quimiocinas 8.Ecocardiografia
9.Citrato de sildenafil

USP/FM/DBD-010/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

“Apesar dos nossos defeitos, precisamos enxergar que somos pérolas únicas no teatro da vida, e entender que não existem pessoas de sucesso ou pessoas fracassadas. O que existe são pessoas que lutam pelos seus sonhos ou desistem deles.”

(Augusto Cury)

*“Girl, put your records on
Tell me your favorite song
You go ahead, let your hair down
Sapphire and faded jeans
I hope you get your dreams
Just go ahead, let your hair down
You're gonna find yourself somewhere, somehow”*

(Corinne Bailey Rae)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus filhos, Bernardo e Lara, razão pela qual acordo todos os dias querendo ser uma pessoa melhor. Fui muito abençoada e agradeço todos os dias por serem meus filhos, minha dupla favorita no mundo todo.

Dedico também ao meu amado marido Juliano, meu porto seguro, com quem venho caminhando lado a lado nos últimos 10 anos, sempre com muito respeito e admiração mútua. E com quem espero dividir todas as alegrias e tristezas pelo resto da vida.

À minha madrinha, Regina, minha “Di”, por sempre ter acreditado em mim, me ajudando a levantar todas as vezes que precisei e que foi fundamental para que eu pudesse estar aqui hoje. Obrigada mais uma vez por TUDO!

Aos meus avós Raul e Heny, meus eternos exemplos de família, de caráter, de princípios. Vocês são a minha base, meus maiores amores.

À minha mãe Luciana, pelo amor e esforço sempre com minha educação, para que eu fosse sempre uma pessoa “do bem”.

À minha tia Francesca, mais amiga que tia, por todo o amor e cumplicidade desde sempre e para sempre.

À minha afilhada Brenda, por ter me ensinado tão cedo o quão grande pode ser o amor de madrinha.

A Deus, que sempre esteve ao meu lado nesta caminhada chamada “vida” e, nos momentos mais difíceis, me ajudou a reencontrar a fé e a esperança perdidas, para novamente seguir minha jornada por caminhos cheios de luz e amor.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Antonio Augusto B. Lopes, por ter incentivado meu crescimento como médica e pesquisadora desde quando ainda era apenas uma residente, e por não ter desistido de mim desde então. Obrigada por caminhar ao meu lado durante essa jornada chamada pós-graduação, cheia de “brainstorming”, me mostrando sempre a importância da busca por novos aprendizados. Deixo aqui registrada minha admiração.

À minha amiga, não só de pós-graduação, mas também grande incentivadora da minha escolha pela cardiologia pediátrica, Dra. Ana Maria Thomaz. Obrigada pela amizade e disponibilidade sempre.

À minha amiga Dra. Mariana M. Clavé, por toda ajuda e apoio no decorrer desses 4 anos. Você foi um “bônus” que ganhei ao ingressar na pós-graduação.

À Dra. Nana Miura pelo apoio, confiança e toda a compreensão durante a concretização deste trabalho.

À Profa. Dra. Vera D. Aiello por ser, para mim, um exemplo de médica e pesquisadora, mas acima de tudo, um grande exemplo como pessoa. Obrigada por nos dar a honra de aprender sempre.

À Sra. Roseli Polo pela competência, disponibilidade e ajuda sempre que precisei.

À Dra. Nair Y. Maeda pela dedicação à pesquisa e pelos sábios conselhos durante o projeto.

Aos colegas da Cardiologia Pediátrica do Instituto do Coração (Incor) – FMUSP, pelo convívio harmonioso e pela troca diária de experiências. Em especial, agradeço ao Dr. Adailson Siqueira, à Dra. Ana Cristina S. Tanaka, à Dra. Maria Angélica Binotto, à Dra. Rilvani Cavalcante, à Dra. Alessandra Barreto, ao Dr. Cavalini, à Dra. Wilma Maeda e à Dra. Anna Christina Ribeiro, por ouvirem meus desabaços e por estarem sempre dispostos a me ajudar, a despeito de todas as adversidades.

Agradeço à equipe de Ecocardiografia, em especial às minhas queridas Dra. Glaucia Tavares, Dra. Claudia Castro e Dra. Renata Rossi, pelos ensinamentos e pela confiança.

Aos colegas da Cirurgia Cardíaca Pediátrica do Instituto do Coração (Incor) – FMUSP, por estarem sempre dispostos a colaborar com a pesquisa e por facilitarem nosso trabalho em equipe.

Aos colegas da UTI Cirúrgica Infantil do Instituto do Coração (Incor) – FMUSP, pela dedicação no cuidado com nossos pacientes. Em especial, o meu muito obrigada à Profa. Dra. Filomena Galas e à minha amiga Dra. Vanessa Guimarães.

À equipe multidisciplinar do Incor, pelo brilhante trabalho em equipe, sempre buscando o melhor para cada um dos nossos pequenos pacientes.

À minha amiga-irmã, Dra. Mirela Almeida, que mesmo distante, se fez sempre “perto” e disponível. Obrigada pela sua amizade e por seus conselhos, que sempre iluminam minhas ideias quando mais preciso.

À minha amiga Dra. Carolina Brito, uma grande incentivadora dos meus projetos, profissionais e de vida. Obrigada pela sua cumplicidade e pela amizade verdadeira.

Ao meu grupo de amigos, mais conhecido, como “cardiofriends”, pelo apoio, amizade e pelas boas risadas sempre.

NOMALIZAÇÃO ADOTADA

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

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

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

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

SUMÁRIO

LISTAS

Abreviaturas e siglas

Símbolos

Tabelas e quadro

Figuras

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Alterações vasculares pulmonares e estruturais	5
1.2 Formas de apresentação clínica e caracterização de padrões hemodinâmicos	8
1.3 Biopatologia das alterações vasculares pulmonares e participação de mecanismos relacionados à inflamação	12
2. OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo primário	16
2.2 Objetivo secundário	16
3. MÉTODOS	17
3.1 Desenho do estudo	18
3.2 Pacientes	18
3.3 Elementos clínicos utilizados para a caracterização inicial dos pacientes nos grupos do estudo	20
3.4 Tamanho amostral	22
3.5 Fluxograma de avaliação dos pacientes no estudo	23
3.6 Avaliação clínica	23
3.7 Estimacão ecocardiográfica de variáveis hemodinâmicas	24
3.8 Cateterismo cardíaco	26
3.9 Tratamento medicamentoso pré-operatório e medidas de segurança	27
3.10 Determinações laboratoriais	28
3.11 Procedimentos intra-operatórios	32
3.12 Evolução pós-operatória imediata	32
3.13 Procedimentos estatísticos	33
4. RESULTADOS	35
4.1 Dados descritivos dos pacientes e grupos do estudo	36
4.1.1 Análise geral dos pacientes	36
4.1.2 Análise dos pacientes de acordo com os grupos no estudo	36
4.2 Análise inferencial	39

4.2.1	Mediadores de inflamação em todos os pacientes, sem distinção de grupos, em relação a fatores de gravidade da hipertensão pulmonar ...	39
4.2.2	Mediadores de inflamação segundo os grupos clínicos considerados no estudo	47
4.2.3	Administração pré-operatória de sildenafil e seus efeitos sobre variáveis clínicas e nível de mediadores inflamatórios	49
5.	DISCUSSÃO	52
6.	CONCLUSÕES	64
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	66
8.	REFERÊNCIAS	69

ANEXOS

ANEXO 1 - Termo de consentimento livre e esclarecido	
ANEXO 2 - Dados ecocardiográficos, hemodinâmicos, terapêuticos e de biópsia pulmonar nos pacientes do Grupo 1	
ANEXO 3 - Dados demográficos e diagnósticos individuais dos pacientes recrutados para o estudo	
ANEXO 4 - Níveis séricos das proteínas analisadas no estudo, em todos os pacientes (N = 47)	
ANEXO 5 - Níveis séricos das proteínas analisadas nos controles pediátricos (N = 13)	
ANEXO 6 - Publicações	

LISTAS

Abreviaturas e siglas

Gerais

CC	Cardiopatía congênita
CEC	Circulação extracorpórea
HAP	Hipertensão arterial pulmonar
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IL	Interleucina
NCT	<i>National Clinical Trial</i>
NO	Óxido nítrico
PMAP	Pressão média de artéria pulmonar
PSAP	Pressão sistólica de artéria pulmonar
Qp/Qs	Razão entre os fluxos sanguíneos pulmonar e sistêmico
Qp	Fluxo sanguíneo pulmonar
Qpi	Fluxo sanguíneo pulmonar indexado
Qs	Fluxo sanguíneo sistêmico
Qsi	Fluxo sanguíneo sistêmico indexado
RVP	Resistência vascular pulmonar
RVS	Resistência vascular sistêmica
RVP/RVS	Razão entre as resistências vasculares pulmonar e sistêmica
R ²	Coefficiente de determinação
UTI	Unidade de terapia intensiva
VTI	Integral velocidade-tempo
VTI _{vp}	Integral velocidade-tempo em veia pulmonar

Específicas para mediadores inflamatórios

C5	<i>Complement component 5</i>
C5a	<i>Complement component C5a</i>
G-CSF	<i>Granulocyte-colony stimulating factor</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
GRO α	<i>Growth-regulated oncogene alpha</i>
I-309	<i>Chemokine I-309</i>
IFN- γ	<i>Interferon-gamma</i>
IL-10	<i>Interleukin-10</i>

IL-12(p70)	<i>Interleukin-12 (p70)</i>
IL-13	<i>Interleukin-13</i>
IL-16	<i>Interleukin-16</i>
IL-17	<i>Interleukin-17</i>
IL-17E	<i>Interleukin-17E</i>
IL-1ra	<i>Interleukin-1 receptor antagonist</i>
IL-1 α	<i>Interleukin-1 alpha</i>
IL-1 β	<i>Interleukin-1 beta</i>
IL-2	<i>Interleukin-2</i>
IL-23	<i>Interleukin-23</i>
IL-27	<i>Interleukin-27</i>
IL-32 α	<i>Interleukin-32 alpha</i>
IL-4	<i>Interleukin-4</i>
IL-5	<i>Interleukin-5</i>
IL-6	<i>Interleukin-6</i>
IL-8	<i>Interleukin-8</i>
IP-10	<i>Interferon gamma-induced protein 10</i>
I-TAC	<i>Interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant</i>
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
MIF	<i>Macrophage migration inhibitory factor</i>
MIP-1 α	<i>Macrophage inflammatory protein 1 alpha</i>
MIP-1 β	<i>Macrophage inflammatory protein 1 beta</i>
PAI-1	<i>Plasminogen activator inhibitor-1</i>
RANTES	<i>Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted</i>
sCD40L	<i>Soluble CD40 ligand</i>
SDF-1	<i>Stromal cell-derived factor 1</i>
Serpin E1	<i>Serine protease inhibitor E1</i>
sICAM-1	<i>Soluble intercellular adhesion molecule-1</i>
sTREM	<i>Soluble triggering receptor expressed on myeloid cells</i>
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor-alpha</i>

Símbolos

cm	Centímetro
%	Porcentagem
μm	Micrômetro
>	Maior
<	Menor
~	Aproximadamente
Kg	Quilograma
mg/Kg/dia	Miligramas por quilo por dia
mmHg	Milímetros de mercúrio
mL	Mililitro
m ²	Metro quadrado
L/min/m ²	Litros por minuto por metro quadrado
ppm	Parte por milhão
°C	Graus Celsius
U x m ²	Unidades Wood vezes metro quadrado

Tabelas e quadro

Tabela 1 -	Risco estimado de evolução para doença vascular pulmonar segundo as diferentes cardiopatias congênitas, quando não corrigidas.....	6
Tabela 2 -	Apresentação de dados demográficos, diagnósticos e funcionais de acordo com os grupos do estudo	38
Tabela 3 -	Níveis séricos de mediadores de inflamação em relação à idade e variáveis ecocardiográficas	41
Quadro 1 -	Proteínas incluídas no estudo	30

Figuras

Figura 1 -	Alterações vasculares pulmonares observadas em cardiopatias congênitas segundo a classificação de Heath-Edwards	7
Figura 2 -	“Dot blot” representando a análise de citocinas séricas e moléculas relacionadas com uso de anticorpos específicos e identificação por quimioluminescência	31
Figura 3 -	Relação da interleucina 16 (IL-16) sérica com dados ecocardiográficos e de biópsia pulmonar	42
Figura 4 -	Níveis séricos das quimiocinas GRO α e MIF, e da interleucina 17E (IL-17E) em função da idade	45
Figura 5 -	Interleucina 17E sérica em função de variáveis relacionadas à gravidade das alterações vasculares pulmonares	46
Figura 6 -	Níveis séricos das quimiocinas MIF e RANTES segundo os grupos considerados no estudo	48
Figura 7 -	“Dot blots” representativos da análise da quimiocina MIF nos grupos do estudo	49
Figura 8 -	Efeitos da administração pré-operatória de sildenafil sobre variáveis clínicas e bioquímicas	51

RESUMO

Zorzaneli L. *Relação entre padrões hemodinâmicos e mediadores de inflamação em cardiopatias congênitas com comunicações sistêmico-pulmonares* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

INTRODUÇÃO: Pacientes pediátricos portadores de defeitos septais cardíacos não restritivos podem apresentar, em cerca de 5% a 10% dos casos, remodelamento vascular pulmonar progressivo, com evolução para hipertensão arterial pulmonar (HAP) de grau moderado ou acentuado. A inflamação e a imunidade exercem papel central na patogênese da HAP, porém são ainda pouco exploradas neste grupo específico de pacientes. O presente estudo, prospectivo, longitudinal e de coorte, teve como objetivo avaliar níveis circulantes de mediadores inflamatórios segundo grupos de pacientes hemodinamicamente distintos. Concomitantemente foram analisadas possíveis correlações com dados histopatológicos e com resposta à intervenção medicamentosa. **MÉTODOS:** Estabelecida a forte suspeita de hipertensão pulmonar por exame à beira leito, foram incluídos no estudo 47 pacientes, com idade de dois a 37 meses (mediana 10 meses), sendo 32 portadores de síndrome de Down. Pacientes classificados como Grupo 1 (n=16) apresentavam sinais clínicos de hiper-resistência pulmonar e foram aqueles submetidos ao cateterismo cardíaco, com níveis comprovadamente elevados de resistência vascular pulmonar (5,2 (4,2-8,9) U x m², mediana e intervalo interquartilico). Pacientes classificados como Grupo 2 (n=31) apresentavam sinais clínicos de hiperfluxo com congestão pulmonar, não necessitando de cateterismo pré-operatório. A relação entre fluxo pulmonar e sistêmico (Qp/Qs), estimada por ecocardiografia, foi de 1,9 (1,3-2,6) no Grupo 1 e 2,8 (2,3-3,3) no Grupo 2 (p=0,008). Foram analisadas 36 citocinas séricas através de quimioluminescência. **RESULTADOS:** Observando-se os pacientes como um todo (n=47), os níveis séricos da quimiocina MIF (*macrophage migration inhibitory factor*) estavam aumentados (7510±2755 pixels x 5697±2051 pixels em controles pediátricos, média±desvio padrão). Entretanto, os níveis de MIF estiveram especificamente aumentados no Grupo 1 quando comparados ao Grupo 2 e controles (respectivamente, 8494±619 pixels, 6618±477 pixels e 6548±726 pixels, média ajustada para idade±erro padrão, p=0,037). Por outro

lado, níveis da quimiocina RANTES (*regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*) estavam aumentados especificamente no Grupo 2 quando comparados ao Grupo 1 e controles (respectivamente, 74183±3865 pixels, 60130±6455 pixels e 59332±3970 pixels, média±erro padrão, p=0,039). Este comportamento foi semelhante quando analisados apenas os pacientes com síndrome de Down. Em todos os pacientes, a quimiocina GRO α (*growth-regulated oncogene alpha*) esteve aumentada nos primeiros meses de vida, com subsequente declínio exponencial ($R^2 = -0,47$, $p < 0,001$), enquanto a interleucina 17E (também conhecida como IL-25) apresentou relação direta com a idade ($R^2 = 0,44$, $p = 0,002$). A interleucina 16 apresentou relação inversa com o fluxo sanguíneo pulmonar ($r_s = -0,34$, $p = 0,018$) e níveis mais elevados em pacientes com evidência de doença vascular avançada em biópsia realizada no intra-operatório ($p = 0,021$). Pacientes do Grupo 1 receberam sildenafil no pré-operatório, o que resultou em aumento do fluxo sanguíneo pulmonar ($p = 0,012$) e da saturação periférica de oxigênio ($p = 0,010$), além de redução dos níveis de interleucina 6 ($p = 0,027$) e ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1) ($p = 0,011$). Não foi observado comportamento particular em pacientes com síndrome de Down. **CONCLUSÕES:** Os dados apresentados indicam uma relação entre níveis séricos de algumas citocinas e gravidade da doença vascular pulmonar, com potenciais implicações fisiopatológicas e clínicas. Além disso, o envolvimento da interleucina 17E e do MIF enfatizam o papel da resposta imune Th2, já descritas na HAP. Os resultados também permitem um questionamento a respeito das generalizações correntes relacionadas à vasculopatia pulmonar na síndrome de Down, anteriormente considerada como fator de risco em todos os casos.

Descritores: cardiopatias congênitas; circulação pulmonar; hipertensão pulmonar; síndrome de Down; mediadores da inflamação; citocinas; quimiocinas; ecocardiografia; citrato de sildenafil.

ABSTRACT

Zorzaneli L. *Relation between hemodynamic patterns and mediators of inflammation in congenital heart disease with systemic to pulmonary shunts* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2019.

INTRODUCTION: Pediatric patients with nonrestrictive cardiac septal defects may present progressive pulmonary vascular remodeling with progression to pulmonary arterial hypertension (PAH), which might range from moderate to severe in about 5% to 10% of the patients. Inflammation and immunity play a central role in the pathogenesis of PAH, but are still poorly explored in this specific group of patients. This current study - prospective, longitudinal and cohort – was aimed at evaluating circulating levels of inflammatory mediators according to hemodynamically distinct groups of patients. At the same time, possible correlations with histopathological data and response to vasodilator intervention were analyzed. **METHODS:** After the establishment of a strong suspicion of pulmonary hypertension at bedside, 47 patients aged 2 to 37 months (median 10 months) were included in the study, of which 32 had Down syndrome. Patients classified as Group 1 (n = 16) had clinical signs of elevated pulmonary vascular resistance and were subjected to cardiac catheterization, with proven levels of increased pulmonary vascular resistance (5.2 (4.2-8.9) U x m², median and interquartile range). Patients classified as Group 2 (n = 31) presented clinical signs of increased blood flow with pulmonary congestion, requiring no preoperative catheterization. The pulmonary to systemic blood flow ratio (Qp/Qs), estimated by echocardiography, was 1.9 (1.3-2.6) in Group 1 and 2.8 (2.3-3.3) in Group 2 (p = 0.008). Thirty-six cytokines and related proteins were analyzed in serum by chemiluminescence. **RESULTS:** Observing patients as a whole (n = 47), serum levels of the chemokine MIF (*macrophage migration inhibitory factor*) were increased (7510 ± 2755 pixels x 5697 ± 2051 pixels in pediatric controls, mean ± standard deviation). However, MIF levels were specifically increased in Group 1 when compared to Group 2 and controls (respectively, 8494 ± 619 pixels, 6618 ± 477 pixels and 6548 ± 726 pixels, mean age adjusted ± standard error, p = 0.037). On the other hand, RANTES (*regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*) levels were specifically increased in Group 2 when compared to Group 1 and controls

(respectively 74183 ± 3865 pixels, 60130 ± 6455 pixels and 59332 ± 3970 pixels, mean \pm standard error, $p = 0.039$). This behavior was similar when only patients with Down syndrome were analyzed. In all patients, GRO α (*growth-regulated oncogene alpha*) was increased in the first months of life, with subsequent exponential decline ($R^2 = -0.47$, $p < 0.001$), while interleukin 17E (also known as IL-25) presented a direct relationship with age ($R^2 = 0.44$, $p = 0.002$). Interleukin 16 was negatively related to pulmonary blood flow ($r_s = -0.34$, $p = 0.018$) and was higher in patients with evidence of advanced vascular disease by intraoperative lung biopsy ($p = 0.021$). Patients in Group 1 received sildenafil in the preoperative period, which resulted in increased pulmonary blood flow ($p = 0.012$) and peripheral oxygen saturation ($p = 0.010$), as well as decreased levels of interleukin 6 ($p = 0.027$) and ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1*) ($p = 0.011$). There was no particular behavior of subjects with Down syndrome at all. **CONCLUSION:** The presented data indicate a relationship between serum levels of some cytokines and the severity of pulmonary vascular disease, with potential pathophysiological and clinical implications. In addition, the involvement of interleukin 17E and MIF emphasizes the role of Th2 immune response, already described in PAH. The results also raise doubts if Down syndrome should be considered as a risk factor in a generalized way.

Descriptors: heart defects, congenital; pulmonary circulation; pulmonary hypertension; Down syndrome; inflammation mediators; cytokines; chemokines; echocardiography; sildenafil citrate.

1. INTRODUÇÃO

As cardiopatias com comunicações entre as câmaras cardíacas ou grandes artérias constituem o grupo mais frequente de anomalias congênitas do coração, além de serem os defeitos cardíacos mais comumente associados com o desenvolvimento de hipertensão arterial pulmonar¹. Quando essas comunicações são amplas, não restritivas, cursam com aumento da pressão e fluxo sanguíneo na circulação pulmonar². Os principais determinantes para a progressão da doença vascular pulmonar são o tipo e o tamanho dos defeitos cardíacos congênitos³. Atualmente, esses pacientes são submetidos precocemente à correção do defeito cardíaco (através da cirurgia cardíaca ou intervenção percutânea), a qual é realizada, na maioria dos casos, com base em procedimentos diagnósticos simples e não invasivos². Para a maioria destes pacientes, o tratamento é seguido por normalização das alterações clínicas e hemodinâmicas presentes no período pré-operatório⁴. Entretanto, a despeito do tratamento precoce, alguns pacientes ainda apresentam complicações no curso pós-operatório imediato ou na evolução em médio e longo prazo (acima de seis meses). Esse pequeno grupo corresponde a menos de 10% dos pacientes pediátricos com defeitos septais congênitos⁵. Até recentemente, admitia-se que a correção precoce (antes dos dois anos de idade) da anomalia cardíaca resultaria, obrigatoriamente, em involução das alterações vasculares pulmonares⁶. Hoje se sabe que tal resultado não pode ser esperado para todos os casos, visto que nem todos os defeitos cardíacos apresentam a mesma propensão para o desenvolvimento de doença vascular pulmonar⁷. Além disso, a resposta da vasculatura pulmonar ao aumento de fluxo sanguíneo e pressão, não é uniforme entre os pacientes e nem sempre ocorre da forma prevista⁸. Entre as síndromes extracardíacas com potencial de

agravo da condição hemodinâmica, destaca-se a síndrome de Down, conhecida por apresentar elevada prevalência de defeitos cardíacos congênitos e, principalmente, por estar associada com a instalação mais precoce de alterações vasculares pulmonares⁹.

A prevalência estimada de cardiopatia congênita é de aproximadamente 6 a 10 para cada 1.000 nascidos vivos, sendo a incidência similar em todos os países e entre as raças^{2,10}. A comunicação interventricular é o defeito cardíaco congênito mais comum, seguido pela comunicação interatrial e pela persistência do canal arterial¹¹. Sabe-se que todas as crianças portadoras de comunicações não restritivas estão sob risco de desenvolver hipertensão arterial pulmonar enquanto doença³. A prevalência desta em pacientes adultos com cardiopatias congênitas varia aproximadamente entre 4 e 28%, a depender do tamanho e localização do defeito cardíaco¹²⁻¹³. Porém, vale ressaltar que, atualmente, cerca de 80% da população mundial vive fora dos países considerados desenvolvidos. Assim sendo, estima-se que apenas 2 a 15% dos pacientes portadores de cardiopatias com grandes comunicações intra ou extra cardíacas receberão o tratamento curativo nestes locais. Este dado contrapõe-se à rara incidência de hipertensão arterial pulmonar associada às cardiopatias congênitas na minoria dos países privilegiados com a possibilidade do diagnóstico e tratamento precoces^{2,14}.

A assim chamada hipertensão arterial pulmonar é definida pela presença de pressão arterial pulmonar média igual ou superior a 25 mmHg em repouso, com pressão de encunhamento igual ou inferior a 15 mmHg e resistência vascular pulmonar (RVP) acima de 3 unidades Wood¹⁴. Essa definição foi bem estabelecida para pacientes adultos, entretanto existem

restrições para a população pediátrica, em especial no contexto das cardiopatias congênitas, onde estes dados não estão ainda padronizados. Na maioria das situações de cardiopatias congênitas com hipertensão arterial pulmonar, esse conceito pode ser utilizado. Em paciente pediátricos, devidos às condições de fluxo em defeitos não restritivos, aliadas ao estado de hidratação e, à capacidade do coração esquerdo em acomodar o retorno venoso pulmonar, em algumas situações pode haver pressão de encunhamento ligeiramente superior a 15 mmHg, sem que isso descaracterize a condição de hipertensão arterial pulmonar¹⁵. Assim sendo, a hipertensão pulmonar associada às cardiopatias congênitas figura no presente momento no primeiro grupo da classificação diagnóstica geral (hipertensão arterial pulmonar), juntamente com outras etiologias como as doenças do tecido conectivo, a infecção pelo vírus HIV, a esquistossomose e o uso de anorexígenos¹⁶.

A maioria dos pacientes pediátricos com defeitos septais cardíacos, não restritivos, apresenta-se com evidências clínicas que sugerem aumento expressivo do fluxo sanguíneo pulmonar (por exemplo, com fluxo pulmonar pelo menos duas a três vezes maior que o sistêmico), com RVP normal ou pouco aumentada (por exemplo, 4 a 5 unidades Wood). Estes pacientes, em geral, apresentam sinais clínicos de insuficiência cardíaca, com congestão pulmonar, dificuldade para ganho ponderal e predisposição à infecções respiratórias de repetição. Em contrapartida, um pequeno número de pacientes (5 a 10% dos casos), apresenta-se com sinais sugestivos de aumento mais expressivo da RVP (por exemplo, acima de 5 a 6 unidades Wood), isto é, com fenômenos congestivos menos evidentes. Nesses indivíduos, o fluxo pulmonar

pode estar apenas discretamente aumentado ou, até mesmo, próximo da normalidade. Esses pacientes apresentam-se sem evidências clínicas de insuficiência cardíaca e congestão pulmonar, com quedas transitórias na saturação periférica de oxigênio e fluxo bidirecional através das comunicações cardíacas¹⁷.

1.1 Alterações vasculares pulmonares e estruturais

Quando não tratadas em momento oportuno (primeiros dias, semanas ou meses de vida), as anomalias cardíacas com defeitos septais evoluem com aparecimento de alterações vasculares pulmonares progressivas. A velocidade de instalação e a gravidade destas lesões vasculares diferem entre as diversas anomalias. Assim sendo, portadores de defeitos não restritivos e complexos estão sob maior risco (**Tabela 1**). Pacientes com comunicações pós-tricuspídeas (como por exemplo comunicação interventricular, janela aortopulmonar, transposição das grandes artérias com comunicação interventricular, defeito do septo atrioventricular forma total e *truncus arteriosus*) costumam apresentar início mais precoce dos sinais e sintomas da síndrome de Eisenmenger, geralmente ainda na infância, quando comparados com indivíduos portadores de comunicações pré-tricuspídeas¹⁸. O risco de desenvolvimento de doença vascular pulmonar costuma variar entre 10 e 17% em pacientes com grandes comunicações interatriais, aproximadamente 50% em pacientes com comunicações interventriculares não restritivas, chegando a até 100% nos pacientes com *truncus arteriosus* não operados^{8,12,19}.

Tabela 1. Risco estimado de evolução para doença vascular pulmonar segundo as diferentes cardiopatias congênitas, quando não corrigidas

Defeito cardíaco congênito	Risco de evolução para doença vascular pulmonar**
Truncus arteriosus	~ 100%
TGA com CIV	~ 100%
Janela aortopulmonar	~ 100%
DSAV (síndrome de Down)	~ 90%
CIV não restritiva	> 50%
CIV restritiva	~ 3%
CIA	~ 10-17%

TGA: transposição de grandes artérias; CIV: comunicação interventricular; DSAV: defeito do septo atrioventricular; CIA: comunicação interatrial

** risco estimado a partir das fontes bibliográficas segundo as referências^{12,19}

As alterações vasculares que ocorrem na hipertensão arterial pulmonar são bem conhecidas e foram particularmente caracterizadas graças a estudos em pacientes portadores de cardiopatias congênitas, por ocasião de autópsias ou biópsias realizadas durante operações cardíacas²⁰. Em estágios avançados da doença, todas as formas de hipertensão arterial pulmonar compartilham aspectos histopatológicos caracterizados pela presença de lesões proliferativas intimais, além de alterações mais avançadas como as lesões plexiformes e dilatadas²¹. Em fases mais precoces, habitualmente em pacientes com idade inferior a dois anos de idade, o remodelamento vascular pulmonar pode ser caracterizado, por exemplo, pelo predomínio da hipertrofia de camada média de pequenas artérias, sem lesões intimais significantes⁴ (**Figura 1A**). Postula-se que este padrão de remodelamento pode ser reversível, se o defeito cardíaco for corrigido²². Esta regra geral apresenta exceções. Um exemplo é o caso de neonatos com transposição de grandes artérias que, sobretudo na presença de comunicação interventricular,

costumam ter alterações vasculares pulmonares mais avançadas já a partir do nascimento, persistindo durante a correção cirúrgica. Ressalta-se ainda a importância de outros fatores pré-natais envolvidos, como a constrição ductal, causada por exemplo, pelo uso de antiinflamatórios não hormonais^{23,24}. Exemplo de alterações vasculares pulmonares graves de apresentação precoce, sugerindo mecanismos distintos daqueles habitualmente propostos (aumento de fluxo pulmonar) pode ser apreciado na **Figura 1B**. Em contrapartida, em um número não conhecido de indivíduos, as lesões pulmonares não evoluem ou o fazem de forma lenta. Daí a necessidade de se conhecer melhor o tipo de remodelamento, seu potencial de evolução ou regressão e os mecanismos envolvidos. O remodelamento vascular pulmonar é bem conhecido sob o ponto de vista estrutural⁴, entretanto estudos sobre os mecanismos biológicos envolvidos ainda são incipientes.

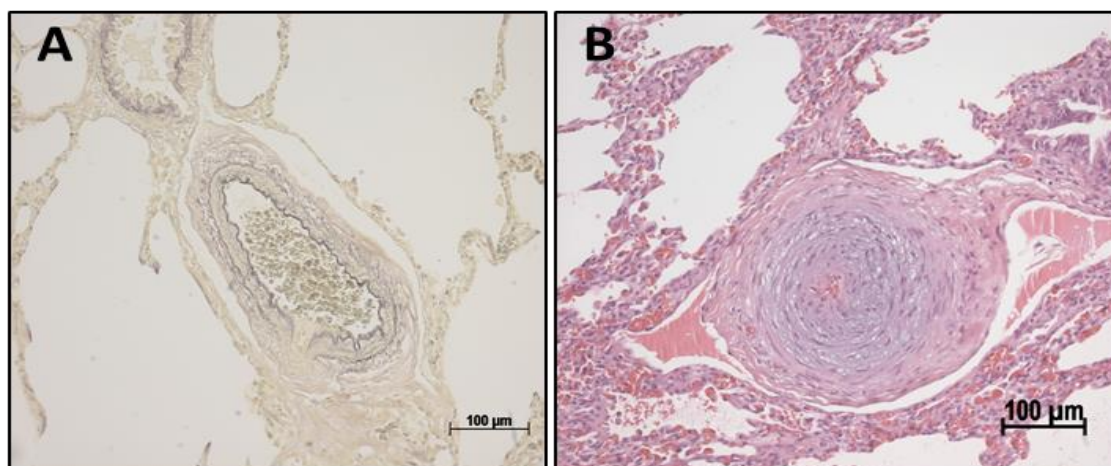


Figura 1. Alterações vasculares pulmonares observadas em cardiopatias congênitas segundo a classificação de Heath-Edwards²⁰: **A)** Fotomicrografia de artérias acompanhando bronquíolos terminais mostrando severa hipertrofia da camada média e ausência de lesões intimais. Coloração pela elastina de Miller, aumento da objetiva = 20x. **B)** Fotomicrografia de artéria pré-acinar com lesão proliferativa oclusiva da íntima, com fibrose. Colorações Hematoxilina-eosina e elastina de Miller, aumento da objetiva = 20x.

1.2 Formas de apresentação clínica e caracterização de padrões hemodinâmicos

Em um dos extremos da condição clínica e hemodinâmica, temos um padrão no qual dados da história e exame físico sugerem aumento de pressão pulmonar, com predomínio de fluxo em relação à resistência vascular. Neste grupo encontramos crianças com quadro clínico de dispneia, dificuldade de ganho ponderal, histórico de infecções respiratórias de repetição e que, habitualmente necessitam de medicações anticongestivas. Esses pacientes são encaminhados com relativa facilidade para o tratamento cirúrgico da cardiopatia. Em contrapartida, existe um outro grupo de pacientes, no qual dados de história e exame físico são sugestivos de aumento de pressão pulmonar com elevação mais significativa da resistência vascular e fluxo não tão aumentado. Esses indivíduos se caracterizam por não apresentarem quadro clínico exuberante de insuficiência cardíaca, cursando com ausência de congestão pulmonar e quedas na saturação periférica de oxigênio, muitos deles não fazendo uso de medicação anticongestiva alguma, suscitando maior discussão quanto ao encaminhamento para cirurgia. Em nossa instituição, a avaliação da gravidade da doença vascular pulmonar e a caracterização dos pacientes nestes dois grupos distintos, tem sido baseada nos seguintes critérios, já descritos na literatura¹⁷: 1) idade acima de 18 meses; 2) presença de síndrome de Down; 3) ausência de congestão pulmonar clínica e radiológica, sugerindo RVP aumentada; 4) "shunt" bidirecional através dos defeitos septais cardíacos; 5) períodos em que a saturação periférica de oxigênio se reduz a níveis abaixo de 90%, na ausência de transtornos

respiratórios, indicando elevação transitória e preocupante da RVP. Em geral, indivíduos com mais de três destas características costumam ser aqueles onde a resistência pulmonar tende a ser mais elevada e o fluxo não tão aumentado. Os pacientes com duas características ou menos costumam se apresentar com aspecto clínico mais sugestivo de predomínio de fluxo em relação à resistência vascular pulmonar.

Os recursos diagnósticos não invasivos e invasivos atualmente disponíveis (história clínica, exame físico, radiografia torácica, eletrocardiograma, ecocardiografia com Doppler colorido e cateterismo cardíaco) auxiliam na caracterização dos subgrupos hemodinâmicos e situações de risco, com possíveis implicações terapêuticas^{25,26}. Embora os padrões acima mencionados sejam definidos classicamente através do cateterismo cardíaco, cresce a evidência de que possam ser estabelecidos de maneira não invasiva²⁷. A ecocardiografia representa um método de imagem essencial na avaliação destes pacientes, pois além de auxiliar a determinação dos detalhes anatômicos, pode fornecer dados de avaliação quantitativa ou semiquantitativa que ajudam na caracterização dos grupos de acordo com os diferentes padrões hemodinâmicos. Enfoque foi dado a parâmetros de avaliação do fluxo pulmonar, como por exemplo, a medida da relação entre fluxo pulmonar e sistêmico (Q_p/Q_s), estimada através de curvas de fluxo obtidas pelo Doppler pulsado e diâmetros medidos nas vias de saída dos ventrículos direito e esquerdo²⁸. Pacientes portadores de defeitos septais intracardíacos não restritivos com Q_p/Q_s igual ou inferior a 2,0 habitualmente requerem uma avaliação mais pormenorizada²⁹. Um outro parâmetro de fluxo utilizado é a medida da integral velocidade-tempo (VTI) estimada pelo Doppler

pulsado com a amostra posicionada próxima à desembocadura da veia pulmonar no átrio esquerdo^{30,31}. A ecocardiografia também permite, em grande parte dos casos, a medida indireta de pressão pulmonar sistólica e média, estimada pelo Doppler através das curvas de regurgitação tricúspide e pulmonar, respectivamente^{32,33}. A possibilidade de caracterização de padrões hemodinâmicos, através de um procedimento não invasivo como a ecocardiografia, permitiria o aprofundamento no estudo de mecanismos fisiopatológicos em grande número de pacientes, ultrapassando aqueles, em menor número, hoje estudados estritamente de forma invasiva.

O cateterismo cardíaco é uma importante ferramenta utilizada para diagnóstico e estratificação de risco em crianças com cardiopatia congênita e hipertensão arterial pulmonar. Os dados obtidos através do cateterismo determinam, ainda hoje, um papel de destaque auxiliando na escolha da melhor opção de tratamento, seja ele cirúrgico ou não, para essas crianças³⁴. Entretanto, consiste em um exame invasivo, realizado na maioria das vezes com a criança em ventilação mecânica e sob anestesia geral, podendo resultar em limitações na obtenção dos dados. A criança, durante o exame, precisa estar em condições absolutamente ideais sob o ponto de vista hemodinâmico, respiratório e metabólico, sendo recomendado sua condução por uma equipe experiente. A anestesia geral pode interferir na performance miocárdica, levando à hipotensão sistêmica e redução também da resistência vascular periférica. Por esse motivo, em pacientes com aumento da resistência vascular pulmonar dinâmico (não fixa), a resistência medida costuma ser caracteristicamente subestimada. Outros exemplos de complicações possíveis estão relacionados à hipoxemia, hipercapnia, acidose, hipotermia e taquicardia,

ocorrendo em 2 a 6% dos indivíduos^{35,36}, sendo que, crianças com idade abaixo de dois anos, apresentam maior risco de complicações³⁷. A obtenção da medida do fluxo sanguíneo em pacientes com defeitos septais cardíacos não pode ser realizada idealmente pela termodiluição, sendo calculada na maior parte dos serviços pelo método de Fick, podendo também ser fonte de erros no cálculo de fluxos e resistências³⁸. Na presença de comunicações cardíacas, o conceito de débito cardíaco não se aplica, sendo que os fluxos pulmonar (Q_p) e sistêmico (Q_s) são determinados em separado. Os níveis fisiológicos de RVP em pacientes pediátricos podem variar, sendo difícil estabelecer valores de corte que possam distinguir entre normalidade e anormalidade. Em condições fisiológicas, a RVP corresponde a menos de 10% da resistência sistêmica. Assim sendo, considerando valores de RVS entre 15 e 20 unidades Wood \times m^2 em idades até dois anos aproximadamente, a RVP deve situar-se ao redor de 2 unidades Wood \times m^2 ou abaixo. Durante o cateterismo, em pacientes não portadores de alterações vasculares pulmonares significantes e sob ação de anestésicos, níveis inferiores a 2 unidades Wood \times m^2 são observados com certa frequência. Existe consenso sobre o fato de que valores de RVP acima de 3 unidades Wood \times m^2 , em lactentes, são oficialmente anormais. Entretanto, níveis entre 3,0 e 5,0 unidades Wood \times m^2 são encontrados em pacientes com aumento expressivo de fluxo sanguíneo pulmonar (por exemplo, relação entre fluxos pulmonar e sistêmico, Q_p/Q_s , acima de 2,5). São interpretados como evento reativo a esta situação hemodinâmica, e considerados como passíveis de normalização, na maioria dos casos, mediante o reparo da lesão cardíaca. Níveis de RVP acima de 6 unidades Wood \times m^2 são vistos como preocupantes em relação à condução pós-operatória dos pacientes. Níveis acima de 8,0-9,0

unidades Wood x m² caracterizam, em primeiro momento, uma situação de impossibilidade de realização do tratamento cirúrgico com segurança. Estes pacientes necessitam abordagem diagnóstica individualizada, eventualmente ações terapêuticas (medicamentosa) pré-operatórias, e rediscussão quanto à melhor estratégia de tratamento.

1.3 Biopatologia das alterações vasculares pulmonares e participação de mecanismos relacionados à inflamação

Frente a injúrias de diferentes naturezas (não estritamente forças físicas relacionadas à distensão e atrito), os vasos pulmonares sofrem alterações, conhecidas como remodelamento. Ao que se sabe, durante esse processo ocorre a participação de elementos inflamatórios, tanto a partir do lado luminal como abluminal (camada adventícia), onde células inflamatórias de natureza diversa tem sido identificadas. Dentre os eventos, merece destaque a liberação local de diversos mediadores como citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e proteases, que concorrem para as alterações estruturais na parede vascular. Inicia-se um processo de aumento de espessura na camada média, com hipertrofia e hiperplasia de suas células, além da deposição de componentes da matriz extracelular. O vaso torna-se então remodelado e reativo. São bem conhecidas as profundas modificações que ocorrem nos mecanismos moleculares de interação entre a matriz extracelular e as células envolvendo receptores de membrana, além de organização de citoesqueleto. Isto leva à exposição de sítios de ligação para fatores de crescimento, culminando com replicação (proliferação) celular³⁹. As

alterações vasculares pulmonares envolvem diversos elementos celulares e moleculares, incluindo modificações no fenótipo de células endoteliais, que podem se tornar resistentes à apoptose e seguir formas não habituais de replicação (por exemplo, crescimento monoclonal)^{40,41}. Também são bem conhecidos os processos de modulação fenotípica, através dos quais células musculares lisas perdem características contráteis e se transformam em células com aspecto mais secretor, com capacidade de replicação^{39,42}.

É importante lembrar que a árvore vascular pulmonar periférica apresenta proximidade com as vias aéreas, que são frequentemente colonizadas por agentes infecciosos, notadamente de natureza viral, em crianças com cardiopatia congênita e hiperfluxo pulmonar⁴³. Processos inflamatórios envolvendo elementos celulares e mediadores moleculares podem, portanto, ser compartilhados entre vias aéreas e terminações vasculares. Sabe-se que células epiteliais infectadas por agentes virais diversos são capazes de expressar e induzir, em células próximas, a produção e liberação de citocinas e fatores de crescimento, com potencial efeito tanto na via aérea como em vasos adjacentes⁴⁴. Estes aspectos reforçam a importância da participação dos mecanismos inflamatórios e imunes na biopatologia da doença vascular pulmonar pediátrica, sobretudo a que cursa em associação a cardiopatias congênitas com alterações hemodinâmicas pulmonares⁴⁵.

Em pacientes pediátricos, correlações têm sido investigadas entre a extensão das alterações vasculares e bioquímicas, e padrões de apresentação clínica e evolutiva. Porém, os estudos geralmente incluem pacientes em ampla faixa etária e com hipertensão arterial pulmonar decorrente de múltiplas etiologias⁴⁶. A literatura é escassa no que diz respeito ao papel dos mediadores

inflamatórios na população de pacientes pediátricos jovens com hipertensão pulmonar, que estão sendo avaliados para o reparo cirúrgico de defeitos cardíacos. Não existem estudos prospectivos envolvendo grande número de mediadores inflamatórios e moléculas relacionadas, investigados de maneira sistemática, em subgrupos segundo a condição clínica e hemodinâmica. Tampouco existem estudos sobre como esses biomarcadores se comportariam frente às intervenções terapêuticas que têm sido empregadas para o controle da hipertensão arterial pulmonar, sobretudo na situação que antecede a cirurgia cardíaca pediátrica. Há razões para se estudar o papel da inflamação e da resposta imune neste grupo específico de pacientes. Evidências mostram que citocinas e mediadores inflamatórios tem sido associados aos fenômenos que ocorrem precocemente na microvasculatura pulmonar, determinando seu remodelamento⁴⁷⁻⁴⁹. O que se pretendeu no presente estudo, foi ampliar o “retrato fenotípico”, em pacientes pediátricos de baixa idade, candidatos ao tratamento cirúrgico dos defeitos septais cardíacos, acrescentando a fatores já conhecidos, como a apresentação clínica, hemodinâmica e histopatológica, elementos de resposta inflamatória presentes em circulação. Em outras palavras, pretendeu-se demonstrar associações entre padrões de apresentação clínica e hemodinâmica, e marcadores bioquímicos presentes no soro. Além de ampliar tal caracterização fenotípica, a descrição desses mediadores de inflamação, presentes em circulação, poderia trazer elementos adicionais para a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos que operam nesta faixa etária específica.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo primário

Avaliar os níveis circulantes de mediadores inflamatórios em pacientes pediátricos candidatos à correção cirúrgica de defeitos septais cardíacos, segundo grupos com padrões hemodinâmicos distintos, definidos a partir de situações de risco para hipertensão pulmonar, a saber: 1) pacientes com dados diagnósticos sugerindo elevação de resistência vascular pulmonar como alteração predominante; 2) pacientes com dados diagnósticos sugerindo predomínio de fluxo sanguíneo pulmonar como alteração predominante.

2.2 Objetivo secundário

Em pacientes caracterizados por aumento de resistência vascular pulmonar como distúrbio predominante, verificar o possível impacto da administração pré-operatória de vasodilatador pulmonar sobre variáveis ecocardiográficas, oximetria e mediadores de inflamação.

3. MÉTODOS

3.1 Desenho do estudo

O estudo foi do tipo prospectivo, de coorte, com componente longitudinal de curto prazo, envolvendo comparações entre grupos. Satisfeitos os critérios de inclusão, os pacientes foram incorporados ao estudo de modo consecutivo. O presente estudo foi desenvolvido de acordo com o princípio “intenção de tratar”.

3.2 Pacientes

Os pacientes do presente estudo tiveram orientação diagnóstica e terapêutica na Unidade de Cardiologia e Cirurgia Cardíaca Pediátrica, do Instituto do Coração, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, entre os anos de 2008 e 2016. O protocolo do estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq (0502/11) e teve o suporte da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) – *grant* nº 2011/09341-0. Este estudo encontra-se registrado no *Clinical Trials* (NCT01548950).

a) Critérios de inclusão

- Faixa etária pediátrica, com idade até 36 meses;
- Cardiopatias congênitas simples, com comunicações não restritivas entre câmaras cardíacas e/ou grandes artérias, candidatos ao reparo cirúrgico dos defeitos;

- Pacientes estáveis hemodinamicamente, com ausência de comorbidades relevantes ou condições com comprometimento de múltiplos órgãos e sistemas;
- Presença de elementos clínicos e de exames subsidiários indicando hipertensão pulmonar de grau pelo menos moderado (critérios especificados adiante);
- Assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, por parte dos pais ou responsáveis.

b) Critérios de não inclusão

- Faixa etária neonatal;
- Cardiopatias com fisiologia univentricular;
- Pacientes com tratamento cirúrgico prévio;
- Presença de síndromes, exceto a síndrome de Down;
- Uso prévio do inibidor de fosfodiesterase 5 (sildenafil) ou outros fármacos usados no tratamento da hipertensão arterial pulmonar;
- Pacientes em vigência de quadro inflamatório sistêmico ou infeccioso, de qualquer natureza.

c) Critérios de exclusão

- Complicações que impedissem o curso diagnóstico e terapêutico em relação à: realização de cateterismo, administração de vasodilatador pulmonar pré-operatório (quando indicado) e/ou realização da cirurgia;

- Pacientes internados em unidade de terapia intensiva (UTI) ou unidades de emergência;
- Qualquer alteração oftalmológica detectada em exame de fundoscopia (obrigatório antes da administração de inibidores da fosfodiesterase 5);
- Situação de contra-indicação, *a priori*, para tratamento cirúrgico: dados clínicos e ecocardiográficos compatíveis com doença vascular pulmonar avançada (“*shunt*” dominante da direita para esquerda).

3.3 Elementos clínicos utilizados para a caracterização inicial dos pacientes nos grupos do estudo

Preenchidos os critérios de inclusão, pacientes com comunicações cardíacas não restritivas e suspeita clínica de apresentarem aumento da pressão pulmonar, foram colocados no estudo de maneira consecutiva. Os elementos citados abaixo foram utilizados para se obter uma impressão inicial a respeito da gravidade da hipertensão pulmonar. Eles também foram empregados para a caracterização dos grupos de pacientes no estudo e estabelecimento da necessidade de diagnóstico invasivo. Foram ainda levados em conta, juntamente com demais dados de avaliação não invasiva e invasiva, na tomada de decisão quanto ao encaminhamento para o tratamento cirúrgico. A alocação dos pacientes em um dos grupos do estudo foi baseada na presença ou ausência dos elementos abaixo relacionados, utilizados em nosso serviço para a caracterização da gravidade da doença vascular pulmonar em crianças portadoras de cardiopatias congênitas, mencionados também em diretrizes já publicadas¹⁷.

1. Idade acima de 18 meses.
2. Presença de síndrome de Down.
3. Ausência de congestão pulmonar clínica e radiológica.
4. Fluxo bidirecional através dos defeitos cardíacos, de acordo com análise ecocardiográfica com Doppler.
5. Períodos em que a saturação periférica de oxigênio se reduz a níveis abaixo de 90%.

Para inclusão como Grupo 1, os indivíduos deveriam apresentar três ou mais dos elementos enumerados acima, sugerindo aumento da RVP. Pacientes assim caracterizados, foram orientados para a complementação diagnóstica através do cateterismo cardíaco. Neste grupo, costumam estar presentes fatores como apresentação clínica mais tardia, sem história de dispneia, ausência de congestão pulmonar e fluxo bidirecional através das comunicações, caracterizando situação de maior risco. Estes pacientes correspondem a menos de 10% das crianças com defeitos septais cardíacos tratadas na Instituição. No Grupo 2, foram incluídos pacientes com até duas das características descritas. Em geral, são crianças dispneicas, com sinais clínicos de congestão pulmonar e déficit de ganho ponderal. Estes pacientes foram considerados como portadores de hipertensão pulmonar sem elevação relevante da RVP, sendo orientados para tratamento corretivo da anomalia cardíaca sem avaliação invasiva.

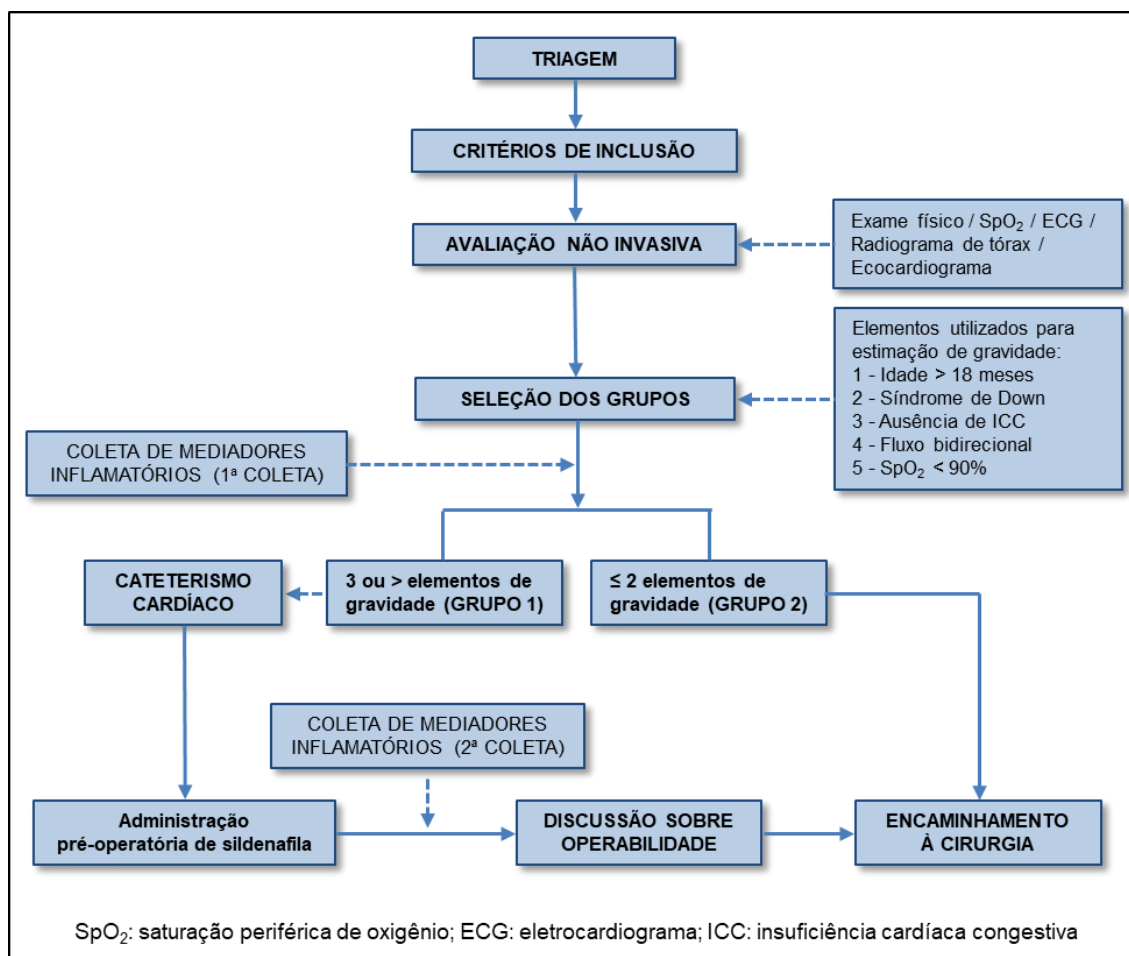
3.4 Tamanho amostral

O número mínimo de pacientes a serem incluídos foi baseado em determinações prévias em nosso laboratório, levando-se em conta concentrações séricas de citocinas a serem diferenciadas segundo os grupos do estudo.

- Diferença padronizada a ser demonstrada: ~ 1,0 desvio padrão
- Nível de significância: 0,05
- Poder: 0,80
- Número de pacientes: 32 (16 indivíduos por grupo, para esta finalidade).

Entretanto, considerando-se a intenção de se avaliar também outras variáveis e associações, houve flexibilização no sentido de se permitir a inclusão de maior número de indivíduos com características de “Grupo 2”, até porque eles são mais prevalentes na rotina da Unidade.

3.5 Fluxograma de avaliação dos pacientes no estudo



3.6 Avaliação clínica

Foram registradas as seguintes informações:

- Idade, gênero, peso, altura, superfície corpórea;
- Diagnóstico principal (anomalia cardíaca, caracterizada essencialmente mediante avaliação clínica e ecocardiográfica);
- Presença ou ausência de síndromes associadas;
- Presença de dados de história e exame físico indicativos de estado congestivo (ou a sua ausência, sugerindo níveis mais elevados de

RVP): déficit ponderal, infecções respiratórias de repetição, dispneia, presença de sulcos de Harrison, precórdio hiperdinâmico e ritmo cardíaco em três tempos;

- História de processos congestivos, infecciosos e inflamatórios de vias aéreas, principalmente quadros virais, pelo menos um mês antes da avaliação clínica;
- Saturação periférica de oxigênio, através de oximetria de pulso, em aferições repetidas em diferentes horários e condições (sono, vigília, decúbito dorsal);
- Radiograma de tórax foi analisado quanto ao tamanho da área cardíaca e padrão de vascularidade pulmonar;
- Direção do fluxo sanguíneo (esquerda para direita, bidirecional ou predominantemente de direita para esquerda) através das comunicações cardíacas ou interarteriais.

3.7 Estimação ecocardiográfica de variáveis hemodinâmicas

A avaliação ecocardiográfica com vistas à elucidação de aspectos anatômicos e funcionais foi realizada levando-se em conta observações publicadas envolvendo pacientes em faixa etária pediátrica, incluindo dados desta Instituição^{27,50-57}. O exame foi realizado usando equipamento ecocardiográfico modelo HDI 5000 (*Phillips Medical System*) e o modelo Vivid E7 (*GE Medical System*), equipados com transdutores de 2,5 MHz e 5 MHz. O exame foi realizado por um mesmo observador, no setor de ecocardiografia do Instituto do Coração.

Na maioria dos casos, foi possível a realização do exame sem sedação; quando indispensável, foi realizada com o uso de hidrato de cloral administrado por via oral, na dose de 50 a 100 mg/kg, conforme rotina do Serviço de Ecocardiografia da Instituição. Esta constitui-se situação de absoluta exceção.

Foram os seguintes os procedimentos na análise ecocardiográfica:

- Descrição completa das anormalidades anatômicas cardiovasculares de acordo com análise sequencial segmentar;
- Verificação da dimensão das comunicações intercavitárias e direção do fluxo sanguíneo (de esquerda para direita, bidirecional ou predominantemente de direita para esquerda);
- Estimação de pressões em território pulmonar: pressão sistólica de artéria pulmonar (PSAP), estimada através da regurgitação tricúspide e/ou a pressão média de artéria pulmonar (PMAP), através da regurgitação pulmonar^{32,33,57};
- Gradiente pressórico entre cavidades cardíacas ou grandes artérias⁵⁸;
- Parâmetros de fluxo (ecocardiografia com Doppler) em via de saída do ventrículo direito, esquerdo e em veias pulmonares – determinação da “integral velocidade-tempo” – VTI^{27,31};
- Estimação da razão entre a magnitude do fluxo sanguíneo pulmonar e do sistêmico – Qp/Qs²⁸;

A primeira avaliação ecocardiográfica foi realizada em duas condições, sendo os dados obtidos sempre pelo mesmo examinador. Após o registro de dados na “condição basal”, oxigênio foi administrado através de cateter nasal, assegurando-se concentração no ar inspirado ao redor de 40%. Transcorridos dez minutos sob uso de oxigênio, os dados quantitativos mencionados acima foram novamente registrados com a “segunda condição”.

3.8 Cateterismo cardíaco

O cateterismo pré-operatório, em nossa Instituição, e de acordo com consensos internacionais^{34-38,59}, é indicado como complementação indispensável da avaliação diagnóstica para pacientes caracterizados como Grupo 1. O cateterismo é realizado sob anestesia geral e intubação orotraqueal com suporte ventilatório, mantendo-se as condições metabólicas respiratórias e hemodinâmicas o mais próximo possível das fisiológicas. O exame é realizado em duas condições, a saber, primeira sob uso de oxigênio em concentração correspondente ao ar ambiente (21%) e a segunda com teste de vasorreatividade pulmonar (óxido nítrico inalado, na concentração de 40 ppm por dez minutos). Em cada uma das condições, foram computados os seguintes dados:

- Pressões em câmaras cardíacas direitas e esquerdas, circulação pulmonar e sistêmica;
- Fluxo sanguíneo pulmonar e sistêmico determinados pelo método de Fick indireto e indexados para a superfície corpórea (Q_{pi} e Q_{si});

- Resistência vascular pulmonar e sistêmica indexadas para a superfície corpórea (RV_{Pi} e RV_{Si});
- Razão entre os fluxos pulmonar e sistêmico (Q_p/Q_s);
- Razão entre resistências vasculares pulmonar e sistêmica (RVP/RVS).

3.9 Tratamento medicamentoso pré-operatório e medidas de segurança

Conforme intenção prévia registrada em *Clinical Trials* (NCT01548950), todos os pacientes do Grupo 1, após o cateterismo cardíaco, e anteriormente à decisão final quanto ao encaminhamento à cirurgia, passaram a fazer uso de inibidores de fosfodiesterase 5 (sildenafil) por via oral. A administração foi iniciada após avaliação oftalmológica (fundoscopia) recomendada a pacientes candidatos a este tipo de tratamento. A sildenafil foi administrada na dose inicial de 1 mg/kg/dia, quatro tomadas diárias, em intervalos de seis horas, até uma dose máxima de 5 mg/kg/dia. Foram realizados aumentos na dose diária, a partir da dose inicial, até a verificação de uma das seguintes situações:

1. Obtenção de efeito (vasodilatação pulmonar), sendo desnecessários aumentos posteriores;
2. Redução da pressão sistêmica de 10% em relação ao nível inicial, indicando necessidade de diminuição da dose;
3. Aparecimento de outros efeitos sistêmicos adversos ou indesejáveis, requerendo suspensão da medicação.

O aumento das doses diárias foi realizado como segue. Até a dose de 3 mg/kg/dia, aproximadamente a cada 72 horas. A partir desta dose, com intervalos de pelo menos uma semana para a verificação de possível resposta. Atingida a dose máxima possível para um determinado caso sem efeito aparente, foi observado período de aproximadamente oito semanas para a caracterização de ausência de resposta. A caracterização de resposta ao tratamento medicamentoso foi verificada por observação clínica, medidas oximétricas e ecocardiográficas:

1. Aumento do grau de congestão pulmonar (dispneia e sinais radiográficos), corroborado pela necessidade de medicação diurética ou seu incremento;
2. Elevação da saturação periférica de oxigênio;
3. Aumento em variáveis ecocardiográficas relacionadas com o fluxo pulmonar: VTI aferido em veias pulmonares e razão Qp/Qs.

3.10 Determinações laboratoriais

Coletas visando à determinação de mediadores de inflamação foram realizadas em todos os pacientes na situação basal, previamente ao tratamento operatório. Em pacientes caracterizados como “Grupo 1”, uma segunda amostra foi obtida ao ser atingida estabilidade com a dose máxima de sildenafil. A obtenção desta amostra foi, portanto, também prévia ao tratamento cirúrgico.

Sangue venoso periférico (5 mL) foi coletado, sendo obtidas alíquotas de soro, que foram estocadas a -80°C até utilização. As

determinações foram feitas com uso de “kit” comercial (*Proteome Profiler – Human Cytokine Array Panel A*) de procedência R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA. Todas as amostras foram processadas em duplicatas. Para cada citocina (representadas no **Quadro 1**), a média das intensidades dos sinais de quimioluminescência (duplicata) foi normalizada levando-se em conta padrões internos do ensaio, sendo então expressa como resultado final (densidade de “pixels”). A **Figura 2** mostra uma análise representativa de algumas citocinas e moléculas relacionadas, identificadas por quimioluminescência. Mediante consentimento, amostras de sangue venoso periférico foram também obtidas de indivíduos saudáveis na faixa etária pediátrica, em idade tão próxima quanto possível à dos pacientes, tendo sido submetidas aos mesmos procedimentos laboratoriais, os resultados (mediadores inflamatórios) são apresentados como grupo controle.

Quadro 1. Quadro indicativo das proteínas incluídas no presente estudo

C5/C5a	IL-1 β	IL-13	MCP-1
sCD40 Ligand	IL-1ra	IL-16	MIF
G-CSF	IL-2	IL-17	MIP-1 α
GM-CSF	IL-4	IL-17E	MIP-1 β
GRO α	IL-5	IL-23	Serpin E1
I-309	IL-6	IL-27	RANTES
sICAM-1	IL-8	IL-32 α	SDF-1
IFN- γ	IL-10	IP-10	TNF- α
IL-1 α	IL-12p70	I-TAC	sTREM-1

Abreviaturas: com exceção das “IL” (interleucinas), as citocinas envolvidas no estudo são apresentadas conforme a denominação em língua inglesa.

C5/C5a: *Complement component 5/5a*; sCD40L: *Soluble CD40 ligand*; G-CSF: *Granulocyte-colony stimulating factor*; GM-CSF: *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*; GRO α : *Growth-related oncogene alpha*; I-309: *Human CC chemokine I-309*; sICAM-1: *Soluble intercellular adhesion molecule 1*; IFN- γ : *Interferon gamma*; IP-10: *Interferon gamma-induced protein 10*; I-TAC: *Interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant*; MCP-1: *Monocyte chemoattractant protein-1*; MIF: *Macrophage migration inhibitory factor*; MIP-1 α : *Macrophage inflammatory protein 1 alpha*; MIP-1 β : *Macrophage inflammatory protein 1 beta*; Serpin E1: *Serine protease inhibitor E1*; RANTES: *Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*; SDF-1: *Stromal cell-derived factor 1*; TNF- α : *Tumor necrosis factor alpha*; sTREM-1: *Soluble triggering receptor expressed on myeloid cells 1*.

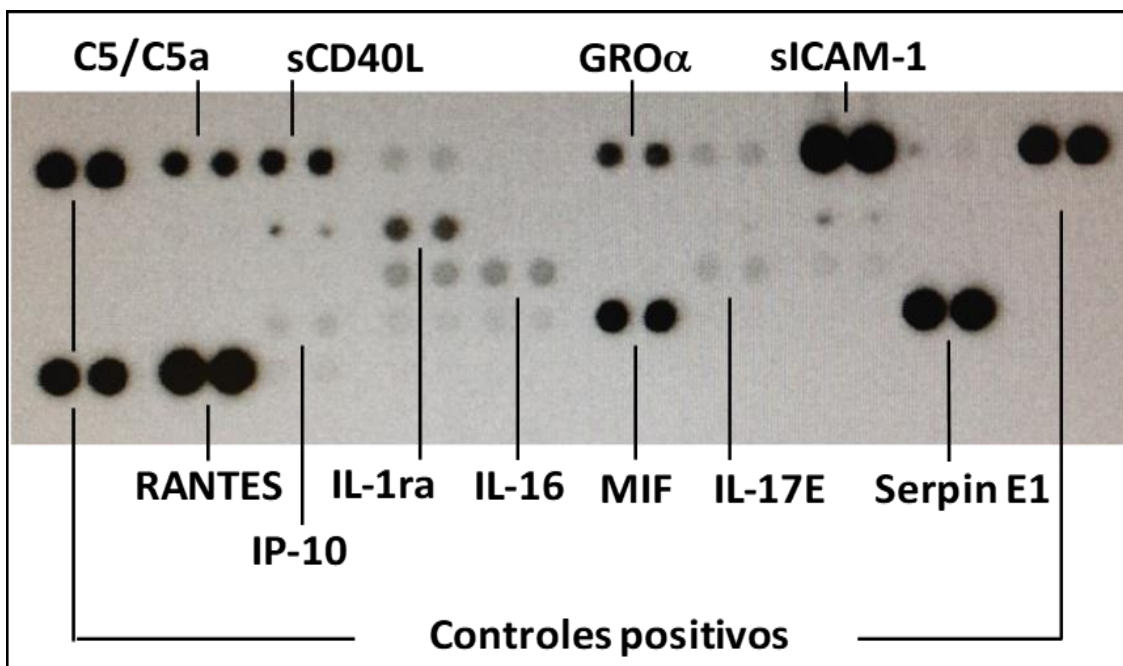


Figura 2. “Dot blot” representando a análise de citocinas séricas e moléculas relacionadas com uso de anticorpos específicos e identificação por quimioluminescência. Estão representadas, em duplicada, 11 das proteínas analisadas no estudo. Nas extremidades direita e esquerda, controles (padrões) positivos do ensaio. O nível de saturação observado na figura é diferente daquele empregado para análise das proteínas. Abreviaturas: C5/C5a: *Complement component 5/5a*; sCD40L: *Soluble CD40 ligand*; GRO α : *Growth-related oncogene alpha*; sICAM-1: *Soluble intercellular adhesion molecule 1*; RANTES: *Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*; IP-10: *Interferon gamma-induced protein 10*; IL-1ra: *interleukin-1 receptor antagonist*; IL-16: *interleucina 16*; MIF: *Macrophage migration inhibitory fator*; IL-17E: *interleucina 17E*; SerpinE1: *Serine protease inhibitor E1*.

3.11 Procedimentos intra-operatórios

Avaliação da dificuldade na saída de circulação extracorpórea (CEC):

- Administração de óxido nítrico inalado na saída de CEC, sempre que necessário.

Biópsia pulmonar intra-operatória:

- Coleta com pulmão insuflado;
- Fixação por 24 horas em formalina;
- Processamento histológico de rotina;
- Coloração com Hematoxilina-eosina e método de Miller para fibras elásticas;
- Gradação das alterações vasculares segundo a classificação proposta por Heath e Edwards para cardiopatias congênicas²⁰.

3.12 Evolução pós-operatória imediata

Dados deste período foram coletados e analisados para ambos os grupos 1 e 2, incluindo eventos relacionados aos transtornos da circulação pulmonar. Registros foram feitos das seguintes variáveis obtidas no período de pós-operatório: a) instabilidade vascular pulmonar (queda na saturação periférica de oxigênio e eventual instabilidade hemodinâmica); b) uso de óxido nítrico; c) uso de sildenafil; d) óbito.

A sildenafil foi readministrada, por via enteral, a partir da quarta hora após o término da circulação extracorpórea. A dose utilizada no pós-

operatório, na maioria dos casos, foi de 1 a 2 mg/kg/dia, ajustada para as condições de cada paciente e em associação com a medicação anticongestiva, quando necessária. Esta rotina foi padronizada para todos os pacientes do Grupo 1. Os pacientes do Grupo 2 utilizaram a sildenafil somente quando considerado necessário diante de sua evolução clínica. O uso do óxido nítrico não foi estabelecido como rotina. O uso tanto no centro cirúrgico, quanto na unidade de terapia intensiva, ficou a critério da equipe responsável ou foi relacionado à ocorrência de períodos de instabilidade circulatória e oximétrica.

3.13 Procedimentos estatísticos

Os resultados referentes a variáveis categóricas são apresentados como número absoluto, porcentagem e proporção. As variáveis numéricas foram testadas em relação à aderência à distribuição normal. A maior parte dos resultados é apresentada como mediana e percentis 25 e 75. Em algumas situações, variáveis com distribuição aceita como normal são apresentadas como média e erro padrão. Comparações envolvendo diferentes grupos foram feitas com uso do teste de Mann-Whitney, teste Qui-Quadrado ou razão de verossimilhança. Diferenças envolvendo mais de dois grupos foram testadas mediante análise de variância, ou na eventualidade de existência de covariáveis relevantes, análise de covariância. Em ambas as situações, os resultados apresentados correspondem a testes *post hoc* para comparações múltiplas. Correlações, no estudo, foram testadas mediante obtenção do coeficiente de correlação de Pearson ou coeficiente de correlação de Spearman. As análises de regressão foram efetuadas mediante obtenção do

coeficiente de determinação (R^2). As diferenças entre situações distintas envolvendo o mesmo indivíduo foram testadas com uso do teste “t” de Student (para observações emparelhadas) ou do teste de Wilcoxon. Em todos os procedimentos, adotou-se 0,05 como nível de significância.

4. RESULTADOS

4.1 Dados descritivos dos pacientes e grupos do estudo

4.1.1 Análise geral dos pacientes

Foram incluídos no estudo 47 pacientes com idade de dois a 37 meses (mediana, 10 meses). A proporção entre gêneros foi 18:29 (masculino:feminino), e entre portadores e não portadores da síndrome de Down, 32:15, respectivamente. A saturação periférica de oxigênio foi de 86% a 99% (mediana, 96%). Todos eram portadores de comunicações intra ou extra cardíacas consideradas não restritivas, com razão entre os fluxos pulmonar e sistêmico (Q_p/Q_s , obtido pela ecocardiografia) de 0,7 a 5,9 (mediana, 2,5). A pressão média em artéria pulmonar também estimada por ecocardiografia transtorácica (realizada aferição com curvas de amplitude adequadas em 22 pacientes) foi de 26 a 70 mmHg (mediana, 43 mmHg).

Controles pediátricos sadios ($n=13$) foram incluídos no estudo visando exclusivamente à análise dos mediadores de inflamação. Estes indivíduos tiveram idade de 10,3 a 38,4 meses (mediana e percentís 25-75, 23,4 (14,6-28,3) meses). A proporção entre gêneros masculino e feminino foi de 2:11. Cinco deles eram portadores de síndrome de Down, sem qualquer cardiopatia.

4.1.2 Análise dos pacientes de acordo com os grupos no estudo

Em conformidade com os critérios previamente estabelecidos, 16 e 31 pacientes foram classificados como Grupo 1 e Grupo 2, respectivamente. Os dados demográficos, diagnósticos e funcionais correspondentes a ambos

os grupos encontram-se dispostos na **Tabela 2**. Os grupos não diferiram em relação aos gêneros, aos tipos de anomalias cardíacas (defeitos pré e pós-tricuspídeos, defeito septal atrioventricular e anomalias conotruncais), nem em termos de proporção de indivíduos com síndrome de Down.

Pacientes do Grupo 1 apresentaram idade superior em relação ao Grupo 2 ($p=0,009$) e menor nível de saturação periférica de oxigênio ($p=0,011$). Observou-se também, neste grupo, fluxo pulmonar reduzido em relação ao Grupo 2 (32% abaixo pela razão Q_p/Q_s , $p=0,008$). Ainda em relação à análise ecocardiográfica, a avaliação do fluxo venoso pulmonar através da integral da velocidade-tempo (VTI) mostrou valores mais baixos no Grupo 1, no limite de significância estatística ($p=0,059$) e pressão arterial pulmonar média ligeiramente superior, sendo a diferença não significativa ($p=0,338$). Indivíduos portadores da síndrome de Down (ambos os grupos) apresentaram valores para a variável Q_p/Q_s ligeiramente inferiores comparativamente aos não sindrômicos (respectivamente, 2,40 (1,70-2,88) e 2,60 (2,13-4,23), sendo a diferença não significativa ($p=0,115$). Em relação à variável VTI_{vp}, os valores, respectivamente, foram 22,1 cm (19,1-25,0) e 22,5 cm (19,0-25,3) ($p=0,632$). Como já explicitado anteriormente, apenas os pacientes do Grupo 1 foram submetidos ao cateterismo cardíaco. A pressão arterial pulmonar média obtida por esse método também se mostrou elevada, com mediana de 52 mmHg (43-66 mmHg), e a razão Q_p/Q_s semelhante ao encontrado pela ecocardiografia, com mediana de 1,7 (1,2-2,6). Corroborando os dados anteriores que permitiram a caracterização como Grupo 1, a RVP apresentou níveis elevados, com mediana de 5,2 unidades Wood x m² (4,2-8,9 U x m²).

Tabela 2. Apresentação de dados demográficos, diagnósticos e funcionais de acordo com os grupos do estudo: Grupo 1, hiper-resistência, e Grupo 2, hiperfluxo pulmonar com congestão.

Variáveis	Grupo 1 (n=16)	Grupo 2 (n=31)	Valor p
Idade (meses)	13,5 (9,1 – 29,7)	8,5 (5,1 – 12,2)	0,009(*)
Gênero (masculino:feminino)	5:11	13:18	0,691(†)
Síndrome de Down, n (%)	11 (69)	21 (68)	0,999(†)
Peso (Kg)	6,45 (5,40 – 10,40)	6,10 (4,70 – 7,10)	0,141(*)
Saturação periférica de oxigênio (%)	93 (89 – 96)	96 (95 – 98)	0,011(*)
Diagnóstico			
A - defeitos pré-tricuspídeos	1 (6%)	1 (3%)	0,451(‡)
B - defeitos pós-tricuspídeos	7 (44%)	17 (55%)	
C - defeito septal AV	7 (44%)	13 (42%)	
D - anomalias conotruncais	1 (6%)	0 (0%)	
Ecocardiografia			
Pressão arterial pulmonar média (mmHg) (§)	43 (40 – 54)	41 (31 – 52)	0,338(*)
Razão fluxo sanguíneo pulmonar / fluxo sistêmico	1,9 (1,3 – 2,6)	2,8 (2,3 – 3,3)	0,008(*)
Integral velocidade-tempo do fluxo em veias pulmonares (cm)	21,4 (15,9 – 23,3)	22,6 (20,2 – 26,0)	0,059(*)
Cateterismo cardíaco			
Pressão arterial pulmonar média (mmHg)	52 (43 – 66)		
Pressão arterial sistêmica média (mmHg)	63 (56 – 73)		
Índice de fluxo sanguíneo pulmonar (L/min/m ²)	6,6 (4,8 – 7,7)		
Razão fluxo sanguíneo pulmonar / fluxo sistêmico	1,7 (1,2 – 2,6)		
Índice de resistência vascular pulmonar (U x m ²)	5,2 (4,2 – 8,9)		
Razão resistência vascular pulmonar / resistência sistêmica	0,42 (0,28 – 0,65)		

Resultados das variáveis numéricas expressos em mediana e percentís 25 e 75.

(*) Teste de Mann-Whitney

(†) Teste Qui-Quadrado

(‡) Razão de verossimilhança

(§) Obtida em 10 pacientes do Grupo 1 e 12 indivíduos do Grupo 2.

Categorias diagnósticas: A, comunicações pré-tricuspídeas; B, comunicações pós-tricuspídeas eventualmente associadas a pré-tricuspídeas, exceto defeito septal atrioventricular; C, defeito septal atrioventricular; D, anomalias conotruncais.

4.2 Análise inferencial

4.2.1 Mediadores de inflamação em todos os pacientes, sem distinção de grupos, em relação a fatores de gravidade da hipertensão pulmonar

Trinta e seis proteínas foram analisadas por teste imunoenzimático, com coeficientes de variação intra e inter-ensaios de 3,7% e 2,0% respectivamente. Resultados relevantes, com implicações em relação a variáveis clínicas, hemodinâmicas e histológicas foram obtidos para 15 proteínas. Resultados relativos a 19 substâncias não mostraram associações com tais variáveis. Sinais foram considerados inferiores ao nível mínimo de detecção para as interleucinas 27 e 32 α .

Quando os pacientes foram analisados como um todo (n=47), houve associações significantes entre mediadores inflamatórios e a idade, assim como variáveis ecocardiográficas relacionadas à magnitude do fluxo sanguíneo pulmonar. Estas associações encontram-se demonstradas na **Tabela 3**. Através da análise da tabela, constata-se que à exceção de IL-10, todas as correlações envolvendo fluxo pulmonar foram negativas. Em outras palavras, nas associações significantes, o nível sérico das proteínas foi inversamente relacionado ao fluxo pulmonar. Não foram feitas tentativas de se examinar correlações entre todas estas proteínas e variáveis do cateterismo cardíaco, em vista do número relativamente pequeno de pacientes cateterizados frente à dispersão dos valores para alguns marcadores. Preferiu-se, neste caso, investigar possíveis associações com o uso de medidas ecocardiográficas, disponíveis em todos os casos. Algumas correlações mostraram-se relevantes sob o ponto de vista fisiopatológico, como a relação negativa da quimiocina

SDF-1 com a variável VTI (fluxo) aferida em veias pulmonares ($r_s = -0,41$, $p = 0,004$). O papel de SDF-1 no remodelamento vascular já é bem estabelecido⁶⁰.

A relação inversa entre o nível sérico de IL-16 e a magnitude do fluxo em veias pulmonares (variável VTI), demonstrada na **Tabela 3**, encontra-se pormenorizada na **Figura 3**. Em ambos os gráficos da figura, os 13 pacientes submetidos à biópsia pulmonar durante a operação cardíaca, estão identificados segundo o grau das alterações vasculares observadas. Na **Figura 3-A**, observa-se que praticamente não houve dados de biópsia disponíveis para análise em pacientes com fluxo pulmonar aumentado (por exemplo, VTI_{VP} acima de 25 cm), o que de certa forma, limita a visibilização das relações entre IL-16, VTI_{VP} e grau de alterações histológicas. Isto se deve ao fato de que a maioria dos pacientes submetidos à biópsia pulmonar pertencia ao Grupo 1, com fluxo pulmonar restrito. Por outro lado, a **Figura 3-B** mostra, para o reduzido número de 13 pacientes biopsiados, resultados quanto a determinação da interleucina-16, um fator de quimiotaxia para linfócitos⁶¹, apresentando níveis superiores nos pacientes com lesões vasculares pulmonares consideradas mais avançadas.

Tabela 3. Níveis séricos de mediadores de inflamação em relação à idade e a variáveis ecocardiográficas que refletem a magnitude do fluxo sanguíneo pulmonar

	Idade	Qp/Qs	VTI _{VP}
GRO α	<u>r_s = -0,47</u> <u>p = < 0,001</u>	r _s = 0,26 p = 0,081	r _s = 0,04 p = 0,772
I-309	r _s = 0,17 p = 0,245	r _s = -0,12 p = 0,432	<u>r_s = -0,29</u> <u>p = 0,048</u>
IFN- γ	r _s = 0,16 p = 0,270	<u>r_s = -0,33</u> <u>p = 0,027</u>	r _s = -0,24 p = 0,098
IL-16	r _s = 0,11 p = 0,464	r _s = -0,14 p = 0,350	<u>r_s = -0,34</u> <u>p = 0,018</u>
IL-13	<u>r = 0,33</u> <u>p = 0,022</u>	r = 0,17 p = 0,261	r = 0,19 p = 0,210
IL-23	r _s = 0,11 p = 0,476	<u>r_s = -0,37</u> <u>p = 0,011</u>	r _s = -0,23 p = 0,111
IL-17E	<u>r_s = 0,44</u> <u>p = 0,002</u>	r _s = -0,10 p = 0,518	r _s = -0,11 p = 0,474
IL-10	r _s = -0,12 p = 0,413	<u>r_s = 0,35</u> <u>p = 0,018</u>	r _s = -0,18 p = 0,234
MIP-1 β	r _s = -0,09 p = 0,538	r _s = -0,18 p = 0,224	<u>r_s = -0,29</u> <u>p = 0,049</u>
SDF-1	r _s = 0,16 p = 0,270	r _s = 0,04 p = 0,783	<u>r_s = -0,41</u> <u>p = 0,004</u>
sTREM-1	r _s = 0,22 p = 0,137	r _s = -0,17 p = 0,262	<u>r_s = -0,35</u> <u>p = 0,015</u>

Correlações analisadas em 47 pacientes com uso do coeficiente de Pearson (r) ou coeficiente de Spearman (r_s). Destacadas estão as correlações significantes.

Qp/Qs: razão fluxo sanguíneo pulmonar / fluxo sistêmico.

VTI_{VP}: integral velocidade-tempo relacionada ao fluxo sanguíneo em veias pulmonares.

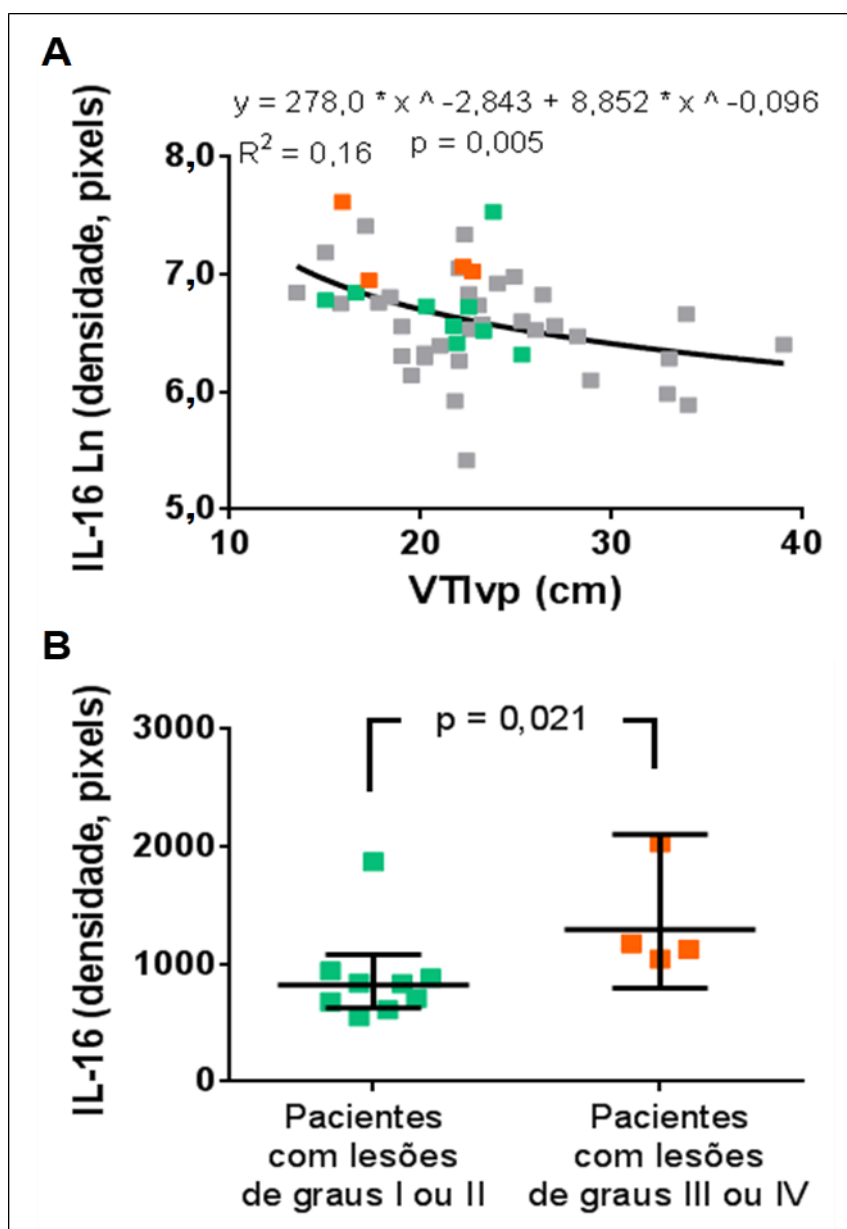


Figura 3. Relação da interleucina 16 (IL-16) sérica com dados ecocardiográficos e de biópsia pulmonar. **A:** No grupo de pacientes como um todo ($n=47$), observa-se relação inversa entre a concentração de IL-16 e a variável VTI_{VP} , representando a magnitude do fluxo em veias pulmonares (integral velocidade-tempo). **B:** Níveis de IL-16 segundo a gravidade das lesões vasculares pulmonares (classificação proposta por Heath-Edwards, 1958), em 13 pacientes nos quais foi possível a realização da biópsia pulmonar. Em A e B, a identificação dos 13 pacientes, por cores, segue o mesmo padrão. Em B, os resultados são expressos como média geométrica e intervalo de confiança (I.C. 95%) da mesma, sendo a diferença avaliada pelo teste de Mann-Whitney.

Pormenores em relação à associação entre idade e níveis circulantes de IL-17E e das quimiocinas GRO α e MIF são apresentados na **Figura 4**. No estudo, a idade foi considerada como um índice de potencial gravidade em termos de vasculopatia pulmonar, conforme demonstrado e reconhecido em publicações anteriores^{22,26}. Níveis elevados de GRO α foram observados em pacientes de ambos os grupos nos primeiros meses de vida, com subsequente declínio exponencial (**Figura 4-A**). Ressalva feita ao fato de não haver controles com idade inferior a 10 meses, tal relação não foi observada, neste grupo, com significância estatística (**Figura 4-B**). A quimiocina GRO α tem envolvimento central na angiogênese induzida por trombina em tumores, sendo inicialmente relacionada a crescimento tumoral em melanoma^{39,65}. Os gráficos correspondentes à **Figura 4-C** e **4-D** mostram a relação inversa entre a idade e os níveis da quimiocina MIF. Observou-se que tal relação foi significativa apenas em pacientes do Grupo 1, não tendo sido verificada no Grupo 2 nem nos controles. A quimiocina MIF tem sido relacionada ao crescimento de células musculares lisas vasculares no pulmão⁴⁹, um fenótipo frequentemente observado em lactentes com hipertensão pulmonar nos primeiros meses de vida. A **Figura 4-E** mostra a relação direta entre idade e níveis séricos de IL-17E, significativa para o Grupo 1 e limítrofe para o Grupo 2. Semelhantemente ao que foi dito para GRO α e MIF, tal relação com a idade não foi observada no grupo controle (**Figura 4-F**).

As relações diretas entre idade, resistência vascular pulmonar e níveis circulantes de IL-17E também podem ser observadas através dos gráficos expostos na **Figura 5**, onde encontram-se representados apenas os

pacientes do Grupo 1, para os quais dados de cateterismo cardíaco estavam disponíveis. A IL-17E, também designada por IL-25, é uma citocina relacionada a resposta imune do tipo Th2, e não Th17 como se poderia imaginar⁶². Seu possível envolvimento na hipertensão pulmonar pode então ser cogitado, de maneira especulativa, a partir da participação de mecanismos de resposta Th2 claramente demonstrados em remodelamento vascular induzido em modelos animais⁴⁷.

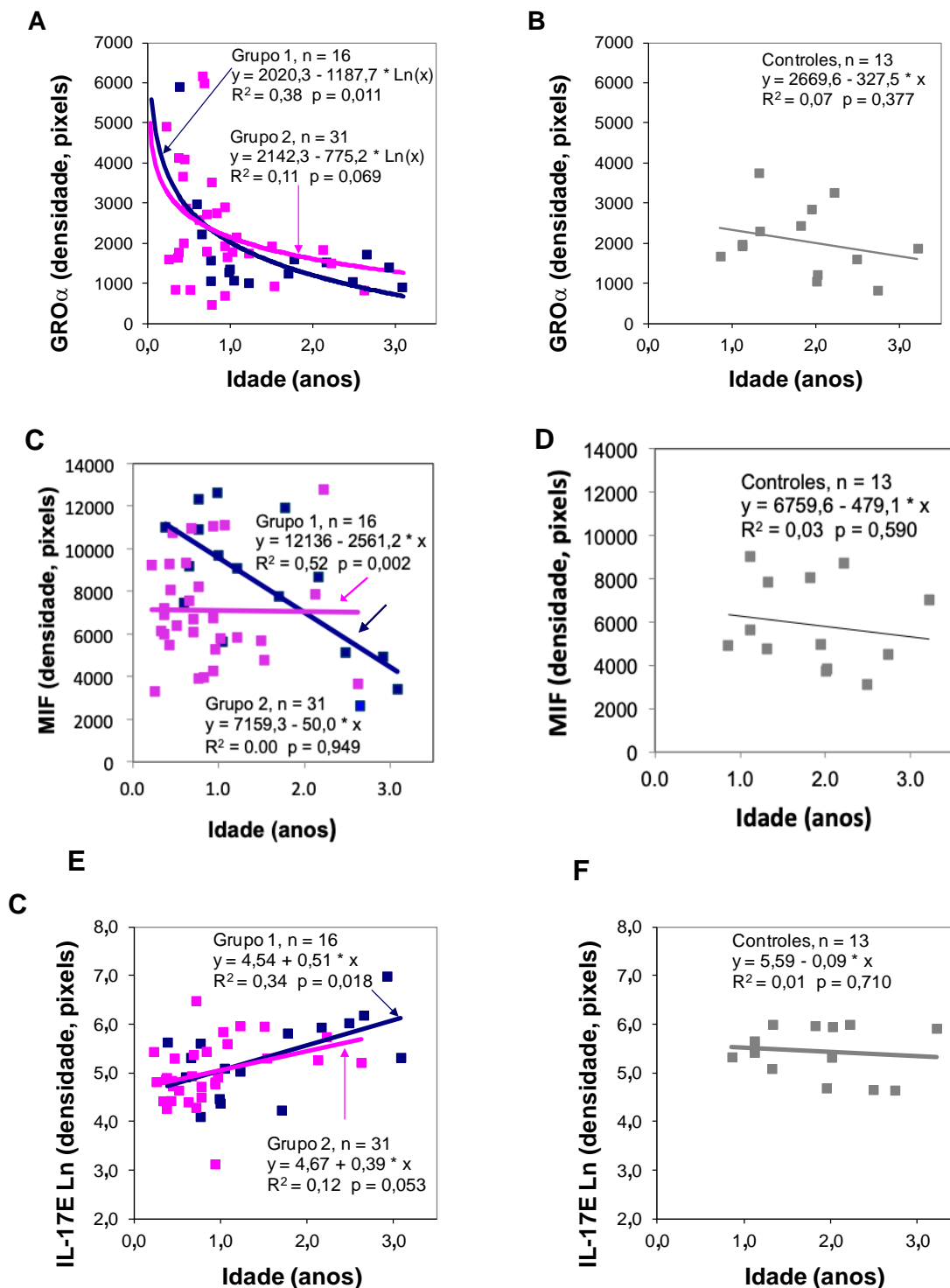


Figura 4. Níveis séricos das quimiocina GRO α e MIF, e da interleucina 17E (IL-17E) em função da idade. Em **A**, **C** e **E** estão representados pacientes segundo os grupos considerados no estudo. Em **B**, **D** e **F** estão os controles pediátricos. A idade influenciou de maneira direta o nível de IL-17E em ambos os grupos e de maneira inversa a concentração de GRO α . Houve ainda relação inversa significativa entre a idade e o nível sérico da quimiocina MIF, mas apenas nos indivíduos do Grupo 1. A concentração de IL-17E foi analisada após transformação logarítmica (Ln).

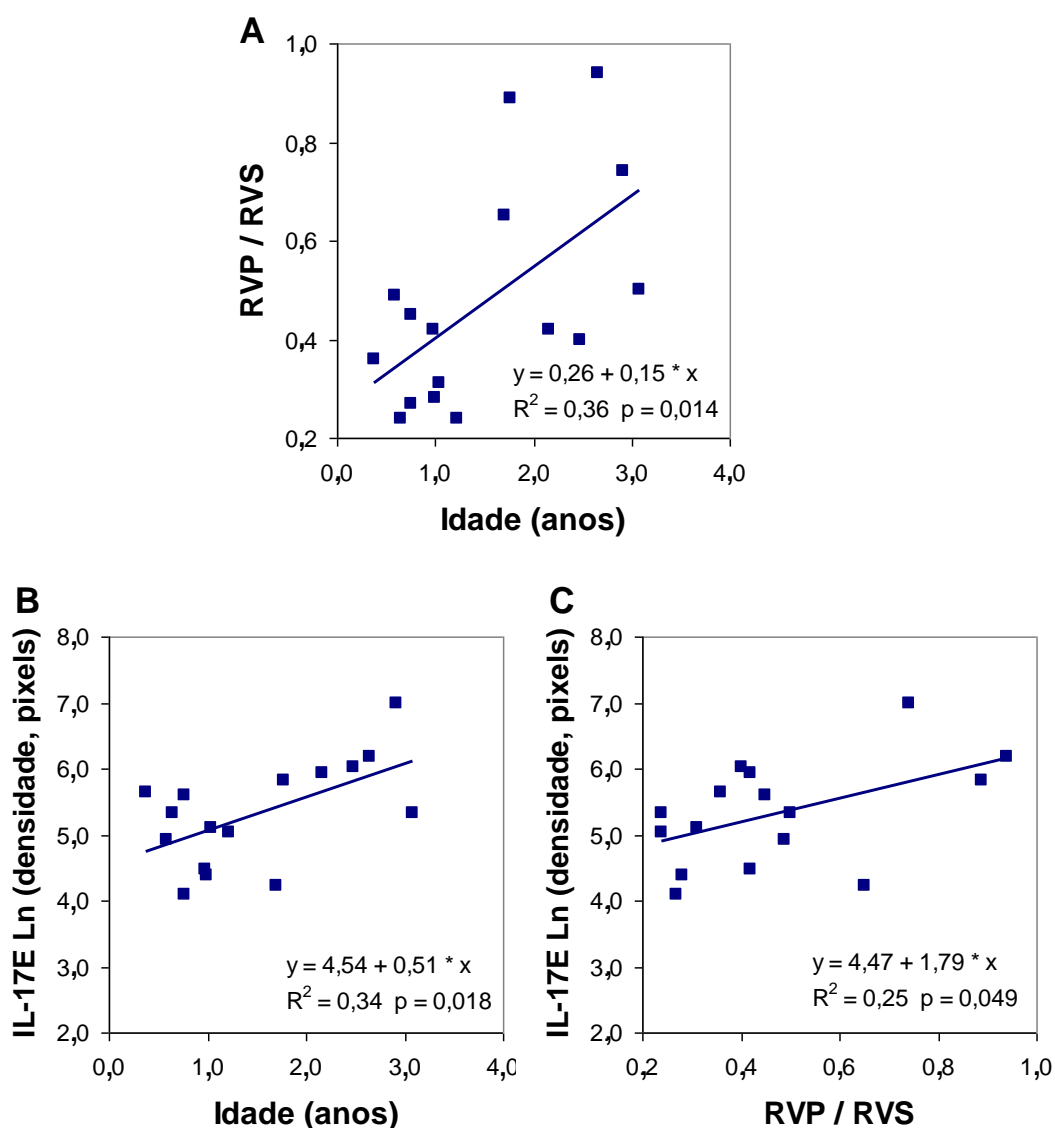


Figura 5. Interleucina 17E (IL-17E) sérica em função de variáveis relacionadas à gravidade das alterações vasculares pulmonares. A análise foi feita em 16 pacientes do Grupo 1, que foram submetidas a cateterismo cardíaco. Em **A**, influência da idade sobre a resistência vascular pulmonar, expressa como razão em relação à resistência sistêmica (RVP/RVS). Em **B** e **C**, influência direta da idade e da resistência vascular pulmonar sobre a concentração de IL-17E. O nível de IL-17E foi analisado após transformação logarítmica (Ln).

4.2.2 Mediadores de inflamação segundo os grupos clínicos considerados no estudo

Com relação aos níveis séricos de mediadores inflamatórios comparativamente nos grupos de risco considerados no estudo, duas quimiocinas apareceram com destaque, a saber, MIF e RANTES. Enquanto os níveis de MIF predominaram no Grupo 1, RANTES apresentou-se com maior concentração no Grupo 2 (**Figura 6, A e B**, respectivamente). A diferença entre os grupos com relação à concentração da proteína MIF está também ilustrada na **Figura 7**. Observação curiosa foi a relação inversa entre o nível sérico da quimiocina MIF e a idade dos pacientes, sobretudo no Grupo 1 ($r = -0,72$, $p = 0,002$). O fato tornou imperativo o emprego da análise de covariância para o estudo da diferença entre grupos. Imaginando-se um papel fisiopatológico desta quimiocina no contexto estudado (por exemplo, induzindo a proliferação de células musculares lisas vasculares), pode-se admitir que sua ação seja predominante nos primeiros meses de vida, em vista deste achado.

Outra preocupação, no estudo, foi a de verificar como estas diferenças se apresentariam especificamente nos pacientes com síndrome de Down. Esta preocupação foi fundada no fato de que a maioria dos pacientes incluídos apresentava-se com a síndrome e sabe-se que citocinas encontram-se alteradas em portadores da síndrome de Down^{63,64}. A análise das concentrações das quimiocinas MIF e RANTES, especificamente nos portadores da síndrome de Down (controles e pacientes segundo os grupos do estudo), está ilustrada na **Figura 6, C e D**, respectivamente. O comportamento foi semelhante, com predomínio de MIF no Grupo 1 e de RANTES no Grupo 2.

Assim sendo, foi importante observar pacientes portadores da síndrome de Down, até então considerada como um fator de risco para o desenvolvimento precoce de vasculopatia pulmonar, apresentando-se sem evidência clínica de resistência vascular pulmonar criticamente alterada, e com níveis séricos mais elevados da proteína RANTES. Estes achados permitem que se questione as generalizações correntes a respeito da vasculopatia pulmonar na síndrome.

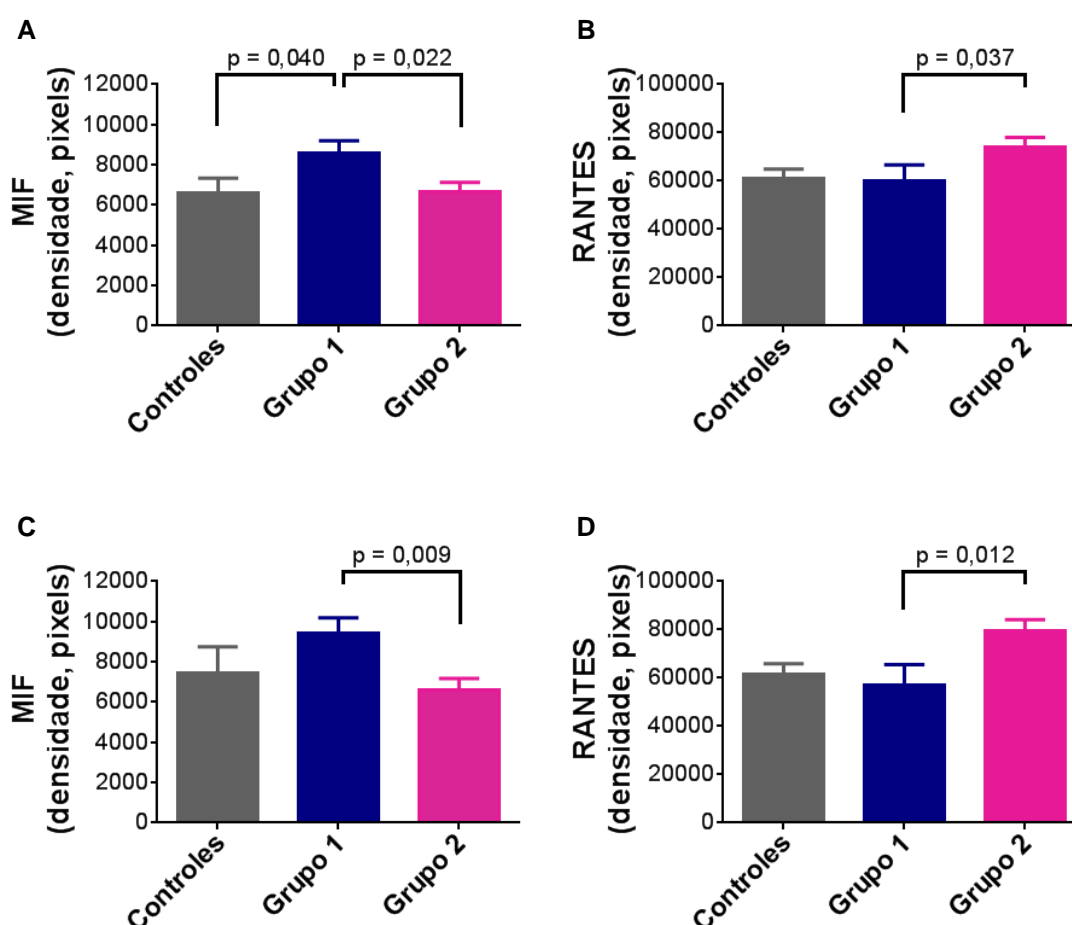


Figura 6. Níveis séricos das quimiocinas MIF e RANTES segundo os grupos considerados no estudo. Em **A** e **B**, estão representados todos os pacientes do estudo (n=47), assim distribuídos: Grupo 1, n=16; Grupo 2, n=31; controles pediátricos, n=13. Em **C** e **D**, estão apenas os portadores da síndrome de Down (n=32), assim distribuídos: Grupo 1, n=11; Grupo 2, n=21; controles com síndrome de Down, n=5. Os dados estão expressos como média e erro padrão. A proteína MIF foi analisada tomando-se a idade como covariável, dada a influência da mesma. Os valores de “p” correspondem a testes de comparações múltiplas, após aplicação de análise de variância (RANTES) ou análise de covariância (MIF).

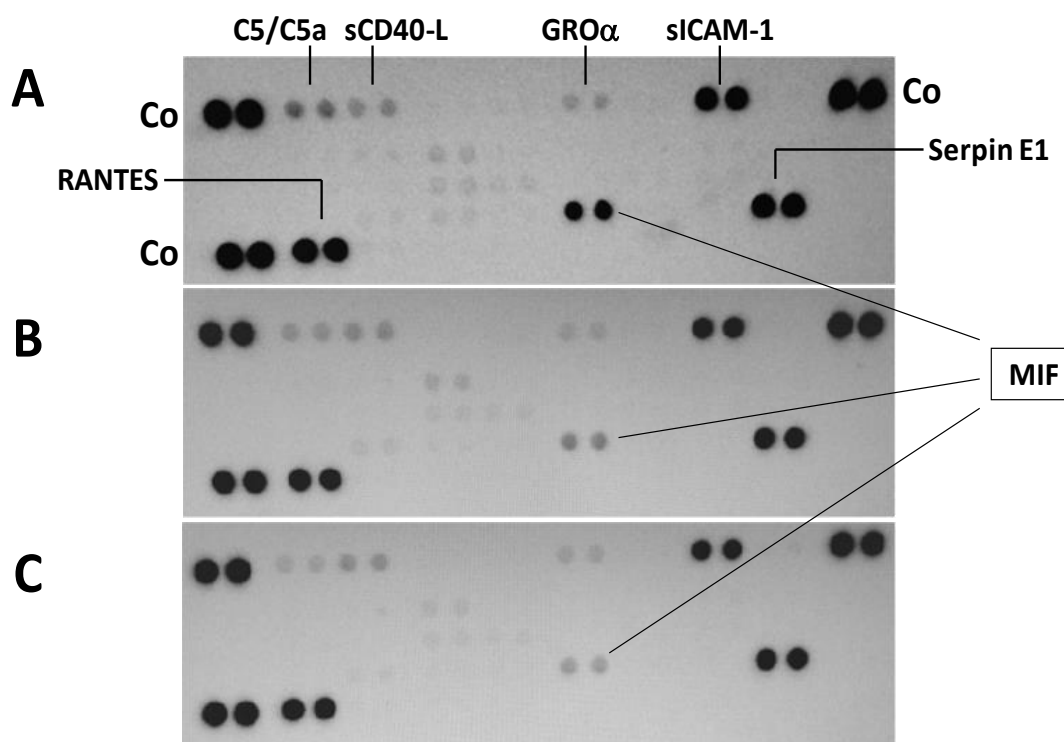


Figura 7. “Dot blots” representativos da análise da quimiocina MIF nos grupos do estudo. **A** e **B**, respectivamente, pacientes do Grupo 1 e Grupo 2. Em **C**, controle pediátrico. Observa-se aumento importante na densidade da quimiocina MIF no paciente do Grupo 1 em relação aos demais. Outras proteínas estudadas estão também identificadas.

4.2.3 Administração pré-operatória de sildenafil e seus efeitos sobre variáveis clínicas e nível de mediadores inflamatórios

Os pacientes do Grupo 1 receberam sildenafil por oito a 70 dias (mediana, 25 dias). A dose máxima atingida por paciente variou de 1,5 a 5,0 mg/Kg/dia (mediana, 3,0 mg/Kg/dia), não havendo registros de efeitos adversos. Treze dos 16 pacientes expostos ao fármaco apresentaram alterações clínicas (acentuação da dispneia, necessidade de introdução ou aumento na medicação diurética, elevação da saturação periférica de oxigênio) ou ecocardiográficas (incremento nas variáveis Qp/Qs e/ou VTI em veias pulmonares), consideradas compatíveis com vasodilatação pulmonar efetiva.

Todos os 13 pacientes foram imediatamente encaminhados para o tratamento cirúrgico dos defeitos cardíacos. Em três pacientes, tais alterações não foram observadas. Eles foram considerados casos não apropriados para o tratamento cirúrgico seguro, uma vez que persistiram sinais sugestivos de resistência vascular pulmonar elevada. Todos os 31 pacientes do Grupo 2 foram encaminhados para a correção cirúrgica da anomalia cardíaca.

Os efeitos do uso pré-operatório da sildenafil em pacientes do Grupo 1 encontram-se resumidos na **Figura 8**. Com relação a variáveis ecocardiográficas relacionadas ao fluxo pulmonar, houve aumento na razão Qp/Qs na maioria dos pacientes (**Figura 8-A**). Este evento ocorreu paralelamente ao aumento da intensidade da dispneia em alguns casos, com necessidade de introdução ou incremento na dose de diuréticos. Apesar disto, houve elevação significativa no nível de saturação periférica de oxigênio (**Figura 8-B**). Tais alterações hemodinâmicas e oximétricas foram acompanhadas de redução no nível sérico de IL-6 quando todos os 16 pacientes foram analisados em conjunto (**Figura 8-C**). Entre todas as demais citocinas analisadas, alteração foi observada apenas com relação ao nível de ICAM-1 solúvel, mas dependente de modificações na magnitude de fluxo pulmonar estimado pela ecocardiografia. Pacientes com incremento superior a 10% na razão Qp/Qs (n=10) apresentaram decréscimo significativo no nível de sICAM-1 (**Figura 8-D**). Esta observação não se reproduziu entre aqueles (n=6) sem o correspondente incremento em Qp/Qs (**Figura 8-E**). Nenhuma outra modificação significativa foi observada com respeito aos níveis de mediadores inflamatórios.

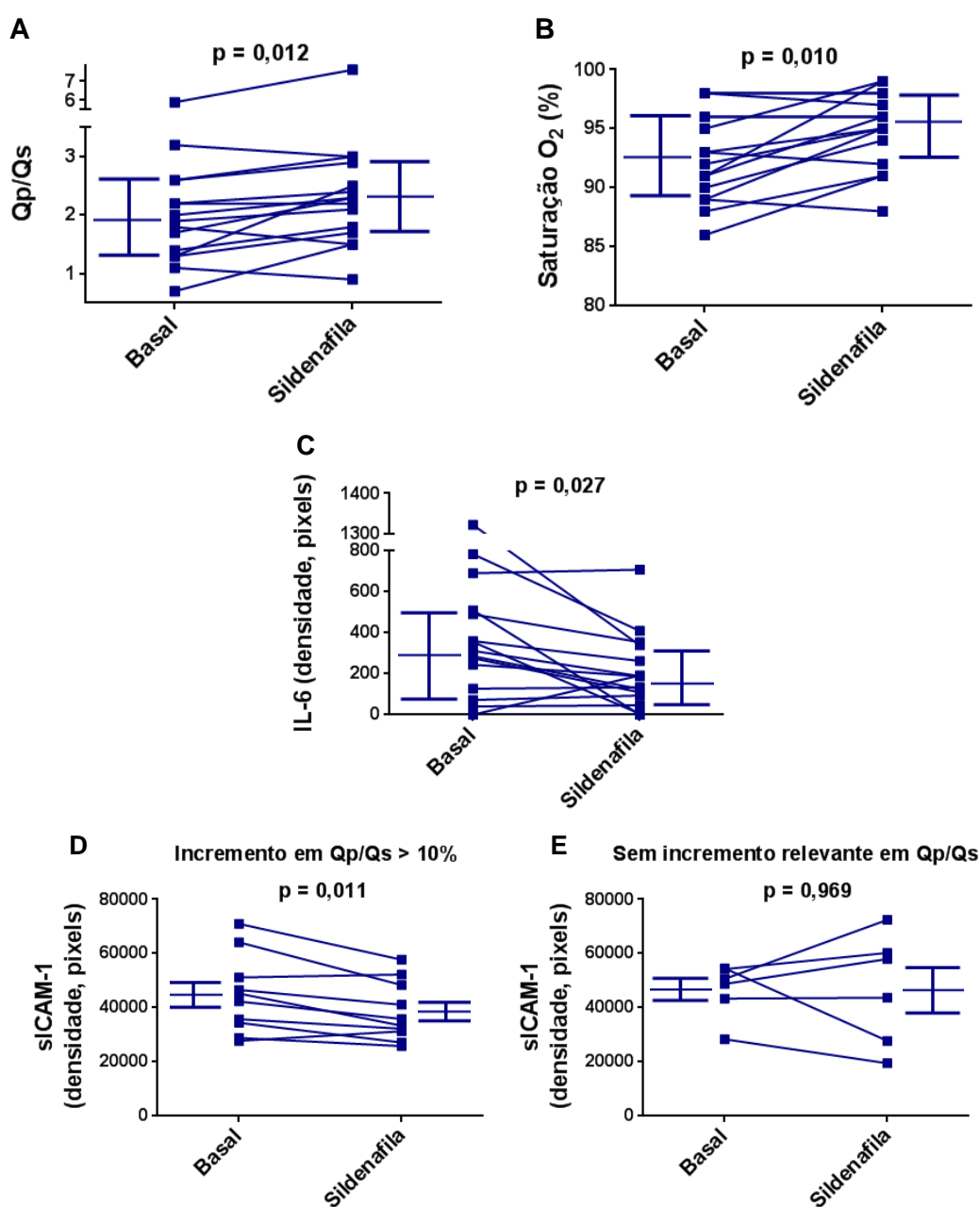


Figura 8. Efeitos da administração pré-operatória de sildenafil sobre variáveis clínicas e bioquímicas. Em **A** e **B**, incremento do fluxo pulmonar em relação ao sistêmico (razão Qp/Qs) e da saturação periférica de oxigênio, no conjunto dos 16 pacientes avaliados, embora com situações individuais onde este aumento não se deu. Em **C**, redução do nível sérico de interleucina 6 (IL-6) na maioria dos indivíduos tratados. Em **D** e **E**, modificação do nível sérico da molécula de adesão intercelular-1 (solúvel, sICAM-1), respectivamente nos subgrupos de indivíduos com (n=10) e sem (n=6) incremento do fluxo pulmonar (Qp/Qs), estimado através da ecocardiografia. Os resultados para sICAM-1 são expressos em média e erro padrão, sendo as diferenças avaliadas pelo teste “t” (observações emparelhadas). Para as demais variáveis, os resultados são expressos como mediana e percentís 25 e 75, sendo as diferenças avaliadas pelo teste de Wilcoxon.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo procurou demonstrar que em pacientes pediátricos, notadamente aqueles com “*shunts*” cardíacos congênitos, alterações em mediadores ditos de inflamação ocorrem não apenas por doenças de caráter infeccioso ou inflamatório sistêmico, mas também em decorrência de alterações hemodinâmicas. Modificações em níveis circulantes de certas citocinas já são conhecidas, por exemplo, como parte do quadro fisiopatológico geral da insuficiência cardíaca⁶⁶⁻⁷⁰. Entretanto, dados sobre essas alterações em cardiopatias congênitas ainda são relativamente escassos. Para o estudo desta relação, foi necessário, em primeiro lugar, caracterizar situações hemodinâmicas distintas a partir de variáveis clínicas. O método que mais auxiliou neste sentido foi a ecocardiografia, através da estimação da relação entre os fluxos sanguíneos (Q_p/Q_s) e da análise do retorno venoso pulmonar (VTI_{vp}). Isto porque estas determinações foram feitas em todos os pacientes. Seria difícil justificar a realização do cateterismo cardíaco em pacientes com características clínicas de Grupo 2. Sob o ponto de vista assistencial, estes pacientes são rotineiramente encaminhados ao tratamento cirúrgico com base em avaliação não invasiva somente. Nenhum dado ecocardiográfico numérico foi utilizado na classificação dos pacientes (composição dos grupos). Desta forma, as variáveis que expressam fluxo (Q_p/Q_s e VTI_{vp}), obtidas posteriormente, foram importantes na constatação de que os Grupos 1 e 2, clinicamente caracterizados, eram de fato, hemodinamicamente distintos. A utilidade de parâmetros ecocardiográficos na estimação de dados hemodinâmicos tem sido demonstrada^{50,51,56}. Ressalte-se, entretanto, que as medidas não invasiva e invasiva não são necessariamente comparáveis, uma vez que são obtidas em condições absolutamente

diferentes. Por esta razão, no presente estudo, não se procedeu à análise comparativa entre dados ecocardiográficos e de cateterismo cardíaco.

Com relação aos mediadores de inflamação investigados no estudo, analisando inicialmente os pacientes como um todo, sem considerar os grupos, observou-se que a maior parte das relações significantes com variáveis que expressam a condição hemodinâmica foram inversas (**Tabela 3**, exceção feita à interleucina 10). Isto significa que de modo geral, houve correspondência entre concentrações séricas das proteínas e níveis mais altos de resistência vascular pulmonar presumidos a partir de menores valores para variáveis de fluxo. Observa-se ainda, pela análise da **Tabela 3**, que não houve correspondência, em termos de significância estatística, entre os resultados obtidos com uso das variáveis Qp/Qs e VTI_{lv}. Em outras palavras, não houve associações significantes com ambas as variáveis. Acreditamos que isto possa ter ocorrido em função do número relativamente pequeno de pacientes, em correlações onde não se espera encontrar coeficientes de magnitude expressiva. Observa-se por outro lado, que em oito das 11 associações significantes, o sinal do coeficiente foi o mesmo para ambos os parâmetros (Qp/Qs e VTI_{lv}). Alguns dos achados expostos na **Tabela 3** tem potencial implicação fisiopatológica. Por exemplo, além de representar um fator de quimiotaxia para linfócitos^{71,72}, a IL-16 (assim como seu receptor CD4) é expressa em células musculares lisas vasculares. A sinalização a partir desta citocina é capaz de induzir a expansão de células musculares lisas via P38MAPK/Sp-1/MMP-9 de forma dependente de p21 WAF1⁷³. Por este motivo, a via tem sido cogitada como alvo potencial para intervenções terapêuticas. A relação entre níveis de IL-16 e parâmetros de gravidade potencial da doença

no presente estudo, também pode ser apreciada pela análise da **Figura 3**. A partir ainda da **Tabela 3**, observa-se a relação direta entre níveis de IL-10 e a magnitude do fluxo pulmonar através da variável Qp/Qs. Tal relação direta com o fluxo e presumivelmente inversa com a resistência vascular não surpreende, uma vez que em diversas condições, a IL-10 cumpre papel desacelerador do processo inflamatório, em certo sentido, protetor^{74,75}.

Há um conceito clássico de que a idade representa um fator de progressão das alterações vasculares pulmonares em pacientes pediátricos portadores de comunicações entre câmaras cardíacas. Com efeito, existe consenso sobre a necessidade de correção precoce sobretudo dos defeitos não restritivos, como a melhor forma de se prevenir a evolução das vasculopatia pulmonar^{4,17,19}. Estudo clássico de Rabinovitch e colaboradores²² mostraram que, a despeito do grau das alterações vasculares observadas em biópsias pulmonares intra-operatórias, pacientes submetidos à correção da anomalia cardíaca antes dos nove meses de idade ficaram isentos de anormalidades hemodinâmicas residuais um ano após a operação. Por outro lado, elevação persistente da RVP foi observada em indivíduos tratados após os dois anos de idade. Embora haja exceções a esta regra, como observações não raras de lesões vasculares pulmonares avançadas observadas precocemente, o consenso atual continua apontando para a idade (tempo de evolução) como fator de risco. A este respeito, entretanto, há uma série de questões que ainda necessitam esclarecimento. A idade seria um fator de risco para o aparecimento e expansão de lesões oclusivas? Seria um fator determinante do potencial de regressão de lesões de menor gravidade? Existiriam fatores capazes de manter as alterações vasculares por longo tempo

em estágios menos avançados caracterizando um fenótipo capaz de se sustentar até certo ponto? (por exemplo, hipertrofia isolada da camada média arteriolar).

A idade é um fator de caráter bastante geral, que aparece de imediato à observação clínica. Cumpre, entretanto, identificar determinantes que possam estar “por trás”. O presente estudo fornece algumas relações que podem ter importância fisiopatológica: proteínas com potencial papel no remodelamento vascular pulmonar que guardavam relação significativa com a idade. Chamamos atenção para as interleucinas 13 e 17E, e para as quimiocinas GRO α e MIF. No estudo, houve relação direta entre os níveis séricos das interleucinas 13 e 17E e a idade dos pacientes. Estas duas citocinas são expressas como parte da resposta imune do tipo Th2, juntamente com as interleucinas 4, 5, 9, 10, 21 e 31. Há paralelismo estreito entre a resposta Th2 e o desenvolvimento da vasculopatia pulmonar. Em modelo experimental, com a introdução por via inalatória de antígenos capazes de deflagrar resposta imune específica, o remodelamento vascular pulmonar foi inibido: a) com uso de anticorpos anti-CD4; b) em camundongos transgênicos com expressão defectiva de interleucina 4; c) com a utilização de inibidor da interleucina 13⁴⁷. Outros estudos comprovam, da mesma forma, o envolvimento da resposta Th2 na fisiopatologia das alterações vasculares pulmonares^{76,77}. O presente estudo, embora apenas com marcadores séricos, procura identificar esta relação em humanos (neste caso, pacientes pediátricos com cardiopatias congênitas), conforme sugerido por outros autores^{48,78,79}.

Outras relações com idade foram encontradas com respeito às quimiocinas GRO α e MIF. No caso da proteína MIF, relação inversa com a

idade foi observada, mas apenas nos pacientes caracterizados como Grupo 1 (**Figura 4C**, $R^2=0,52$, $p=0,002$). Com respeito à $GRO\alpha$, relação inversa com a idade foi identificada em ambos os grupos, sendo limítrofe, em termos de significância estatística, em indivíduos do Grupo 2 (**Figura 4A**). A quimiocina $GRO\alpha$ (também designada por CXCL1) é uma proteína relacionada à interleucina 8, sendo que ambas sinalizam através de ligação com receptores CXCR1 e CXCR2. Foi inicialmente descrita como ligada a crescimento tumoral em melanoma⁸⁰, sobretudo por tratar-se de um fator angiogênico. Em verdade, a quimiocina $GRO\alpha$ é considerada como o mediador do efeito angiogênico da trombina⁶⁵. Níveis mais elevados foram observados precocemente no presente estudo, com decaimento subsequente. Caso esta observação tenha implicações fisiopatológicas, fato a ser verificado em estudos futuros, a redução progressiva com o incremento da idade poderia representar uma perda do potencial angiogênico. Sabe-se que o desenvolvimento pulmonar, especificamente a formação de novos vasos (ou sua reabsorção) tem importância comprovada na gênese das alterações vasculares em pacientes pediátricos. Indivíduos acometidos costumam apresentar redução no número de pequenos vasos intra-acinares em relação ao número de alvéolos^{81,82}.

Quando os pacientes foram analisados segundo os grupos definidos, diferenças foram encontradas apenas para duas entre todas as proteínas analisadas, a saber, MIF e RANTES. A proteína MIF não é originalmente uma quimiocina, uma vez que não compartilha estrutura (domínios) com estas últimas. A proteína é considerada um ligante não canônico de receptores para quimiocinas, sendo capaz de sinalizar a partir de

moléculas do tipo CXCR2 e CXCR4⁸³. Além disso, a proteína CD74 forma complexos com estes receptores, servindo de sítio de ligação para MIF⁸⁴. Diversas vias de sinalização são ativadas subsequentemente, podendo ser citadas a via das MAPK/ERK quinases, PI3K/Akt, além de outras⁸⁵. Em células endoteliais, a sinalização deflagrada pela proteína MIF resulta em inibição da apoptose⁸⁶. Em células musculares lisas vasculares descreve-se indução de proliferação⁴⁹. A participação de MIF na fisiopatologia da hipertensão arterial pulmonar é conhecida, inclusive em humanos^{87,88}. A literatura, entretanto, é escassa no que diz respeito à população pediátrica, particularmente em cardiopatias congênitas. O presente estudo trouxe duas verificações importantes. Em primeiro lugar, MIF parece ser uma proteína de atividade precoce nesta população. Seus níveis mostraram-se altos no primeiro ano de vida, acima dos encontrados em controles pediátricos, decaindo subsequentemente. Entretanto, esta característica foi observada especificamente em indivíduos do Grupo 1 (**Figura 4C e D e Figura 6A e C**), que são, presumivelmente, aqueles com níveis mais elevados de RVP, sendo esta a segunda observação importante. Ressalte-se que MIF tem papel central na imunidade inata, sendo seus níveis dez vezes superiores em recém-nascidos em comparação com crianças e adultos⁸⁹. Haveria então uma persistência deste padrão em indivíduos com características de Grupo 1? Estes dados não apontam necessariamente para uma relação entre MIF e vasculopatia pulmonar oclusiva em lactentes com cardiopatias congênitas. Ao contrário, dados mais recentes de nosso grupo, que se encontram em fase de publicação, sugerem relação de proximidade entre MIF, espessamento por vezes acentuado de camada média arteriolar pulmonar e resposta ao óxido

nítrico inalado⁹⁰. Assim sendo, existe a possibilidade de que pelo menos temporariamente (primeiros meses de vida), MIF esteja relacionado a um fenótipo essencialmente hipertrófico, em termos de vasculopatia pulmonar, sem o desenvolvimento (até então) de lesões intimaes obstrutivas. Esta hipótese leva à necessidade de interpretarmos as ações destas proteínas (citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento) com cuidado. Elas não são necessariamente indutoras ou protetoras no processo de remodelamento vascular. Sua ação pode estar na dependência de outros fatores como a idade, elenco geral de elementos fisiopatológicos (outras citocinas, fatores de crescimento, composição de matriz extracelular, etc.), além de determinantes genéticos ainda pouco explorados.

A proteína RANTES é um membro da subfamília CC de quimiocinas, sendo também designada por CCL5, sinalizando através de receptores CCR1, CCR3, CCR4 e CCR5. Está relacionada a grande número de condições fisiopatológicas, incluindo inflamação, resposta imune, remodelamento arterial e aterosclerose^{60,91,92}. É descrita em tumorigênese, com papel protetor em várias situações⁹³, além de ser considerado marcador de progressão da doença em neoplasia mamária^{94,95}. No presente estudo, o nível sérico de RANTES esteve aumentado especificamente em pacientes do Grupo 2, ou seja, aqueles com maior fluxo sanguíneo pulmonar estimado pela ecocardiografia (**Figura 6B e D**). A importância desta observação reside no fato de que a condição de hiperfluxo pulmonar poderia, especulativamente, aproximar RANTES da condição fisiopatológica em discussão. Há diversas publicações mostrando que células epiteliais de vias aéreas inferiores infectadas por vírus, sobretudo o sincicial respiratório, expressam RANTES em

grandes quantidades, além de outras citocinas como MIP-1 α e a interleucina 8^{44,45,96}. Ora, os lactentes portadores de hiperfluxo com congestão pulmonar são exatamente aqueles suscetíveis às infecções de repetição nas vias aéreas, notadamente virais. Não é, portanto, surpreendente a relação entre RANTES e pacientes do Grupo 2. É conhecida a relação de proximidade entre as vias aéreas mais distais, pré e intra-acinares, e os vasos que as acompanham, que aliás, recebem o mesmo nome (arteríolas do bronquíolo terminal, bronquíolos respiratórios, etc.)⁹⁷. Assim sendo, especulativamente, poder-se-ia supor que elementos fisiopatológicos com atuação em vias aéreas possam também participar de eventos vasculares. Evidentemente, demonstrações futuras, neste sentido, são necessárias.

Com relação à síndrome de Down, sabe-se que a mesma cursa com elevada prevalência de cardiopatias congênitas, incluindo defeitos não restritivos como grandes comunicações interventriculares e o defeito septal atrioventricular⁹⁸. Classicamente, tem-se admitido que a presença de síndrome de Down torna o paciente mais predisposto ao desenvolvimento de vasculopatia pulmonar acentuada e precoce^{99,100}. Esforços têm sido feitos no sentido de se tentar explicar as razões para esta associação, embora não haja dados conclusivos a este respeito. Uma das verificações, nesta direção, é o achado de genes que codificam fatores considerados anti-angiogênicos no cromossomo 21 em humanos¹⁰¹. Diversas outras moléculas têm sido estudadas no sentido de se caracterizar fatores de risco para o desenvolvimento de lesões vasculares pulmonares mais avançadas¹⁰². Apesar destes esforços, a relação direta entre síndrome de Down e alterações vasculares pulmonares avançadas em portadores de cardiopatias congênitas

ainda não está definitivamente demonstrada^{103,104}. No presente estudo, não houve a intenção de se avaliar, comparativamente, portadores e não portadores da síndrome de Down. Dadas as características da Instituição como unidade terciária de atendimento, havia a previsão inicial de que o número de indivíduos não sindrômicos seria pequeno em relação aos sindrômicos, como de fato foi (32% da casuística geral). Esta desproporção dificultaria análises comparativas na dimensão amostral do estudo. Alguns aspectos, entretanto, merecem consideração. Em primeiro lugar, indivíduos sindrômicos apresentaram-se em proporções iguais nos Grupos 1 e 2. Em segundo, o valor mediano da variável Qp/Qs (ecocardiografia) em portadores da síndrome de Down (2,40 com percentis 25-75 iguais a 1,70-2,81) não esteve significativamente abaixo daquele obtido para indivíduos não sindrômicos (2,60 (2,13-4,23)). Entende-se, desta forma, que pelo menos parte dos indivíduos sindrômicos apresenta-se com características clínicas que não são aquelas usualmente encontradas em pacientes com elevação importante da resistência vascular pulmonar. Levando-se em conta que indivíduos com a síndrome de Down podem apresentar expressão distinta de citocinas e outros mediadores de inflamação^{63,105}, tivemos o cuidado de analisar as proteínas MIF e RANTES especificamente nesta subpopulação, não tendo sido encontrado padrão diferente do observado na casuística como um todo. Em particular, o subgrupo específico de pacientes sindrômicos com características clínicas do Grupo 2 apresentou-se com elevação significativa no nível sérico da proteína RANTES. Assim sendo, no futuro, é provável que se possa identificar uma subpopulação de pacientes com a síndrome de Down não diferente de indivíduos não sindrômicos com relação à gravidade das alterações vasculares pulmonares.

Para tanto, evidentemente, um elenco mais amplo de marcadores bioquímicos e genéticos será necessário.

Cumprindo o objetivo secundário do estudo, procurou-se verificar o possível impacto do uso pré-operatório de fármaco desenvolvido para uso em hipertensão arterial pulmonar sobre as proteínas em investigação. O efeito desta intervenção tornou-se objeto do estudo, mas a intervenção em si, não. O uso pré-operatório da sildenafil, em pacientes caracterizados como Grupo 1, já fazia parte de protocolo em curso na Instituição (*Clinical Trials* NCT01548950), tendo como meta verificar a evolução de pacientes em tratamento combinado, cirúrgico e medicamentoso pós-operatório, em médio prazo. Assim sendo, no presente estudo, simplesmente verificou-se o comportamento das proteínas séricas frente à administração da sildenafil, sendo ambas as determinações (pré e durante o uso do fármaco), feitas antes da operação cardíaca.

Apenas duas entre as proteínas analisadas tiveram seus níveis modificados no curso da administração da sildenafil. Com significância estatística, os níveis da interleucina 6 foram reduzidos no Grupo 1 como um todo, comparativamente à situação basal. A fração solúvel da proteína de adesão ICAM-1 (sICAM-1) teve redução significativa apenas em pacientes que apresentaram incremento superior a 10% no fluxo sanguíneo pulmonar estimado através da variável Qp/Qs (ecocardiografia). Ressalte-se que os efeitos observados não podem ser interpretados como “melhora” a partir de anormalidades iniciais, uma vez que pelo menos no âmbito do presente estudo, os níveis basais de IL-6 e sICAM-1 não estiveram aumentados em relação aos controles. Assim sendo, os dados observados correspondem a modificações

frente ao uso do fármaco. Um aspecto importante a ser lembrado é o de que as modificações bioquímicas observadas durante o uso de vasodilatador, especificamente um inibidor de fosfodiesterase-5, não são necessariamente simples decorrência de efeitos hemodinâmicos e suas consequências sobre os vasos. Há uma gama de estudos revelando efeitos destes fármacos sobre diversas atividades biológicas em células vasculares e plaquetas¹⁰⁶⁻¹¹⁰, e dados de estudo recente de nosso grupo, em adultos recebendo tadalafila e sildenafil cronicamente, corroboram esta hipótese¹¹¹. Embora as observações feitas no presente estudo sejam de curto prazo (dias ou semanas), nada se podendo afirmar sobre a sustentação dos efeitos (notadamente a redução da interleucina 6), modificações em níveis séricos de proteínas inflamatórias no curso de terapia vasodilatadora, em pacientes pediátricos com cardiopatias congênitas, são achados novos, abrindo perspectivas para futuras investigações.

6. CONCLUSÕES

As observações do estudo, alinhadas com os objetivos formulados, permitem concluir:

Foi possível caracterizar dois grupos de pacientes pediátricos com comunicações não restritivas entre a circulação sistêmica e a pulmonar, a partir de dados obtidos da história clínica e exame físico. Foi possível comprovar subsequentemente, sob o ponto de vista de avaliação não invasiva (ecocardiográfica), que os grupos eram distintos em sua apresentação hemodinâmica.

Os grupos assim caracterizados se revelaram distintos sob o ponto de vista de proteínas inflamatórias presentes no soro: pacientes com perfil compatível com aumento na resistência vascular pulmonar apresentaram níveis aumentados da quimiocina MIF; aqueles onde predominaram sinais de aumento do fluxo sanguíneo com congestão pulmonar tiveram níveis aumentados da quimiocina RANTES. Não se observaram peculiaridades em relação à síndrome de Down.

Independentemente dos grupos considerados, os níveis de algumas citocinas guardaram relação com a idade dos pacientes, sempre lembrada como um fator de risco no presente contexto. Neste sentido, destacam-se as proteínas GRO α , MIF e as interleucinas 13 e 17E.

O uso pré-operatório de inibidor do fosfodiesterase-5 sildenafil, visando ao manejo de resistência vascular pulmonar alterada, resultou em diminuição dos níveis séricos das proteínas interleucina 6 e sICAM-1, paralelamente ao incremento do fluxo sanguíneo pulmonar e na saturação periférica de oxigênio.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo procurou demonstrar a existência de elementos bioquímicos, especificamente proteínas relacionadas a eventos inflamatórios, em paralelo a perfis clínicos e hemodinâmicos encontrados em pacientes pediátricos com comunicações cardíacas congênitas. O retrato destes pacientes, hoje constituídos por informações clínicas complementadas por elementos anatômicos e funcionais provenientes da ecocardiografia e outros métodos diagnósticos por imagem, assim como exame hemodinâmico invasivo, é então ampliado pela inserção de dados de natureza bioquímica. A existência de tais associações mostra que as proteínas em questão não são protagonistas apenas de eventos inflamatórios ou infecciosos, fazendo parte de vários outros processos. Tais elementos não são somente indutores ou produtos da reação inflamatória, mas agem também como fatores de crescimento e diferenciação celular, modificadores das relações entre células e matriz ou agem como proteases.

A caracterização destas proteínas, no presente cenário, poderia ser entendida como mais um esforço em direção à identificação de biomarcadores, prática bastante presente na atualidade. Enfatiza-se, entretanto, com respeito a este estudo, que não se trata apenas da busca por um marcador ou marcadores, como a creatinina o é para a insuficiência renal, mas da identificação de proteínas potencialmente implicadas nos processos de angiogênese e remodelamento vascular. Evidentemente, o estudo limita-se pela identificação destes elementos apenas no soro, sendo necessários outros esforços para sua caracterização em tecidos, melhor compreensão dos seus efeitos biológicos e hierarquia na fisiopatologia da doença. Acreditamos que no futuro, alguns elementos do vasto elenco de moléculas e receptores

investigados na literatura especializada, possam vir a ser alvos de tratamentos específicos.

8. REFERÊNCIAS

1. Berger RM, Beghetti M, Humpl T, Raskob GE, Ivy DD, Jing ZC, Bonnet D, Schulze-Neick I, Barst RJ. Clinical features of paediatric pulmonary hypertension: a registry study. *Lancet*. 2012;379:537-46.
2. Adatia I, Kothari SS, Feinstein JA. Pulmonary hypertension associated with congenital heart disease: pulmonary vascular disease: the global perspective. *Chest*. 2010;137:Suppl.6,52S-61S.
3. Haworth SG. Pulmonary vascular disease in different types of congenital heart disease: implications for interpretation of lung biopsy findings in early childhood. *Br Heart J*. 1984;52:557-71.
4. van der Feen DE, Bartelds B, de Boer RA, Berger RMF. Pulmonary arterial hypertension in congenital heart disease: translational opportunities to study the reversibility of pulmonary vascular disease. *Eur Heart J*. 2017;38(26):2034-41.
5. Galiè N, Torbicki A, Barst R, Darteville P, Haworth S, Higenbottam T, Olschewski H, Peacock A, Pietra G, Rubin LJ, Simonneau G, Priori SG, Garcia MA, Blanc JJ, Budaj A, Cowie M, Dean V, Deckers J, Burgos EF, Lekakis J, Lindahl B, Mazzotta G, McGregor K, Morais J, Oto A, Smiseth OA, Barbera JA, Gibbs S, Hoeper M, Humbert M, Naeije R, Pepke-Zaba J; Task Force. Guidelines on diagnosis and treatment of pulmonary arterial hypertension: the Task Force on Diagnosis and Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J*. 2004;25:2243-78.

6. Lopes AA, Bandeira AP, Flores PC, Santana MVT. Pulmonary hypertension in Latin America. *Chest*.2010;137(Suppl.):S78-S84.
7. Wagenvoort CA, Wagenvoort N, Draulans-Noe Y. Reversibility of plexogenic pulmonary arteriopathy following banding of the pulmonary artery. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1984;87:876-86.
8. Beghetti M, Galiè N. Eisenmenger syndrome: a clinical perspective in a new therapeutic era of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2009;53:733-40.
9. Irving CA, Chaudhari MP. Cardiovascular abnormalities in Down's syndrome: spectrum, management and survival over 22 years. *Arch Dis Child*. 2012;97:326-30.
10. Marelli AJ, Mackie AS, Ionescu-Ittu R, Rahme E, Pilote L. Congenital heart disease in the general population: changing prevalence an age distribution. *Circulation* 2007;115:163-72.
11. Hoffman JI, Kaplan S. The incidence of congenital heart disease. *J Am Coll Cardiol*. 2002;39(12):1890-900.
12. Duffels MG, Engelfriet PM, Berger RM, van Loon RL, Hoendermis E, Vriend JW, van der Velde ET, Bresser P, Mulder BJ. Pulmonary arterial hypertension in congenital heart disease: an epidemiologic perspective from a Dutch registry. *Int J Cardio*.l 2007;120:198-204.
13. Engelfriet PM, Duffels MG, Möller T, Boersma E, Tijssen JG, Thaulow E, Gatzoulis MA, Mulder BJ. Pulmonary arterial hypertension in adults born

- with a heart septal defect: the Euro Heart Survey on adult congenital heart disease. *Heart*. 2007;93:682-7.
14. Galiè N, Hoeper MM, Humbert M, Torbicki A, Vachiery JL, Barbera JA, Beghetti M, Corris P, Gaine S, Gibbs JS, Gomez-Sanchez MA, Jondeau G, Klepetko W, Opitz C, Peacock A, Rubin L, Zellweger M, Simonneau G; ESC Committee for Practice Guidelines (CPG). Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS), endorsed by the International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur Heart J*. 2009;30:2493-537.
 15. Hosseinpour A-R, Perez M-H, Longchamp D, Cotting J, Sekarski N, Hurni M, Prêtre R, Di Bernardo S. Age is not a good predictor of irreversibility of pulmonary hypertension in congenital cardiac malformations with left-to-right shunt. *Congenit Heart Dis*. 2018;13:210-6.
 16. Simonneau G, Robbins IM, Beghetti M, Channick RN, Delcroix M, Denton CP, Elliott CG, Gaine SP, Gladwin MT, Jing ZC, Krowka MJ, Langleben D, Nakanishi N, Souza R. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54:S43-54.
 17. Lopes AA, Barst RJ, Haworth SG, Rabinovitch M, Al Dabbagh M, Del Cerro MJ, Ivy D, Kashour T, Kumar K, Harikrishnan S, D'Alto M, Thomaz AM, Zorzanelli L, Aiello VD, Mocumbi AO, Santana MV, Galal AN, Banjar H, Tamimi O, Heath A, Flores PC, Diaz G, Sandoval J, Kothari S,

- Moledina S, Gonçalves RC, Barreto AC, Binotto MA, Maia M, Al Habshan F, Adatia I. Repair of congenital heart disease with associated pulmonary hypertension in children: what are the minimal investigative procedures? Consensus statement from the Congenital Heart Disease and Pediatric Task Forces, Pulmonary Vascular Research Institute (PVRI). *Pulm Circ.* 2014;4(2):330-41.
18. Vongpatanasin W, Brickner ME, Hillis LD, Lange RA. The Eisenmenger syndrome in adults. *Ann Intern Med.*1998;128:745-55.
19. D'Alto M, Mahadevan VS. Pulmonary arterial hypertension associated with congenital heart disease. *Eur Respir Rev.* 2012;21:126,328-37.
20. Heath D, Edwards JE. The pathology of hypertensive pulmonary vascular disease: a description of six grades of structural changes in the pulmonary arteries with special reference to congenital cardiac septal defects. *Circulation.* 1958;18(4Part1):533-47.
21. Stacher E, Graham BB, Hunt JM, Gandjeva A, Groshong SD, McLaughlin VV, Jessup M, Grizzle WE, Aldred MA, Cool CD, Tudor RM. Modern age pathology of pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012;186:261-72.
22. Rabinovitch M, Keane JF, Norwood WI, Castaneda AR, Reid L. Vascular structure in lung tissue obtained at biopsy correlated with pulmonary hemodynamic findings after repair of congenital heart defects. *Circulation* 1984;69(4):655-667.

23. Maeno Y, Kamenir SA, Sinclair B, van der Velde ME, Smallhorn JF, Hornberger LK. Prenatal features of restrictive foramen ovale and ductal constriction in D-transposition of great arteries. *Circulation*. 1999;99(9):1209-14.
24. Rudolph AM. Aortopulmonary transposition in the fetus: speculation on pathophysiology and therapy. *Pediatr Res*. 2007;61(3):375-80.
25. Dimopoulos K, Peset A, Gatzoulis MA. Evaluating operability in adults with congenital heart disease and the role of pretreatment with targeted pulmonary arterial hypertension therapy. *Int J Cardiol*. 2008;129:163-71.
26. Giglia TM, Humpl T. Preoperative pulmonary hemodynamics and assessment of operability: is there a pulmonary vascular resistance that precludes cardiac operation? *Pediatr Crit Care Med*. 2010;11(2 Suppl):S57-S69.
27. Ribeiro ZV, Tsutsui JM, Miranda RA, Mohry S, Mathias W, Lopes AA. Doppler echocardiography and hemodynamic parameters in congenital heart disease with increased pulmonary flow. *Arq Bras Cardiol*. 2010;94:592-600.
28. Sanders SP, Yeager S, Williams RG. Measurement of systemic and pulmonary blood flow and QP/QS ratio using Doppler and two-dimensional echocardiography. *Am J Cardiol*. 1983;51(6):952-6.

29. Kozlik-Feldmann R, Hansmann G, Bonnet D, Schranz D, Apitz C, Michel-Behnke I. Pulmonary hypertension in children with congenital heart disease (PAH-CHD, PPHVD-CHD). Expert consensus statement on the diagnosis and treatment of paediatric pulmonary hypertension. The European Paediatric Pulmonary Vascular Disease Network, endorsed by ISHLT and DGPK. *Heart*. 2016;102(Suppl 2):ii42–ii48.
30. Evangelista A, García del Castillo H, González-Alujas T, Brotons C, García-Dorado D, Soler-Soler J. Normal values of valvular flow velocities determined by Doppler echocardiography: relations with heart rate and age. *Rev Esp Cardiol*. 1996;49(3):189-95.
31. Rivera IR, Moisés VA, de Paola AA, Carvalho AC. Echocardiographic assessment of the pulmonary venous flow: an indicator of increased pulmonary flow in congenital cardiac malformations. *Arq Bras Cardiol*. 2002;78(6):537-44.
32. Mahan G, Dabestani A, Gardin J, Allfie A, Burn C, Henry W, et al. Estimation of pulmonary artery pressure by pulsed Doppler echocardiography. *Circulation*. 1983;68(Suppl 3):III 367.
33. Yock PG, Popp RL. Noninvasive estimation of right ventricular systolic pressure by Doppler ultrasound in patients with tricuspid regurgitation. *Circulation*. 1984;70:657-62.
34. del Cerro MJ, Moledina S, Haworth SG, Ivy D, Dabbagh MA, Banjar H, Diaz G, Heath-Freudenthal A, Galal AN, Humpl T, Kulkarni S, Lopes A,

- Mocumbi AO, Puri GD, Rossouw B, Harikrishnan S, Saxena A, Udo P, Caicedo L, Tamimi O, Adatia I. Cardiac catheterization in children with pulmonary hypertensive vascular disease: consensus statement from the Pulmonary Vascular Research Institute, Pediatric and Congenital Heart Disease Task Forces. *Pulm Circ.* 2016;6(1):118-25.
35. O'Byrne ML, Glatz AC, Hanna BD, Shinohara RT, Gillespie MJ, Dori Y, Rome JJ, Kawut SM. Predictors of catastrophic adverse outcomes in children with pulmonary hypertension undergoing cardiac catheterization: a multi-institutional analysis from the pediatric health information systems database. *J Am Coll Cardiol.* 2015;66(11):1261-9.
36. Bobhate P, Guo L, Jain S, Haugen R, Coe JY, Cave D, Rutledge J, Adatia I. Cardiac catheterization in children with pulmonary hypertensive vascular disease. *Pediatr Cardiol.* 2015;36(4):873-9.
37. Zuckerman WA, Turner ME, Kertein J, Torres A, Vincent JA, Krishnan U, Kerstein D, Rosenzweig EB. Safety of cardiac catheterization at a center specializing in the care of patients with pulmonary arterial hypertension. *Pulm Circ.* 2013;3(4):831-9.
38. Lundell BP, Casas ML, Wallgreen CG. Oxygen consumption in infants and children during heart catheterization. *Pediatr Cardiol.* 1996;17(4):207-13.

39. Rabinovitch M, Guignabert C, Humbert M, Nicolls MR. Inflammation and immunity in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *Circ Res.* 2014;115(1):165-75.
40. Smadja DM, Gaussem P, Mauge L, Israël-Biet D, Dignat-George F, Peyrard S, Agnoletti G, Vouhé PR, Bonnet D, Lévy M. Circulating endothelial cells: a new candidate biomarker of irreversible pulmonary hypertension secondary to congenital heart disease. *Circulation.* 2009;119:374-81.
41. Levy M1, Bonnet D, Mauge L, Celermajer DS, Gaussem P, Smadja DM. Circulating endothelial cells in refractory pulmonary hypertension in children: markers of treatment efficacy and clinical worsening. *PLoS One.* 2013;8(6):e65114.
42. Courboulin A, Tremblay VL, Barrier M, Meloche J, Jacob MH, Chapolard M, Bissierier M, Paulin R, Lambert C, Provencher S, Bonnet S. Kruppel-like factor 5 contributes to pulmonary artery smooth muscle proliferation and resistance to apoptosis in human pulmonary arterial hypertension. *Respir Res.* 2011;12:128.
43. Tulloh RMR, Medrano-Lopez C, Checchia PA, Stapper C, Sumitomo N, Gorenflo M, Jung Bae E, Juanico A, Gil-Jaurena JM, Wu MH, Farha T, Dodge-Khatami A, Tsang R, Notario G, Wegzyn C. CHD and respiratory syncytial virus: global expert exchange recommendations. *Cardiol Young.* 2017;27(8):1504-21.

44. Levitz R, Gao Y, Dozmorov I, Song R, Wakeland EK, Kahn JS. Distinct patterns of innate immune activation by clinical isolates of respiratory syncytial virus. *PLoS One* 2017;12(9):e0184318.
45. Lewandowska-Polak A, Brauncajs M, Paradowska E, Jarzebska M, Kurowski M, Moskwa S, Leśnikowski ZJ, Kowalski ML. Human parainfluenza virus type 3 (HPIV3) induces production of INF γ and RANTES in human nasal epithelial cells (HNECs). *J Inflamm. (London)* 2015;12:16.
46. Duncan M, Wagner BD, Murray K, Allen J, Colvin K, Accurso FJ, Ivy DD. Circulating cytokines and growth factors in pediatric pulmonary hypertension. *Mediators Inflamm.* 2012;2012:143428.
47. Daley E, Emson C, Guignabert C, de Waal Malefyt R, Louten J, Kurup VP, Hogaboam C, Taraseviciene-Stewart L, Voelkel N, Rabinovich M, Grunig E, Grunig G. Pulmonary arterial remodeling induced by a Th2 immune response. *J Exp Med.* 2008;205(2):361-72.
48. Pinto RF, Higuchi M de L, Aiello VD. Decreased numbers of T-lymphocytes and predominance of recently recruited macrophages in the walls of peripheral pulmonary arteries from 26 patients with pulmonary hypertension secondary to congenital cardiac shunts. *Cardiovasc Pathol.* 2004;13:268-75.
49. Zhang B, Shen M, Xu M, Liu LL, Luo Y, Xu DQ, Wang YX, Liu ML, Liu Y, Dong HY, Zhao PT, Li ZC. Role of macrophage migration inhibitory factor

- in the proliferation of smooth muscle cell in pulmonary hypertension. *Mediators Inflamm.* 2012;2012:840737.
50. Kouzu H, Nakatani S, Kyotani S, Kanzaki H, Nakanishi N, Kitakaze M. Noninvasive estimation of pulmonary vascular resistance by Doppler echocardiography in patients with pulmonary arterial hypertension. *Am J Cardio.* 2009;103(6):872-6.
 51. Nakahata Y, Hiraishi S, Oowada N, Ando H, Kimura S, Furukawa S, Ogata S, Ishii M. Quantitative assessment of pulmonary vascular resistance and reactivity in children with pulmonary hypertension due to congenital heart disease using a noninvasive method: new Doppler-derived indexes. *Pediatr Cardiol.* 2009;30:232-9.
 52. Abbas AE, Fortuin D, Schiller NB, Appleton CP, Moreno CA, Lester SJ. A simple method for noninvasive estimation of pulmonary vascular resistance. *J Am Coll Cardiol.* 2003;41(6):1021-7.
 53. Laird TH, Stayer SA, Rivenes SM, Lewin MB, McKenzie ED, Fraser CD, Andropoulos DB. Pulmonary-to-systemic blood flow ratio effects of sevoflurane, isoflurane, halothane, and fentanyl/midazolam with 100% oxygen in children with congenital heart disease. *Anesth Analg.* 2002;95:1200-6.
 54. Ajami GH, Cheriki S, Amoozgar H, Borzouee M, Soltani M. Accuracy of Doppler-derived estimation of pulmonary vascular resistance in

- congenital heart disease: an index of operability. *Pediatr Cardiol.* 2011;32:1168-74.
55. Koestenberger M, Apitz C, Abdul-Khaliq H, Hansmann G. Transthoracic echocardiography for the evaluation of children and adolescents with suspected or confirmed pulmonary hypertension. Expert consensus statement on the diagnosis and treatment of paediatric pulmonary hypertension. The European Paediatric Pulmonary Vascular Disease Network, endorsed by ISHLT and DGPK. *Heart.* 2016;102:ii14-ii22.
56. Rivera IR, Mendonça MA, Andrade JL, Moises V, Campos O, Silva CC, Carvalho AC. Pulmonary venous flow index as a predictor of pulmonary vascular resistance variability in congenital heart disease with increased pulmonary flow: a comparative study before and after oxygen inhalation. *Echocardiography.* 2013;30:952-60.
57. Masuyama T, Kodama K, Kitabatake A, Sato H, Nanto S, Inoue M. Continuous-wave Doppler echocardiographic detection of pulmonary regurgitation and its application to noninvasive estimation of pulmonary artery pressure. *Circulation.* 1986;74:484-92.
58. Murphy DJ, Ludomirsky A, Huhta JC. Continuous-wave Doppler in children with ventricular septal defect: noninvasive estimation of interventricular pressure gradient. *Am J Cardiol.* 1986;57:428-32.
59. Wilkinson JL. Haemodynamic calculations in the catheter laboratory. *Heart.* 2001;85(1):113-20.

60. Schober A. Chemokines in vascular dysfunction and remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28:1950-9.
61. Huang H, Zhang L, Liu R, Chen Y-C, Li X, Zhang Q, Zeng Z. The interleukin (IL)-16 gene polymorphisms and risk of coronary artery disease in Chinese han population. *Circulation.* 2011;124:A15110.
62. Kim MR, Manoukian R, Yeh R, Silbiger SM, Danilenko DM, Scully S, Sun J, DeRose ML, Stolina M, Chang D, Van GY, Clarkin K, Nguyen HQ, Yu YB, Jing S, Senaldi G, Elliot G, Medlock ES. Transgenic overexpression of human IL-17E results in eosinophilia, B-lymphocyte hyperplasia, and altered antibody production. *Blood.* 2002;100(7):2330-40.
63. Nateghi Rostami M, Douraghi M, Miramin Mohammadi A, Nikmanesh B. Altered serum pro-inflammatory cytokines in children with Down's syndrome. *Eur Cytokine Netw.* 2012;23(2):64-7.
64. Nelson PG, Kuddo T, Song EY, Dambrosia JM, Kohler S, Satyanarayana G, Vandunk C, Grether JK, Nelson KB. Selected neurotrophins, neuropeptides, and cytokines: developmental trajectory and concentrations in neonatal blood of children with autism or Down syndrome. *Int J Devl Neurosci.* 2006;24(1):73-80.
65. Caunt M, Hu Liang, Tang T, Brooks PC, Ibrahim S, Karpatkin S. Growth-Regulated Oncogene is pivotal in thrombin-induced angiogenesis. *Cancer Res.* 2006;66(8):4125-32.

66. Jarrah AA, Tarzami ST. The duality of chemokines in heart failure. *Expert Rev Clin Immunol*. 2015;11(4):523-36.
67. Briasoulis A, Androulakis E, Christophides T, Tousoulis D. The role of inflammation and cell death in the pathogenesis, progression and treatment of heart failure. *Heart Fail Rev*. 2016;21(2):169-76.
68. Gullestad L, Ueland T, Vinge LE, Finsen A, Yndestad A, Aukrust P. Inflammatory cytokines in heart failure: mediators and markers. *Cardiology*. 2012;122(1):23-35.
69. Sánchez-Trujillo L, Vásquez-Garza E, Castillo EC, García-Rivas G, Torre-Amione G. Role of adaptive immunity in the development and progression of heart failure: New evidence. *Arch Med Res*. 2017;48(1):1-11.
70. Chang SL, Hsiao YW, Tsai YN, Lin SF, Liu SH, Lin YJ, Lo LW, Chung FP, Chao TF, Hu YF, Tuan TC, Liao JN, Hsieh YC, Wu TJ, Higa S, Chen SA. Interleukin-17 enhances cardiac ventricular remodeling via activating MAPK pathway in ischemic heart failure. *J Mol Cell Cardiol*. 2018;122:69-79.
71. Kaser A, Dunzendorfer S, Offner FA, Ludwiczek O, Enrich B, Koch RO, Cruikshank WW, Wiedermann CJ, Tilg H. B lymphocyte-derived IL-16 attracts dendritic cells and Th cells. *J Immunol*. 2000;65(5):2474-80.
72. Gianoukakis AG, Martino LJ, Horst N, Cruikshank WW, Smith TJ. Cytokine-induced lymphocyte chemoattraction from cultured human

- thyrocytes: evidence for interleukin-16 and regulated upon activation, normal T cell expressed, and secreted expression. *Endocrinology*. 2003;144(7):2856-64.
73. Park SL, Hwang B, Lee SY, Kim WT, Choi YH, Chang YC, Kim WJ, Moon SK. P21WAF1 is required for interleukin-16-induced migration and invasion of vascular smooth muscle cells via the p38MAPK/Sp-1/MMP-9 pathway. *PLoS One*. 2015;10(11):e0142153.
74. Ouyang W, Rutz S, Crellin NK, Valdez PA, Hymowitz SG. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:71-109.
75. Laidlaw BJ, Cui W, Amezcua RA, Gray SM, Guan T, Lu Y, Kobayashi Y, Flavell RA, Kleinstein SH, Craft J, Kaech SM. Production of IL-10 by CD4(+) regulatory T cells during the resolution of infection promotes the maturation of memory CD8(+) T cells. *Nat Immunol*. 2015;16(8):871-9.
76. Chen G, Zuo S, Tang J, Zuo C, Jia D, Liu Q, Liu G, Zhu Q, Wang Y, Zhang J, Shen Y, Chen D, Yuan P, Qin Z, Ruan C, Ye J, Wang XJ, Zhou Y, Gao P, Zhang P, Liu J, Jing ZC, Lu A, Yu Y. Inhibition of CRTH2-mediated Th2 activation attenuates pulmonary hypertension in mice. *J Exp Med*. 2018;215(8):2175-95.
77. Nicolls MR, Voelkel NF. The roles of immunity in the prevention and evolution of pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care*. 2017;195(10):1292-9.

78. Zhou D, Shi F, Xiong Y, Zhou M, Wan H, Liu H. Increased serum Th2 chemokine levels are associated with bronchopulmonary dysplasia in premature infants. *Eur J Pediatr*. 2018 Oct 15.
79. Lopes AA, Barreto AC, Maeda NY, Cícero C, Soares RPS, Bydlowski SP, Rich S. Plasma von Willebrand factor as a predictor of survival in pulmonary arterial hypertension associated with congenital heart disease. *Braz J Med Biol Res*. 2011;44(12):1269-75.
80. Richmond A, Thomas HG. Melanoma growth stimulatory activity: isolation from human melanoma tumors and characterization of tissue distribution. *J Cell Biochem*. 1988;36:185-98.
81. Grover TR, Parker TA, Balasubramaniam V, Markham NE, Abman SH. Pulmonary hypertension impairs alveolarization and reduces lung growth in the ovine fetus. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005;288:L648-L654.
82. Thébaud B, Abman SH. Bronchopulmonary dysplasia: where have all the vessels gone? Roles of angiogenic growth factors in chronic lung disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;175(10):978-85.
83. Gunther S, Fagone P, Jalce G, Atanasov AG, Guignabert C, Nicoletti F. Role of MIF and D-DT in immune-inflammatory, autoimmune, and chronic respiratory diseases: from pathogenic factors to therapeutic targets. *Drug Discov Today*. 2018;pii:S1359-6446(18)30329-5.

84. Grieb G, Kim BS, Simons D, Bernhagen J, Pallua N. MIF and CD74 – suitability as clinical biomarkers. *Mini Rev Med Chem*. 2014;14(14):1125-31.
85. Cui J, Zhang F, Wang Y, Liu J, Ming X, Hou J, Lv B, Fang S, Yu B. Macrophage migration inhibitory factor promotes cardiac stem cell proliferation and endothelial differentiation through the activation of the PI3K/Akt/mTOR and AMPK pathways. *Int J Mol Med*. 2016;37(5):1299-309.
86. Damico R, Simms T, Kim BS, Tekeste Z, Amankwan H, Damarla M, Hassoun PM. p53 mediates cigarette smoke-induced apoptosis of pulmonar endotelial cells: inhibitory effects of macrophage migration inhibitor factor. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011;44(3):323-32.
87. Le Hiress M, Tu L, Ricard N, Phan C, Thuillet R, Fadel E, Dorfmueller P, Montani D, de Man F, Humbert M, Huertas A, Guignabert C. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015;192(8):983-97.
88. Zhang Y, Talwar A, Tsang D, Bruchfeld A, Sadoughi A, Hu M, Omonuwa K, Cheng KF, Al-Abed Y, Miller EJ. Macrophage migration inhibitory factor mediates hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Mol Med*. 2012;18:215-23.
89. Roger T, Schneider A, Weier M, Sweep FC, Le Roy D, Bernhagen J, Calandra T, Giannoni E. High expression levels of machophage

- migration inhibitory factor sustain the innate immune responses of neonates. *Proc Natl Acad Sci USA* 2016;113(8):E997-1005.
90. Maeda NY, Aiello VD, Santos PC, Thomaz AM, Kajita LJ, Bydlowski SP, Lopes AA. Relation of macrophage migration inhibitory factor to pulmonary hemodynamics and vascular structure and carbamyl-phosphate synthetase I Genetic variations in pediatric patients with congenital cardiac shunts. *Mediators Inflamm.* 2018;2018:7305018 – *in press.*
91. Marques RE, Guabiraba R, Russo RC, Teixeira MM. Targeting CCL5 in inflammation. *Expert Opin Ther Targets* 2013;17(12):1439-60.
92. Lin CS, Hsieh PS, Hwang LL, Lee YH, Tsai SH, Tu YC, Hung YW, Liu CC, Chuang YP, Liao MT, Chien S, Tsai MC. The CCL5/CCR5 axis promotes vascular smooth muscle cell proliferation and atherogenic phenotype switching. *Cell Physiol Biochem.* 2018;47(2):707-20.
93. Aldinucci D, Colombatti A. The inflammatory chemokine CCL5 and cancer progression. *Mediators Inflamm.* 2014;2014:292376.
94. Velasco-Velázquez M, Xolalpa W, Pestell RG. The potential to target CCL5/CCR5 in breast cancer. *Expert Opin Ther Targets.* 2014;18(11):1265-75.
95. Gallo M, Frezzetti D, Roma C, Chicchinelli N, Barbieri A, Arra C, Scognamiglio G, Botti G, De Luca A, Normanno N. RANTES and IL-6

- cooperate in inducing a more aggressive phenotype in breast cancer cells. *Oncotarget* 2018;9(25):17543-17553.
96. Bai J, Smock SL, Jackson GR Jr, MacIsaac KD, Huang Y, Mankus C, Oldach J, Roberts B, Ma YL, Klappenbach JA, Crackower MA, Alves SE, Hayden PJ. Phenotypic responses of differentiated asthmatic human airway epithelial cultures to rhinovirus. *PLoS One*. 2015;10(2):e0118286.
 97. Hislop A, Muir DCF, Jacobsen M, Simon G, Reid L. Postnatal growth and function of the pre-acinar airways. *Thorax*. 1972;27(3):265-74.
 98. Pfitzer C, Helm PC, Rosenthal LM, Berger F, Bauer UMM, Schmitt KR. Dynamics in prevalence of Down syndrome in children with congenital heart disease. *Eur J Pediatr*. 2018;177(1):107-15.
 99. Hosokawa S, Vanderpool RR, Ishii T, Nishiyama M, Doi S. What causes pulmonary arterial hypertension in Down syndrome with congenital heart disease? *Circ J*. 2018;82(6):1513-4.
 100. Masaki N, Saiki Y, Endo M, Maeda K, Adachi O, Akiyama M, Kawamoto S, Saiki Y. Is trisomy 21 a risk factor for rapid progression of pulmonary arteriopathy? – revisiting histopathological characteristics using 282 lung biopsy specimens. *Circ J*. 2018;82(6):1682-7.
 101. Galambos C, Minic AD, Bush D, Nguyen D, Dodson B, Seedorf G, Abman SH. Increased lung expression of anti-angiogenic factors in Down syndrome: potential role in abnormal lung vascular growth and the risk for pulmonary hypertension. *PLoS One*. 2016;11(8):e0159005.

102. Fukushima H, Kosaki K, Sato R, Yagihashi T, Gatayama R, Kodo K, Hayashi T, Nakazawa M, Tsuchihashi T, Maeda J, Kojima Y, Yamagishi H, Takahashi T. Mechanisms underlying early development of pulmonary vascular obstructive disease in Down syndrome: An imbalance in biosynthesis of thromboxane A₂ and prostacyclin. *Am J Med Genet A*. 2010;152A(8):1919-24.
103. Saji T. Clinical characteristics of pulmonary arterial hypertension associated with Down syndrome. *Pediatr Int*. 2014;56(3):297-303.
104. Dimopoulos K, Kempny A. Patients with Down syndrome and congenital heart disease: survival is improving, but challenges remain. *Heart* 2016;102(9):1515-7.
105. Laudanski P, Zbucka-Kretowska M, Charkiewicz K, Wolczynski S, Wojcik D, Charkiewicz R. Maternal plasma and amniotic fluid chemokines screening in fetal Down syndrome. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:835837.
106. Foresta C, De Toni L, Magagna S, Galan A, Garolla A. Phosphodiesterase-5 inhibitor tadalafil acts on endothelial progenitor cells by CXCR19 signalling. *Curr Drug Deliv*. 2010;7:274-82.
107. El-Sayed MI, Amin HA. Mechanism of endothelial cyto-protective and thrombo-resistance effects of sildenafil, vardenafil and tadalafil in male rabbit. *Arch Med Sci*. 2015;11:190-8.

108. Tsai BM, Turrentine MW, Sheridan BC, Wang M, Fiore AC, Brown JW, Meldrum DR. Differential effects of phosphodiesterase-5 inhibitors on hypoxic pulmonary vasoconstriction and pulmonary artery cytokine expression. *Ann Thorac Surg.* 2006;81:272-8.
109. Morano S, Mandosi E, Fallarino M, Gatti A, Tiberti C, Sensi M, Gandini L, Buchetti B, Lenti L, Jannini EA, Lenzi A. Antioxidant treatment associated with sildenafil reduces monocyte activation and markers of endothelial damage in patients with diabetic erectile dysfunction: a double-blind, placebo-controlled study. *Eur Urol.* 2007;52:1768-74.
110. Wilson LS, Elbatarny HS, Crawley SW, Bennet BM, Maurice DH. Compartmentation and compartment-specific regulation of PDE5 by protein kinase G allows selective cGMP-mediated regulation of platelet functions. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105:13650-5.
111. Clavé MM, Maeda NY, Thomaz AM, Bydlowski SP, Lopes AA. Phosphodiesterase type 5 inhibitors improve microvascular dysfunction markers in pulmonary arterial hypertension associated with congenital heart disease. *Congenital Heart Disease* 2018;11:1-10.

ANEXOS

ANEXO 1

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO:..... CIDADE

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :SEXO: M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Relação entre padrões hemodinâmicos e mediadores de inflamação em cardiopatias congênitas com comunicações sistêmico-pulmonares

2. PESQUISADOR : Prof. Dr. Antonio Augusto B. Lopes

CARGO/FUNÇÃO: Médico Assistente e Pesquisador da Unid. Clin. Cardiol. Ped. Cardiop. Cong. Adulto

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 34.143

UNIDADE DO HCFMUSP: Instituto do Coração (InCor) – HC.FMUSP

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO RISCO MAIOR

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 3 anos e 6 meses

Termo de consentimento para a coleta de exames (para todos os pacientes) e para uso de tratamento medicamentoso em crianças com cardiopatias congênitas e hipertensão pulmonar (para casos selecionados, com indicação específica).

Esta nossa conversa é um convite para que o seu filho (a) participe conosco de um dos estudos que estão sendo feitos aqui na Instituição visando uma melhoria no tratamento do problema que ele (a) tem. Vamos explicar melhor a vocês qual é esse problema e o que estamos fazendo para cuidar melhor.

Algumas crianças com defeitos de nascimento no coração têm a pressão alta dentro dos pulmões. É parecido com a pressão alta medida no braço. A diferença, é que não existe um aparelhinho simples para medir lá dentro, então, é através do cateterismo que ficamos sabendo se o seu filho (a) tem pressão alta dentro dos pulmões. Crianças com pressão alta nos pulmões não podem ir direto para a operação do coração. O risco é muito alto. No passado, muitas dessas crianças faleceram na operação ou meses depois. Hoje temos remédios específicos para baixar essa pressão, mas para incluir seu filho (a) nesse tipo de tratamento, só com o consentimento de vocês.

Antes de tratarmos seu filho (a), ele (a) terá que realizar vários exames: exames de sangue, ecocardiograma e o cateterismo cardíaco (para alguns pacientes apenas). Mas o cateterismo precisa ser feito mesmo que ele (a) não participe do estudo, pois ele é feito normalmente para sabermos se a operação pode ser feita com segurança (para alguns casos).

Para crianças com pressão alta nos pulmões, o tratamento inicial é feito dentro do hospital. Neste sentido, precisaremos da máxima paciência e colaboração de vocês, porque a sua criança pode precisar ficar algumas semanas no hospital. Não é seguro fazer este tipo de tratamento em casa, pelo menos nas primeiras semanas. Sua permanência com seu filho (a) é permitida nas 24 horas do dia.

Os medicamentos serão dados por boca. Só depois de alguns dias ou semanas é que poderemos dizer se os remédios estão fazendo efeito, e se a sua criança poderá ser operada com maior segurança. Na maioria das crianças, esses remédios não causam nenhum incômodo ou causam incômodos leves que a gente resolve com facilidade. Se for necessário um período mais longo de tratamento (alguns meses, por exemplo) sua criança terá alta hospitalar, e virá a consultas a cada 15 ou 30 dias. Mas a primeira parte do tratamento deve ser dentro do hospital.

Se o tratamento tiver sucesso, se a pressão diminuir dentro dos pulmões da criança, ela será encaminhada para a operação para tentar resolver o problema do coração. Neste caso, mesmo depois da alta hospitalar, os medicamentos continuarão sendo dados em casa, por pelo menos seis meses. Passados seis meses da operação, sua criança fará um segundo cateterismo (este bem curto) para sabermos se os remédios poderão ser retirados, ou se ela continuará precisando desses remédios por mais tempo. Infelizmente, não temos um jeito seguro de dizer que o remédio deve ser dado ou deve ser retirado, a não ser através do cateterismo. Mesmo que tudo esteja normalizado seis meses depois da operação, sua criança permanecerá em acompanhamento ambulatorial conosco, com consultar duas a três vezes por ano, como fazem todas as crianças com problemas no coração.

Durante todo o curso do tratamento, antes da operação ou depois dela, plantonistas de nossa equipe estarão à disposição por 24 horas em nosso pronto-socorro, a fim de esclarecer dúvidas ou resolver problemas que porventura vierem a aparecer. O principal investigador é o Dr. Antonio Augusto Lopes, que pode ser encontrado no endereço Instituto do Coração (InCor), Av. Dr. Eneas de Carvalho Aguiar, 44, Telefone (11) 3069-5000. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em

Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br.

Caso você não concorde que seu filho participe do estudo, ou decida retirá-lo do mesmo, ele continuará a ter acesso a todo o tratamento e acompanhamento médico que tem sido oferecido no Instituto do Coração, sem prejuízo.

Os resultados deste estudo serão analisados com dados de todas as crianças incluídas. Nenhuma criança ou seus responsáveis serão identificados. Todos terão direito a confidencialidade, e serão informados quanto ao andamento do estudo. Todos os resultados serão mantidos em sigilo, e serão utilizados exclusivamente com finalidade médica.

Não existem despesas com relação a exames ou consultas, normais ou extraordinárias. Entretanto, esclarecemos que não haverá compensação financeira por sua participação.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "Relação entre padrões hemodinâmicos e mediadores de inflamação em cardiopatias congênitas com comunicações sistêmico-pulmonares".

Eu discuti com o Dr. Antonio Augusto Lopes sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data / /

Assinatura da testemunha Data / /

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data / /

ANEXO 2

Dados ecocardiográficos, hemodinâmicos, terapêuticos e de biópsia pulmonar nos pacientes do Grupo 1

PACIENTE	VTIvp (cm) (ecocardiografia)	Qp/Qs (ecocardiografia)	PMAP basal (cateterismo)	Dias de sildenafil pré-operatória	Dose máxima sildenafil	Biópsia pulmonar (análise qualitativa)
ACS	22,5	1,3	43	9	1,5	II
AFC	13,5	1,4	41	50	3	-
RSAP	20,3	0,7	49	28	4	I
AVSM	15,9	1,8	66	55	4	III
JPZM	15	2,6	42	15	2	I
NAOS	21	2,0	46	27	3	-
ESVF	23,8	1,9	43	20	3	I
BTSO	17,3	1,3	52	41	3	IV
ICO	22,4	2,6	66	9	1,5	I
EVMS	21,7	3,2	41	26	4	I
MVSF	21,9	5,9	67	18	1,5	II
GCBR	28,9	2,2	79	70	5	-
LCS	22,2	2,4	42	89	5	IV
ACPSS	15	2,2	62	49	3,5	-
AKAA	27	-	54	27	3	-
ARA	19	1,1	76	10	3	-

Qp/Qs: razão entre os fluxos pulmonar e sistêmico; VTIvp: integral velocidade-tempo de veia pulmonar; PMAP: pressão média arterial pulmonar

ANEXO 3

Dados demográficos e diagnósticos individuais dos pacientes recrutados para o estudo

Nº	PACIENTE	PESO (Kg)	SÍNDROME DE DOWN	CARDIOPATIA
1	IPBS	4,6	Não	CIV
2	JNL	6,9	Não	CIA / CIV
3	JSS	11,6	Não	DSAV
4	EAR	4,8	Sim	DSAV
5	MCBF	3	Não	CIA / CIV / PCA
6	EMSF	10	Não	CIV
7	LAS	12,4	Sim	DSAV
8	JRVDN	7,1	Sim	CIA / CIV / PCA
9	LMSB	3,6	Sim	DSAV
10	BAF	4,1	Sim	DSAV
11	HC	6,7	Sim	CIV
12	NS	6,1	Não	CIA / CIV
13	NDSS	7,3	Sim	CIV
14	SPS	7,1	Não	CIV
15	GVO	6,8	Sim	CIV
16	MEXC	6,1	Sim	DSAV
17	NST	5,7	Sim	DSAV / PCA
18	KKSS	3,8	Sim	DSAV / PCA
19	RMOS	6,3	Sim	DSAV / PCA
20	JGSG	4,8	Sim	DSAV
21	LNC	5,7	Sim	CIA / CIV
22	KRS	8,1	Sim	CIA / CIV
23	WEMR	5,7	Não	CIV
24	JPG	9,5	Não	CIV
25	ARPJ	7,0	Sim	CIV

continua...

...continuação

Nº	PACIENTE	PESO (Kg)	SÍNDROME DE DOWN	CARDIOPATIA
26	KCFS	6,0	Sim	CIV
27	CHPM	5,2	Sim	DSAV
28	LAC	4,1	Não	CIA / CIV
29	LASS	4,7	Sim	DSAV
30	ESLA	7,9	Sim	CIA (DSAV)
31	TCM	4,3	Sim	DSAV
32	ACS	6,3	Sim	DSAV
33	AFC	7,9	Sim	CIA / PCA
34	RSAP	6,6	Sim	DSAV / PCA
35	AVSM	10,4	Sim	CIV / PCA
36	JPZM	6,1	Não	CIV
37	NAOS	5,4	Sim	DSAV / PCA
38	ESVF	10	Não	CIV
39	BTSO	5,6	Sim	CIA / CIV / PCA
40	ICO	5,8	Sim	DSAV / PCA
41	EVMS	4,7	Sim	DSAV
42	MVSF	14,9	Não	CIV
43	GGBR	5,2	Sim	DSAV
44	LCS	6,1	Sim	DSAV
45	*ACPSS	10,8	Não	CIV
46	*AKAA	9,7	Não	TAC
47	*ARA	12,5	Sim	CIA

(*) Pacientes que receberam sildenafil, mas foram contra-indicados para o tratamento cirúrgico da cardiopatia.

DSAV: defeito do septo atrioventricular; CIV: comunicação interatrial; PCA: comunicação interatrial; PCA: persistência do canal arterial; TAC: tronco arterial comum

ANEXO 5

Níveis séricos das proteínas analisadas nos controles pediátricos (N = 13)

Nº	ID	PROTEÍNAS																																	
		C5Ch	CD40L	GCSF	GMCSF	GROα	I309	ITAC	IPNg	IL40	IL10p70	IL13	IL16	IL17	IL18	IL23	IL27	IL32α	IL4	IL5	IL6	IL8	IL17E	IP10	MCP1	MIP1α	MIP1β	RANTES	SDF1	Serpine1	sICAM1	sTREM1	TNFα		
1	G0611	432,22	561,09	95,49	54,43	446,58	162,15	527,77	44,05	0	94,99	12,94	14,86	177,02	0	0	214,04	0	0	0	0	92,24	0	0,08	654,19	0	145,04	448,23	174,4	34761,19	176,76	38752,26	18483,23	0	292,49
2	G0602	207,08	233,13	20,72	262,73	233,24	343,82	697,19	38,26	118,27	33,61	330,29	997,9	176,18	400,26	110,32	514,84	26,36	0	33,2	84,43	227,09	82,33	407,29	2648,38	93,32	972,48	388,6	1617,9	32744,87	72,79	37627,56	26286,29	182,24	306,38
3	G0603	219,05	399,66	92,27	103,69	241,01	327,33	332,71	317,19	9,3	32,09	379	1097,17	2237	176,46	200,03	68,33	834,31	0	42,77	0	481,11	54,08	306,73	604,38	1382	866,24	78	0	69768,09	176,11	51792,28	46234,39	63,89	103,82
4	G0604	240,78	820,73	462,69	0	336,52	246,14	261,04	97,63	0	76,51	629,37	2014,36	0	24,55	0	320,48	132,74	0	63,69	0	31,32	461,11	310,01	47,9	844,42	653	0	83071,03	789,3	46971,2	46033,98	148,77	69,29	
5	G0605	254,6	6713,36	26,02	274,17	1049,93	186,46	742	93,92	335,03	306,28	699,35	105,14	186,6	13	779,15	97,92	0	0	95,69	316,4	286,69	303,62	303,95	772,39	370,37	370,37	222,29	78872,29	238,36	33060,58	24393,7	164,26	35,49	
6	G0606	178,07	2443,33	72,71	116,16	626,07	128,33	286,3	69,77	116,46	158,41	422,86	101,13	22,14	599,33	1115,32	115,64	161,21	0	51,03	82,29	98,09	77,01	30,32	276,97	192,24	469,29	42,25	3124	8717,61	292,27	5997,78	42862,48	133,47	95,52
7	G0607	202,22	2571,6	103,97	6,68	285,63	117,68	243,23	62,25	64,5	14,63	94,04	27,66	109,63	167,14	187,36	36,97	916,69	0	26,38	27,59	93,96	41,29	93,48	671,33	253,65	684,91	51,91	1722	59605,68	178,01	1350	49464,96	44,96	69,67
8	G0608	225,9	2531,6	36,75	4,39	193,91	366,45	176,67	83,7	28,8	26,77	697,16	891,2	0	250,4	338,62	153,33	6,67	68,82	0	41,38	232,2	26,36	201,9	212,31	94,67	307,15	0	0	27626,73	91,39	33348,86	53286,3	34,09	31,51
9	G0609	126,15	346,69	273,84	146,73	1271,88	481	359,12	193,17	113,04	24,53	934,27	143,08	78,01	420,97	760,01	57,61	370,04	0	93,37	66,38	276,37	183,51	23,35	263,88	362,41	242,11	158,22	52411,79	172,22	35029,79	48923,31	176,41	282,31	
10	G0610	137,95	1212,39	226,75	87,26	161	176,17	674	30,69	324,2	336,18	178,61	212,86	496,03	332,88	107,7	262,43	114,43	97,1	266,66	232,88	135,69	264,18	264,08	869,89	117,4	275,84	23,37	248,83	18224,08	264,4	40762	4496,3	32,42	142,27
11	G0611	1148,39	2979,55	334,44	300,26	169,67	193,22	207,22	0	34,38	461	589,2	482,31	0	132,68	83,4	684,78	68,78	53,32	0	41,17	33,27	35,7	263,95	273,37	343,88	460,29	76,8	4837	6882,02	26,67	38333,67	5297,21	52,85	81,14
12	G0612	172,36	377,41	263,67	211,77	376,2	172,53	377,55	94,16	93,03	67,79	643,69	142,5	172,83	32,41	972,47	67,22	242,5	0	33,95	222,9	183,0	67,71	87,33	246,1	477,81	75,3	117,53	9163,77	177,92	36215,66	5188,76	175,02	205,14	
13	G0613	88,271	146,38	82,42	9,9	1674,15	42,68	109,37	38,31	24,6	72,2	192,37	44,9	0	13,99	19,7	1807,08	4,26	8,16	0	13,44	23,37	226,91	3041,9	504,15	683,66	43,99	361,2	10220,72	6,68	28633,89	34717,4	63,68	69,84	

Abreviaturas: com exceção das "IL" (interleucinas), as citocinas envolvidas no estudo são apresentadas conforme a denominação em língua inglesa. C5CSa: Complement component 5/5a; sCD40L: Soluble CD40 ligand; G-CSF: Granulocyte-colony stimulating factor; GM-CSF: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; GROα: Growth-related oncogene alpha; I-309: Human CC chemokine I-309; sICAM-1: Soluble intercellular adhesion molecule 1; IFN-γ: Interferon gamma; IP-10: Interferon gamma-induced protein 10; I-TAC: Interferon gamma-inducible T-cell alpha chemoattractant; MCP-1: Monocyte chemoattractant protein-1; MIF: Macrophage migration inhibitory factor; MIP-1α: Macrophage inflammatory protein 1 alpha; MIP-1β: Macrophage inflammatory protein 1 beta; Serpin E1: Serine protease inhibitor E1; RANTES: Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted; SDF-1: Stromal cell-derived factor 1; TNF-α: Tumor necrosis factor alpha; sTREM-1: Soluble triggering receptor expressed on myeloid cells 1.

ANEXO 6
Publicações

Research Article

Serum Cytokines in Young Pediatric Patients with Congenital Cardiac Shunts and Altered Pulmonary Hemodynamics

Leína Zorzaneli,¹ Nair Yukie Maeda,² Mariana Meira Clavé,¹ Vera Demarchi Aiello,¹ Marlene Rabinovitch,³ and Antonio Augusto Lopes¹

¹Heart Institute, University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, SP, Brazil

²Pró-Sangue Foundation, São Paulo, SP, Brazil

³Stanford University School of Medicine, Stanford, CA, USA

Correspondence should be addressed to Antonio Augusto Lopes; aablopes@usp.br

Received 19 May 2016; Accepted 7 August 2016

Academic Editor: Dianne Cooper

Copyright © 2016 Leína Zorzaneli et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Background and Objective. Inflammation is central in the pathogenesis of pulmonary hypertension. We investigated how serum cytokines correlate with clinical features, hemodynamics, and lung histology in young patients with pulmonary hypertension associated with congenital cardiac shunts. **Design.** Prospective, observational study. **Methods and Results.** Patients ($n = 44$) were aged 2.6 to 37.6 months. Group I patients ($n = 31$) were characterized by pulmonary congestion and higher pulmonary blood flow compared to group II ($p = 0.022$), with no need for preoperative cardiac catheterization. Group II patients ($n = 13$) had no congestive features. At catheterization, they had elevated pulmonary vascular resistance ($5.7 [4.4-7.4]$ Wood units·m², geometric mean with 95% CI). Cytokines were measured by chemiluminescence. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) was found to be inversely related to pulmonary blood flow ($r = -0.33$, $p = 0.026$) and was higher in group II (high pulmonary vascular resistance) compared to group I (high pulmonary blood flow) ($p = 0.017$). In contrast, RANTES chemokine (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted) was characteristically elevated in Group I ($p = 0.022$). Interleukin 16 was also negatively related to pulmonary blood flow ($r_s = -0.33$, $p = 0.029$) and was higher in patients with obstructive vasculopathy at intraoperative lung biopsy ($p = 0.021$). **Conclusion.** Cytokines seem to be important and differentially regulated in subpopulations of young patients with cardiac shunts.

1. Introduction

Inflammation and altered immune processes are involved in all forms of pulmonary vascular disease underlying pulmonary hypertension, particularly, pulmonary arterial hypertension (PAH) [1]. Perivascular inflammatory elements have been reported in several etiologies of PAH, from the idiopathic form to PAH associated with autoimmune disorders [2–4]. Inflammatory mediators have been investigated in pediatric PAH, including PAH associated with congenital heart disease (PAH-CHD) [5–9]. Studies generally include patients over a wide age range, from infancy to adolescence, with multiple etiologies of PAH.

There has been scarce literature on the role of inflammatory mediators in the specific population of young pediatric patients with CHD and pulmonary hypertension who are

being considered for surgical repair of their cardiac anomalies. These patients generally have communications between cardiac chambers or the great arteries leading to increased pulmonary blood flow and pressure. Progressive remodeling of pulmonary arteries causes elevation of pulmonary vascular resistance (PAH-CHD). Structural and functional pulmonary vascular abnormalities are sometimes early, unsuspected, and progressive even in young individuals treated for their cardiac lesions in a timely manner [10].

There are reasons for studying inflammation and immune response in young patients with congenital cardiac communications undergoing surgery. Inflammatory cells, mediators, and related molecules have been shown to be closely associated with phenomena that occur early in pulmonary microvasculature, such as medial hypertrophy, muscularization of distal arteries, and intimal proliferative lesions

[5, 11, 12]. These abnormalities constitute the anatomical basis for increased pulmonary vasoreactivity that occurs postoperatively as a result of vasospastic stimuli. Although the incidence of the so-called postoperative pulmonary hypertensive crises has decreased to less than 1% due to contemporary practice in privileged communities, the mortality has been estimated at 20–30% [13]. Pulmonary hypertension has been identified as a major contributor to prolonged mechanical ventilation and length of stay in hospital [14]. After discharge, some patients remain at a higher risk of persistent pulmonary hypertension despite successful surgery.

We therefore planned this study to investigate inflammatory mediators in young pediatric patients being considered for surgical repair of congenital cardiac communications. We wished to investigate how serum cytokines and related molecules correlate with patterns of clinical presentation, pulmonary hemodynamics, and pulmonary vascular abnormalities assessed by intraoperative lung biopsy.

2. Methods

2.1. Patients and Clinical Presentation. The study population consisted of young pediatric subjects (up to the age of 3 years) with congenital cardiac shunts admitted to the Heart Institute, University of São Paulo, Brazil, for surgical repair of their anomalies. From March 2012 to March 2015, 44 patients with nonrestrictive cardiac communications were enrolled, as they were suspected to have at least moderate elevation of pulmonary artery pressure. These patients correspond to 20–25% of all pediatric subjects with cardiac shunts undergoing surgery in the institution. After complete non-invasive evaluation, 31 patients were considered as suitable for surgery with no need for cardiac catheterization (study group I, clinical features of pulmonary overcirculation with pulmonary congestion). The remaining 13 patients presented with features that suggested higher levels of pulmonary vascular resistance: relatively late presentation with no history of failure to thrive, small-sized heart with no significant enlargement of left cardiac chambers, and absence of pulmonary congestion despite the size of the cardiac communication and bidirectional shunting. Preoperative cardiac catheterization was considered as necessary (study group II). Patients with these features generally correspond to less than 10% of pediatric subjects with cardiac shunts treated in the institution. Subjects with smaller septal defects not associated with pulmonary hypertension and those with advanced pulmonary vasculopathy precluding surgery were excluded. Neonates, patients under intensive care, and those with relevant comorbidities or extracardiac syndromes other than Down syndrome were also excluded. Written informed consent was obtained from the parents before inclusion. The study protocol was approved by the institutional Scientific and Ethics Committee, CAPPEsq #0502-11.

2.2. Pulmonary Hemodynamics and Vascular Abnormalities. We used the following parameters to characterize hemodynamic and structural changes in pulmonary circulation: (1) pulmonary blood flow estimated noninvasively by transthoracic echocardiography, (2) pulmonary vascular resistance

assessed by cardiac catheterization, and (3) morphology of pulmonary vessels assessed by direct analysis of lung biopsy specimens.

2.2.1. Doppler Echocardiography. Transthoracic echocardiography was performed in all patients to define cardiovascular anatomy and assess the severity of pulmonary hypertension. The direction of flow across the cardiac communications and the size of the left cardiac chambers were taken into account when classifying patients as group I or group II. Left-to-right shunting (exclusive or predominant) in the presence of an enlarged left heart was considered as indicative of increased pulmonary blood flow (group I) whereas bidirectional shunting with a relatively small-sized left heart was suggestive of heightened pulmonary vascular resistance (group II). Of the parameters that were recorded, the characteristics of pulmonary venous flow were taken as an indirect estimate of total pulmonary blood flow. At least two pulmonary veins were selected and examined in all patients (same observer, LZ). The velocity-time integral of pulmonary venous blood flow was obtained (VTI_{PV} , cm), and a mean value per patient was calculated. VTI_{PV} has been shown to be inversely related to pulmonary vascular resistance [15]. The pulmonary-to-systemic blood flow ratio (Q_p/Q_s) was also estimated [16], but it was considered less accurate in some cases due to the presence of a communication distal to the aortic and pulmonary valves (patent ductus arteriosus).

2.2.2. Cardiac Catheterization. Invasive assessment of pulmonary hemodynamics was considered only for patients suspected to have higher levels of pulmonary artery pressure and vascular resistance on the basis of the clinical history, physical examination, and echocardiographic evaluation. Catheterization was carried out under general anesthesia and mechanical ventilation. Pulmonary and systemic blood flow were determined separately using the Fick method. However, to avoid error due to the use of assumed oxygen consumption while calculating blood flow [17], we decided to express the magnitude of pulmonary hemodynamic abnormalities by calculating the pulmonary-to-systemic vascular resistance ratio (PVR/SVR), with no need for considering the level of oxygen consumption.

2.2.3. Lung Biopsy Assessment. Lung biopsies are not performed routinely in our institution. In this study, lung biopsy specimens were collected intraoperatively in selected cases: from group II patients if the surgeon considered the procedure low risk on an individual basis and from group I patients if the elevation of pulmonary artery pressure represented a problem during weaning from cardiopulmonary bypass. Thus, lung tissue was available for analysis in 13 of our patients (9 and 4 individuals from group II and group I, resp.). Specimens were collected with the airways distended, fixed in buffered formalin, and subjected to routine histological processing. Four-micrometer-thick sections were obtained and stained with hematoxylin-eosin and Miller's elastic stain. Vascular abnormalities were graded according to the Heath-Edward's classification for pulmonary vascular

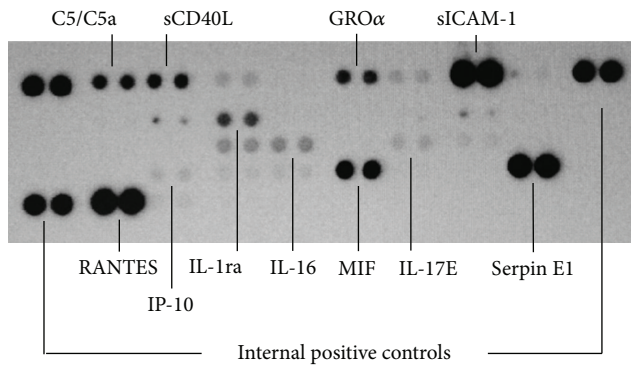


FIGURE 1: Representative immunoblotting for semiquantitative analysis of proteins investigated in the study. C5/C5a: complement component 5/5a; sCD40L: soluble CD40 ligand; GRO α : growth-regulated oncogene alpha; IL-16: interleukin 16; IL-1ra: interleukin-1 receptor antagonist; IL-17E: interleukin 17E; IP-10: interferon gamma-induced protein-10; MIF: macrophage migration inhibitory factor; RANTES: regulated on activation, normal T cell expressed and secreted; sICAM-1: soluble intercellular adhesion molecule-1.

lesions associated with congenital heart disease [18]. Grades I and II correspond to isolated medial hypertrophy of the pulmonary arteries and intimal nonocclusive proliferation, respectively. Grades III through VI correspond to more advanced vascular abnormalities, including occlusive intimal proliferation, plexiform and dilated lesions, and necrotizing arteritis.

2.3. Inflammatory Mediators. Peripheral venous blood was collected, and serum samples were obtained and stored at -80°C . Cytokines and related proteins were analyzed using a human cytokine array (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). After protein immobilization on nitrocellulose membranes, processing (immunoblotting) was carried out using specific antibodies as previously described [19]. Chemiluminescence was used for semiquantitative detection. The average signal (pixel density) of the pair of duplicate spots representing each protein was normalized using internal controls. Of the 36 inflammatory mediators that were potentially measurable, we analyzed only the proteins that we detected with adequate signal in all patients (Figure 1). These included complement component 5/5a (C5/C5a), soluble CD40 ligand (sCD40L), growth-regulated oncogene alpha (GRO α), interleukins 16 and 17E (IL-16, IL-17E), interleukin-1 receptor antagonist (IL-1RA), interferon gamma-induced protein-10 (IP-10), macrophage migration inhibitory factor (MIF), regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES), Serpin E1, and soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1).

2.4. Statistical Analysis. Results involving numeric variables are expressed as geometric mean with 95% CI. For categorical variables, the number of patients is given, with percentages when appropriate. Differences between groups were analyzed using Student's *t*-test or the Mann-Whitney test for numeric variables or the Chi-square family of tests (including Fisher's

exact test and the likelihood ratio) for categorical variables. Correlations were tested by calculating Pearson's coefficient (*r*) or Spearman's coefficient (*r_s*). For regression analyses, logarithmic transformation (Ln) of the dependent variable was sometimes necessary to obtain adequate closeness to the normal distribution. In all tests a *p* value lower than 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

Forty-four patients were enrolled, with an age range of 2.6 to 37.0 months. Cardiac anomalies were relatively simple, consisting of pretricuspid and posttricuspid defects in biventricular hearts. Demographic and diagnostic data of patients classified as group I or group II are shown in Table 1. Group II patients tended to be a little older and had lower systemic oxygen saturation, probably due to some degree of right-to-left shunting across the septal defects. Consistent with this, echocardiographic parameters (Qp/Qs ratio and VTI_{PV}) pointed toward lower pulmonary blood flow in group II patients compared to group I (Table 1). At catheterization, they had a mean pulmonary arterial pressure of 52 (95% CI 45–59) mmHg, a pulmonary vascular resistance of 5.7 (95% CI 4.4–7.4) Wood units \times m², and a pulmonary-to-systemic vascular resistance ratio of 0.39 (95% CI 0.31–0.50).

3.1. Cytokines and Clinical Presentation. As shown in Table 2, MIF chemokine concentration was higher in group II, where patients were assumed to have higher levels of pulmonary vascular resistance, whereas RANTES chemokine was more closely related to group I, corresponding to subjects with clinical features suggestive of increased pulmonary blood flow. The level of GRO α chemokine was higher early in life and decreased with increasing age (Table 2). The tendency toward higher GRO α levels in group I was probably because group I patients were a little younger compared to group II. In contrast, IL-17E increased with increasing age (Table 2).

3.2. Correlations with Hemodynamic Parameters Assessed Noninvasively and Invasively. Consistent with the observation of higher MIF levels in group II patients was the negative correlation between MIF concentration and pulmonary blood flow estimated noninvasively by measuring VTI_{PV}. A similar negative correlation was obtained for IL-16 (Table 2 and Figure 2). In group II, IP-10 chemokine level correlated positively with pulmonary vascular resistance (Table 2 and Figure 2). The correlation was negative for Serpin E1.

3.3. Cytokines and Lung Biopsy Findings. Nine of the 13 patients who were subjected to intraoperative lung biopsy had pulmonary vascular lesions classified as grade I (5 cases) or grade II (4 cases). The remaining ones had more advanced lesions classified as grade III (3 patients) or grade IV (1 patient, Figure 3). Consistent with the negative correlation of IL-16 with pulmonary blood flow (VTI_{PV}, Table 2 and Figure 2) was the observation of higher IL-16 levels in the subgroup of patients with more advanced pulmonary vascular abnormalities (Figure 3). No other significant correlations were observed.

TABLE 1: Demographic and diagnostic data in patient groups.

	Group I (<i>n</i> = 31)	Group II (<i>n</i> = 13)	<i>p</i> value
Age (months)	8.6 (6.8–10.8)	12.7 (9.0–18.0)	0.068*
Gender (M : F)	13 : 18	4 : 9	0.723 [†]
Down syndrome (present : absent)	21 : 10	10 : 3	0.722 [‡]
Weight (Kg)	6.01 (5.32–6.80)	6.73 (5.44–8.34)	0.537*
O ₂ sat. (%)	96 (95–97)	92 (90–95)	0.011 *
Diagnosis			
A	1 (3%)	0 (0%)	
B	17 (55%)	6 (46%)	0.573 [§]
C	13 (42%)	7 (54%)	
Echocardiography			
PAP (mmHg)	41 (34–49)	45 (38–53)	0.487*
Qp/Qs	2.7 (2.3–3.0)	1.9 (1.4–2.6)	0.022 *
VTI _{PV} (cm)	23.3 (21.5–25.3)	20.2 (17.7–22.9)	0.080*

Results are shown as geometric mean (95% CI) or number of cases and percentage.

*Mann–Whitney test.

[†]Chi-square test.

[‡]Fisher's exact test.

[§]Likelihood ratio.

^{||}A: pretricuspid defects, B: posttricuspid defects except for atrioventricular septal defects, C: atrioventricular septal defects.

O₂ sat.: peripheral oxygen saturation; Qp/Qs: pulmonary-to-systemic blood flow ratio; PAP: mean pulmonary arterial pressure estimated based on pulmonary insufficiency jet velocity; VTI_{PV}: velocity-time integral of blood flow in pulmonary veins.

3.4. Postoperative Pulmonary Vasoconstriction. Hemodynamic instability requiring specific therapeutic interventions occurred in 12 patients (6 individuals in each group), and there was a fatal outcome in two of them (group II). When considering only patients who had a lung biopsy specimen available for analysis (*n* = 13), clinically relevant postoperative pulmonary vasoconstriction occurred in 4 of 9 subjects with vascular lesions graded as I or II, and only one of 4 subjects with lesions graded as III or IV. Patients who died had grade I and grade II pulmonary vasculopathy. Preoperative oxygen saturation was lower in patients who had postoperative pulmonary vasoconstrictive episodes compared to those who did not (93% [91–95%] and 95% [94–97%], resp., *p* = 0.013). No other associations with preoperative variables were observed. The 27% incidence of postoperative pulmonary vascular tone instability was considerably higher than the 8% incidence in similar patients from our institution without clinical evidence of pulmonary hypertension.

4. Discussion

There is general agreement that patients with nonrestrictive cardiac communications and absence of clinical and echocardiographic evidence of pulmonary overcirculation may have pulmonary vascular changes that eventually preclude surgery [20]. In theory, any patients with group II characteristics, with a low VTI_{PV} and a high PVR/SVR ratio, would belong to this “high-risk” population. Of note, however, was the observation that postoperative pulmonary vasospastic episodes may occur even in subjects with group I characteristics, or those who have vascular abnormalities considered to be potentially reversible (Grade I). There seems to be a potential

for occurrence of vascular tone instability leading to life-threatening hemodynamic disturbances all throughout the spectrum of pulmonary vascular changes. We did not test for direct correlations between preoperative cytokine levels and postoperative pulmonary vasoconstriction. Actually, pulmonary vascular tone instability is probably more closely related to perioperative than preoperative proinflammatory events. We focused essentially on the analysis of the preoperative scenario where pulmonary vascular remodeling is usually already present to a variable degree.

We identified associations between serum inflammatory mediators and patterns of clinical presentation, hemodynamics, and the morphology of pulmonary arteries, with potential pathophysiological significance. MIF and RANTES chemokines were easily analyzed, as they appeared in all of the membranes with a strong chemiluminescence signal (Figure 1). Higher concentration of MIF was a characteristic of group II patients, and MIF concentration correlated negatively with pulmonary blood flow estimated by transthoracic echocardiography (VTI_{PV}). In contrast, RANTES was higher in group I, where patients had features compatible with pulmonary overcirculation with congestion.

MIF and RANTES chemokines are expressed by various cells and tissues under different conditions. MIF is a non-canonical ligand of CXCR2 and CXCR4 chemokine receptors and the CXCR2/CD74 complex. Its pleiotropic nature is illustrated by the activation of several signaling pathways that results in inhibition of endothelial cell apoptosis and induction of smooth muscle cell proliferation [1]. Its binding to the CXCR2/CD74 complex elicits chemotaxis and the arrest of mononuclear cells, which is central to inflammatory disorders and atherogenesis [21–23]. In clinical and experimental pulmonary hypertension, MIF is associated with

TABLE 2: Correlations of inflammatory mediators with clinical, echocardiographic, and hemodynamic parameters.

	Group I (<i>n</i> = 31)	Group II (<i>n</i> = 13)	<i>p</i> value	Age (<i>n</i> = 44)	VTI _{PV} (<i>n</i> = 44)	PVR/SVR (<i>n</i> = 13)
C5/C5a	2058 (1751–2419)	2504 (1953–3209)	0.169*	$r_s = -0.002$ $p = 0.988$	$r_s = -0.16$ $p = 0.301$	$r_s = -0.17$ $p = 0.583$
sCD40L	2541 (2008–3216)	2046 (1403–2983)	0.252*	$r_s = -0.19$ $p = 0.227$	$r_s = 0.04$ $p = 0.809$	$r_s = -0.32$ $p = 0.287$
GRO α	2005 (1592–2525)	1568 (1148–2141)	0.087*	$r_s = -0.46$ $p = 0.002$	$r_s = 0.05$ $p = 0.743$	$r_s = -0.06$ $p = 0.837$
IL-16	748 (650–861)	782 (556–1100)	0.807*	$r_s = 0.13$ $p = 0.420$	$r_s = -0.33$ $p = 0.029$	$r_s = 0.12$ $p = 0.693$
IL-1ra	1361 (1119–1655)	1366 (1014–1841)	0.949*	$r_s = -0.02$ $p = 0.923$	$r_s = 0.14$ $p = 0.372$	$r_s = 0.45$ $p = 0.121$
IL-17E	150 (118–190)	158 (109–230)	0.728*	$r_s = 0.33$ $p = 0.028$	$r_s = -0.52$ $p = 0.735$	$r_s = 0.26$ $p = 0.398$
IP-10	754 (575–988)	618 (390–977)	0.512*	$r_s = -0.07$ $p = 0.635$	$r_s = 0.20$ $p = 0.192$	$r_s = 0.70$ $p = 0.008$
MIF	6706 (5889–7636)	8737 (7009–10891)	0.017 [†]	$r = -0.09$ $p = 0.557$	$r = -0.33$ $p = 0.026$	$r = 0.03$ $p = 0.916$
RANTES	71073 (63545–79492)	50228 (36485–69148)	0.022 [†]	$r = -0.02$ $p = 0.882$	$r = 0.21$ $p = 0.166$	$r = -0.21$ $p = 0.482$
Serpin E1	46149 (42119–50563)	43007 (35453–52172)	0.555 [†]	$r = -0.05$ $p = 0.764$	$r = -0.01$ $p = 0.959$	$r = -0.64$ $p = 0.019$
sICAM-1	47666 (41657–54541)	42635 (35434–51298)	0.238 [†]	$r = -0.09$ $p = 0.556$	$r = 0.13$ $p = 0.411$	$r = -0.21$ $p = 0.497$

Protein levels are expressed as pixel density (geometric mean with 95% CI).

Reference values from 13 healthy pediatric subjects aged 10–38 months (data our laboratory): C5/C5a: 1726 (1434–3554); sCD40L: 2715 (2074–3554); GRO α : 1893 (1452–2467); IL-16: 630 (450–882); IL-1ra: 1513 (1089–2103); IL-17E: 228 (166–315); IP-10: 621 (412–936); MIF: 5547 (4487–6857); RANTES: 59692 (51567–69096); Serpin E1: 39810 (34442–46014); sICAM-1: 44185 (37272–52379).

“*r*” and “*r_s*,” respectively, Pearson’s coefficient of correlation and Spearman’s coefficient of correlation.

*Mann–Whitney test.

[†]Student’s *t*-test.

PVR/SVR: pulmonary-to-systemic vascular resistance ratio; VTI_{PV}: velocity-time integral of blood flow in pulmonary veins.

C5/C5a: Complement component 5/5a; sCD40L: soluble CD40 ligand; GRO α : growth-regulated oncogene alpha; IL-16: interleukin 16; IL-1ra: interleukin-1 receptor antagonist; IL-17E: interleukin 17E; IP-10: interferon gamma-induced protein-10; MIF: macrophage migration inhibitory factor; RANTES: regulated on activation, normal T cell expressed and secreted; sICAM-1: soluble intercellular adhesion molecule-1.

a proinflammatory endothelial cell behavior, exaggerated recruitment of peripheral blood mononuclear cells, and increased smooth muscle cell growth [11, 24, 25]. RANTES is a CC chemokine shown to be involved in a number of biological events including chemotaxis, perivascular inflammation, and vascular response to injury [26, 27]. Of note, RANTES expression has been demonstrated in viral diseases [28], and it is widely appreciated that infants with pulmonary congestion due to cardiac shunts (group I patients in this study) are predisposed to respiratory infections. Thus, a possibility exists that repeated exposures to viral agents contribute to the development of a proinflammatory microenvironment, with expression of molecules known to influence vascular remodeling.

Another cytokine with potential pathophysiological implication is IL-16. Levels were higher in subjects with histological grades III and IV and correlated negatively with noninvasively estimated pulmonary blood flow. IL-16 is a lymphocyte chemoattractant factor well known for its role in immune responses, but there has been scarce literature on its role in vascular disorders [29]. IL-16 and its receptor CD4 are expressed in vascular smooth muscle cells. They induce

migration and invasion of vascular smooth muscle cells in a p21WAF1-dependent manner, via the p38MAPK/Sp-1/MMP-9 pathway. For this reason, they are being considered as potential targets in the treatment of diseases such as atherosclerosis and restenosis [30]. The pathophysiological role of IL-16 and downstream signaling molecules in PAH have not been investigated yet.

We also observed significant correlations of IL-17E (positive) and GRO α (negative) with patient age, considered as an index of disease severity and progression in PAH-CHD [31, 32]. IL-17E and MIF are capable of eliciting a Th2-type immune response [33, 34] shown to be involved in experimental pulmonary vascular remodeling [35]. GRO α is a CXC chemokine known to play a central role in thrombin-induced angiogenesis associated with tumor growth [36]. A potential implication for the age-dependent decrease in GRO α is that reduction of distal pulmonary vessels does occur in pulmonary hypertension associated with CHD and probably precedes obliterative pulmonary vasculopathy [37].

In patients subjected to catheterization, there was a positive correlation between serum IP-10 and pulmonary vascular resistance. IP-10 is a CXC chemokine known to be

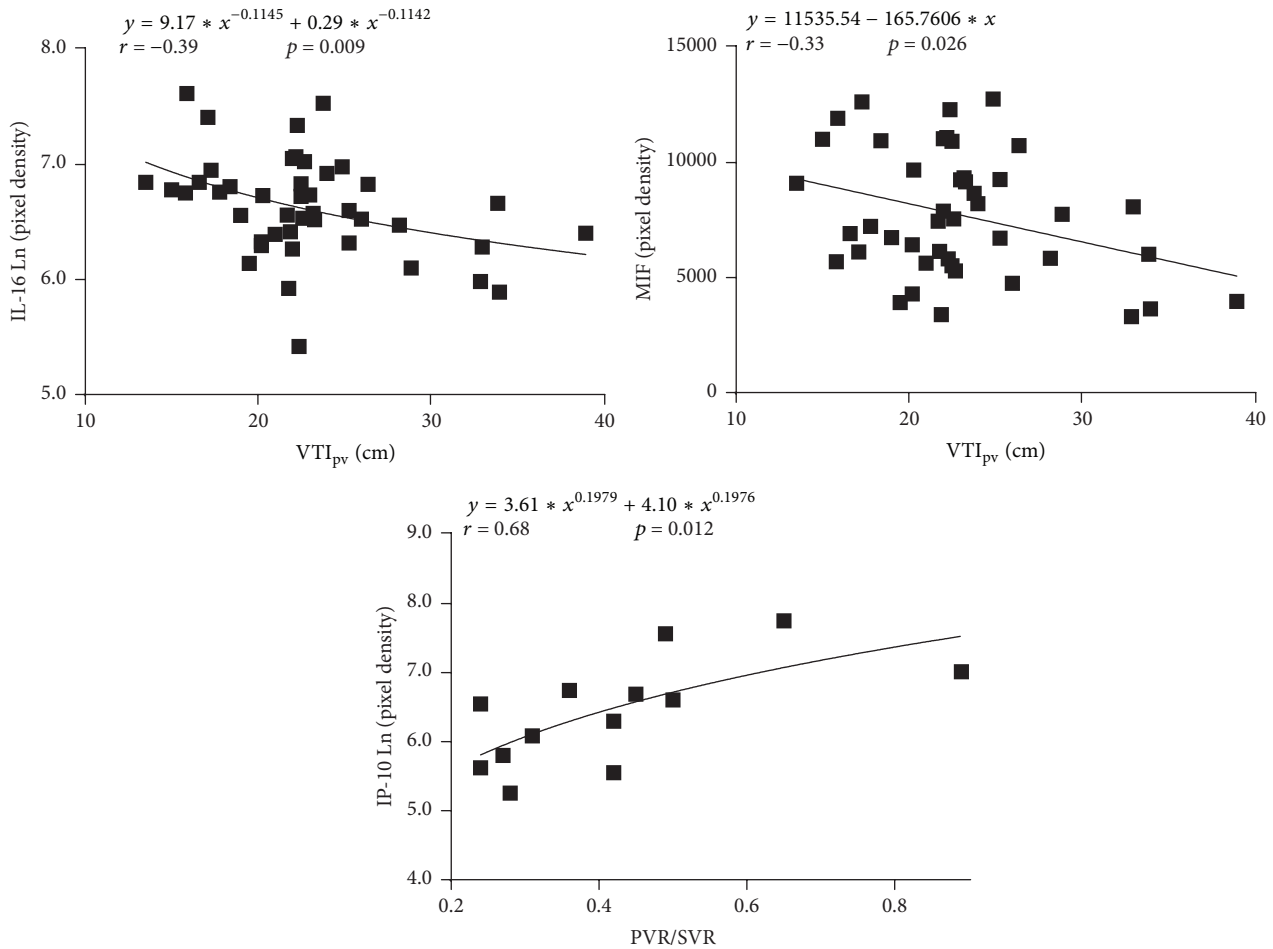


FIGURE 2: Serum concentration of inflammatory mediators (pixel density of chemiluminescence signal) at different levels of pulmonary blood flow (VTI_{pv}, velocity-time integral of blood flow in pulmonary veins, echocardiographic assessment, $n = 44$) and pulmonary vascular resistance (PVR/SVR, pulmonary-to-systemic vascular resistance ratio, cardiac catheterization, $n = 13$). IL-16: interleukin 16; MIF: macrophage migration inhibitory factor; IP-10: interferon gamma-induced protein-1.

involved not only in the endothelial-leukocyte interaction but also in the endothelial renin-angiotensin pathway [38]. It is involved in interferon-associated PAH [39] and plays a role in idiopathic PAH [40] and chronic thromboembolic pulmonary hypertension [41]. We also observed a negative correlation of Serpin E1 (formally, plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1) with pulmonary vascular resistance. Despite its function as an inhibitor of fibrinolysis, Serpin E1/PAI-1 has a paradoxical protumorigenic role in cancer and has been shown to promote angiogenesis [42, 43]. Furthermore, Serpin E1/PAI-1 seems to be downregulated in pulmonary artery smooth muscle cells in idiopathic PAH [44].

In conclusion, correlations were observed between circulating levels of inflammatory mediators and patterns of clinical, hemodynamic, and histological presentation, suggesting that inflammation has a role in pulmonary vascular remodeling in young pediatric patients with cardiac shunts. However, in view of the relatively small number of patients in the study and so many correlations to be tested, we would like to focus on the observations that, in our opinion, are the most consistent ones. The other findings should be

considered as exploratory at the present moment. Essentially, MIF chemokine was elevated in patients for whom cardiac catheterization was considered as necessary, and elevated pulmonary vascular resistance was confirmed. In contrast, RANTES chemokine was elevated in patients with congestive heart failure who were assigned to surgery with no need for catheterization. Furthermore, there seemed to be a positive correlation between IL-16 level and severity of pulmonary vascular lesions. Contemporary practice includes therapeutic measures that allow for the management of postoperative pulmonary vascular tone instability, although mortality rates are still high. Hopefully, in the future, specific targeted therapies will allow for stabilization or reduction of preoperative pulmonary vascular remodeling in this population.

Disclosure

This study is part of an academic thesis by L. Zorzaneli to the Program in Cardiology, University of São Paulo School of Medicine.

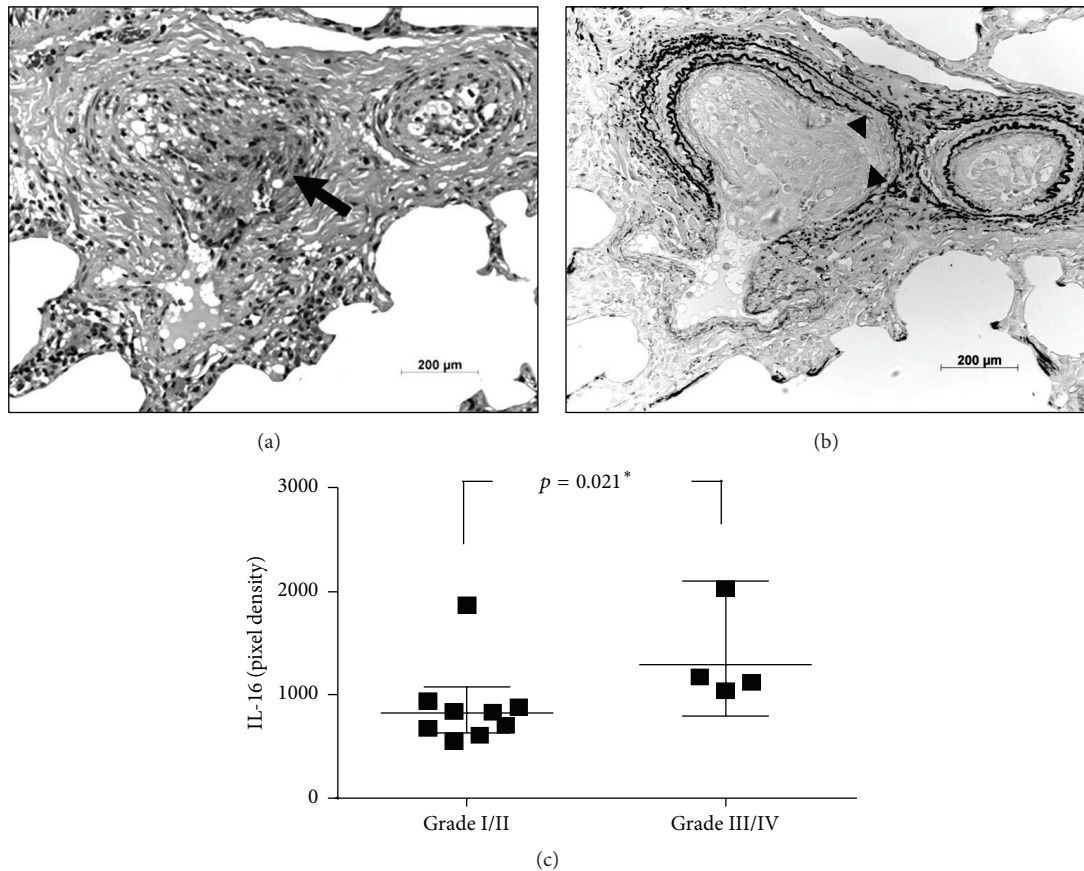


FIGURE 3: Lung biopsy findings and serum interleukin 16 (IL-16). (a) Advanced pulmonary vasculopathy (grade IV) in a young group II patient (11 months old). Precapillary arteries are shown, with focal intraluminal proliferation of endothelial cells (arrow) characterizing the early stage of a plexiform lesion. (b) Histological section of the same arteries, stained for elastic fibers. At the site where the endothelial proliferation takes place, there is absence of the internal elastic lamina, indicating local elastolysis (between the arrow heads). (a) and (b), respectively, hematoxylin-eosin and Miller's elastic stain; objective magnification 20x. (c) Serum levels of IL-16 (geometric mean with 95% CI) in patients at different degrees of pulmonary vascular abnormalities. * Mann-Whitney test.

Competing Interests

The authors declare that there are no competing interests regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

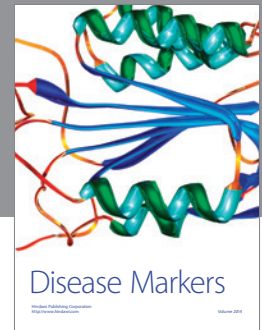
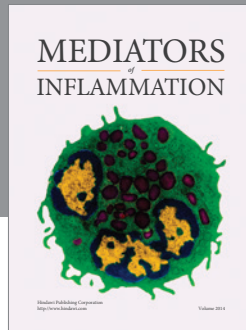
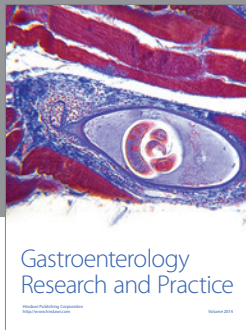
This study was supported by FAPESP (Foundation for Research Support of the State of São Paulo, Brazil) Grant no. 2011/09341-0.

References

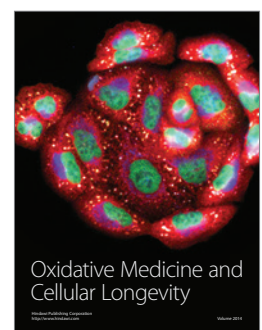
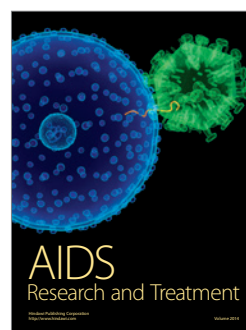
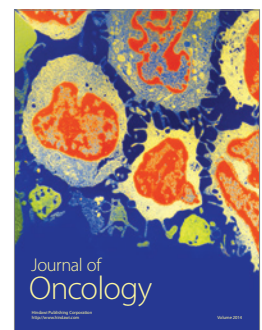
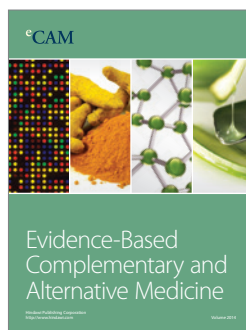
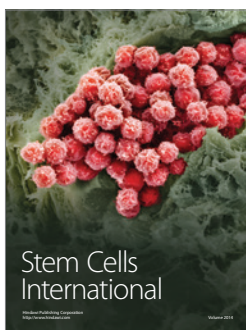
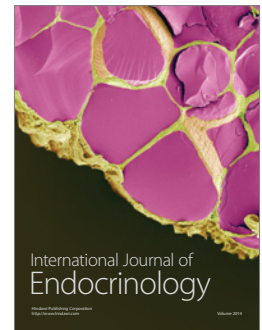
- [1] M. Rabinovitch, C. Guignabert, M. Humbert, and M. R. Nicolls, "Inflammation and immunity in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension," *Circulation Research*, vol. 115, no. 1, pp. 165–175, 2014.
- [2] P. Dorfmueller, F. Perros, K. Balabanian, and M. Humbert, "Inflammation in pulmonary arterial hypertension," *European Respiratory Journal*, vol. 22, no. 2, pp. 358–363, 2003.
- [3] M. R. Nicolls, L. Taraseviciene-Stewart, P. R. Rai, D. B. Badesch, and N. F. Voelkel, "Autoimmunity and pulmonary hypertension: a perspective," *European Respiratory Journal*, vol. 26, no. 6, pp. 1110–1118, 2005.
- [4] F. Perros, P. Dorfmueller, D. Montani et al., "Pulmonary lymphoid neogenesis in idiopathic pulmonary arterial hypertension," *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 185, no. 3, pp. 311–321, 2012.
- [5] R. F. A. Pinto, M. D. L. Higuchi, and V. D. Aiello, "Decreased numbers of T-lymphocytes and predominance of recently recruited macrophages in the walls of peripheral pulmonary arteries from 26 patients with pulmonary hypertension secondary to congenital cardiac shunts," *Cardiovascular Pathology*, vol. 13, no. 5, pp. 268–275, 2004.
- [6] S. Hall, P. Brogan, S. G. Haworth, and N. Klein, "Contribution of inflammation to the pathology of idiopathic pulmonary arterial hypertension in children," *Thorax*, vol. 64, no. 9, pp. 778–783, 2009.
- [7] H. Brun, H. Holmstrom, E. Thaulow et al., "Patients with pulmonary hypertension related to congenital systemic-to-pulmonary shunts are characterized by inflammation involving endothelial cell activation and platelet-mediated inflammation," *Congenital Heart Disease*, vol. 4, no. 3, pp. 153–159, 2009.
- [8] K. Sungprem, A. Khongphatthanayothin, P. Kiattisanpipop, P. Chotivitayatarakorn, Y. Poovorawan, and P. Lertsapcharoen,

- "Serum level of soluble intercellular adhesion molecule-1 correlates with pulmonary arterial pressure in children with congenital heart disease," *Pediatric Cardiology*, vol. 30, no. 4, pp. 472–476, 2009.
- [9] M. Duncan, B. D. Wagner, K. Murray et al., "Circulating cytokines and growth factors in pediatric pulmonary hypertension," *Mediators of Inflammation*, vol. 2012, Article ID 143428, 7 pages, 2012.
- [10] U. Krishnan and E. B. Rosenzweig, "Pulmonary arterial hypertension associated with congenital heart disease," *Clinics in Chest Medicine*, vol. 34, no. 4, pp. 707–717, 2013.
- [11] B. Zhang, M. Shen, M. Xu et al., "Role of macrophage migration inhibitory factor in the proliferation of smooth muscle cell in pulmonary hypertension," *Mediators of Inflammation*, vol. 2012, Article ID 840737, 10 pages, 2012.
- [12] E. Daley, C. Emson, C. Guignabert et al., "Pulmonary arterial remodeling induced by a Th2 immune response," *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 205, no. 2, pp. 361–372, 2008.
- [13] L. Lindberg, A. K. Olsson, P. Jögi, and C. Jonmarker, "How common is severe pulmonary hypertension after pediatric cardiac surgery?" *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, vol. 123, no. 6, pp. 1155–1163, 2002.
- [14] K. L. Brown, D. A. Ridout, A. P. Goldman, A. Hoskote, and D. J. Penny, "Risk factors for long intensive care unit stay after cardiopulmonary bypass in children," *Critical Care Medicine*, vol. 31, no. 1, pp. 28–33, 2003.
- [15] I. R. Rivera, M. A. Mendonça, J. L. Andrade et al., "Pulmonary venous flow index as a predictor of pulmonary vascular resistance variability in congenital heart disease with increased pulmonary flow: a comparative study before and after oxygen inhalation," *Echocardiography*, vol. 30, no. 8, pp. 952–960, 2013.
- [16] T. H. Laird, S. A. Stayer, S. M. Rivenes et al., "Pulmonary-to-systemic blood flow ratio effects of sevoflurane, isoflurane, halothane, and fentanyl/midazolam with 100% oxygen in children with congenital heart disease," *Anesthesia & Analgesia*, vol. 95, no. 5, pp. 1200–1206, 2002.
- [17] J. L. Wilkinson, "Haemodynamic calculations in the catheter laboratory," *Heart*, vol. 85, no. 1, pp. 113–120, 2001.
- [18] D. Heath and J. E. Edwards, "The pathology of hypertensive pulmonary vascular disease; a description of six grades of structural changes in the pulmonary arteries with special reference to congenital cardiac septal defects," *Circulation*, vol. 18, no. 4, part 1, pp. 533–547, 1958.
- [19] T. Kiss, K. Kovacs, A. Komocsi et al., "Novel mechanisms of sildenafil in pulmonary hypertension involving cytokines/chemokines, MAP kinases and Akt," *PLoS ONE*, vol. 9, no. 8, Article ID e104890, 2014.
- [20] A. A. Lopes, R. J. Barst, S. G. Haworth et al., "Repair of congenital heart disease with associated pulmonary hypertension in children: what are the minimal investigative procedures? Consensus statement from the Congenital Heart Disease and Pediatric Task Forces, Pulmonary Vascular Research Institute (PVRI)," *Pulmonary Circulation*, vol. 4, no. 2, pp. 330–341, 2014.
- [21] C. Weber, S. Kraemer, M. Drechsler et al., "Structural determinants of MIF functions in CXCR2-mediated inflammatory and atherogenic leukocyte recruitment," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 105, no. 42, pp. 16278–16283, 2008.
- [22] J. Bernhagen, R. Krohn, H. Lue et al., "MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment," *Nature Medicine*, vol. 13, no. 5, pp. 587–596, 2007.
- [23] A. Zernecke, J. Bernhagen, and C. Weber, "Macrophage migration inhibitory factor in cardiovascular disease," *Circulation*, vol. 117, no. 12, pp. 1594–1602, 2008.
- [24] L. Tu, A. Huertas, M. Le Hires et al., "MIF/CD74-dependent interleukin-6 and monocyte chemoattractant protein-1 secretion by pulmonary endothelial cells in idiopathic pulmonary hypertension," *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 187, Article ID A1739, 2013.
- [25] M. Le Hires, L. Tu, N. Ricard et al., "Proinflammatory signature of the dysfunctional endothelium in pulmonary hypertension. Role of the macrophage migration inhibitory factor/CD74 complex," *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 192, no. 8, pp. 983–997, 2015.
- [26] J. C. Kovacic, R. Gupta, A. C. Lee et al., "Stat3-dependent acute Rantes production in vascular smooth muscle cells modulates inflammation following arterial injury in mice," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 120, no. 1, pp. 303–314, 2010.
- [27] T. P. Mikolajczyk, R. Nosalski, P. Szczepaniak et al., "Role of chemokine RANTES in the regulation of perivascular inflammation, T-cell accumulation, and vascular dysfunction in hypertension," *The FASEB Journal*, vol. 30, no. 5, pp. 1987–1999, 2016.
- [28] T. M. Thompson, P. L. Roddam, L. M. Harrison, J. A. Aitken, and J. P. DeVincenzo, "Viral specific factors contribute to clinical respiratory syncytial virus disease severity differences in infants," *Clinical Microbiology*, vol. 4, no. 3, article 206, 2015.
- [29] H. Huang, L. Zhang, R. Liu et al., "Abstract 15110: the interleukin (IL)-16 gene polymorphisms and risk of coronary artery disease in Chinese Han population," *Circulation*, vol. 124, Article ID A15110, 2011.
- [30] S. L. Park, B. Hwang, S.-Y. Lee et al., "p21WAF1 is required for interleukin-16-induced migration and invasion of vascular smooth muscle cells via the p38MAPK/Sp-1/MMP-9 pathway," *PLoS ONE*, vol. 10, no. 11, Article ID e0142153, 2015.
- [31] M. Rabinovitch, J. F. Keane, W. I. Norwood, A. R. Castaneda, and L. Reid, "Vascular structure in lung tissue obtained at biopsy correlated with pulmonary hemodynamic findings after repair of congenital heart defects," *Circulation*, vol. 69, no. 4, pp. 655–667, 1984.
- [32] M. E. Yeager, C. M. Nguyen, D. D. Belchenko et al., "Circulating fibrocytes are increased in children and young adults with pulmonary hypertension," *European Respiratory Journal*, vol. 39, no. 1, pp. 104–111, 2012.
- [33] R. Das, J. E. Moss, E. Robinson et al., "Role of macrophage migration inhibitory factor in the Th2 immune response to epicutaneous sensitization," *Journal of Clinical Immunology*, vol. 31, no. 4, pp. 666–680, 2011.
- [34] M. R. Kim, R. Manoukian, R. Yeh et al., "Transgenic overexpression of human IL-17E results in eosinophilia, B-lymphocyte hyperplasia, and altered antibody production," *Blood*, vol. 100, no. 7, pp. 2330–2340, 2002.
- [35] E. Daley, C. Emson, C. Guignabert et al., "Pulmonary arterial remodeling induced by a Th2 immune response," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 205, no. 2, pp. 361–372, 2008.
- [36] M. Caunt, L. Hu, T. Tang, P. C. Brooks, S. Ibrahim, and S. Karparkin, "Growth-regulated oncogene is pivotal in thrombin-induced angiogenesis," *Cancer Research*, vol. 66, no. 8, pp. 4125–4132, 2006.
- [37] M. Rabinovitch, S. G. Haworth, A. R. Castaneda, A. S. Nadas, and L. M. Reid, "Lung biopsy in congenital heart disease: a morphometric approach to pulmonary vascular disease," *Circulation*, vol. 58, no. 6, pp. 1107–1122, 1978.

- [38] N. Ide, T. Hirase, A. Nishimoto-Hazuku, Y. Ikeda, and K. Node, "Angiotensin II increases expression of IP-10 and the renin-angiotensin system in endothelial cells," *Hypertension Research*, vol. 31, no. 6, pp. 1257–1267, 2008.
- [39] P. M. George, E. Oliver, P. Dorfmueller et al., "Evidence for the involvement of type I interferon in pulmonary arterial hypertension," *Circulation Research*, vol. 114, no. 4, pp. 677–688, 2014.
- [40] G. A. Heresi, M. Aytakin, J. Newman, and R. A. Dweik, "CXC-chemokine ligand 10 in idiopathic pulmonary arterial hypertension: marker of improved survival," *Lung*, vol. 188, no. 3, pp. 191–197, 2010.
- [41] D. Zabini, A. Heinemann, V. Foris et al., "Comprehensive analysis of inflammatory markers in chronic thromboembolic pulmonary hypertension patients," *European Respiratory Journal*, vol. 44, no. 4, pp. 951–962, 2014.
- [42] V. R. Placencio and Y. A. DeClerck, "Plasminogen activator inhibitor-1 in cancer: rationale and insight for future therapeutic testing," *Cancer Research*, vol. 75, no. 15, pp. 2969–2974, 2015.
- [43] M. D. Seferovic and M. B. Gupta, "Increased umbilical cord PAI-1 levels in placental insufficiency are associated with fetal hypoxia and angiogenesis," *Disease Markers*, vol. 2016, Article ID 7124186, 13 pages, 2016.
- [44] F. M. Kouri, M. A. Queisser, M. Königshoff et al., "Plasminogen activator inhibitor type 1 inhibits smooth muscle cell proliferation in pulmonary arterial hypertension," *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, vol. 40, no. 9, pp. 1872–1882, 2008.



Hindawi
Submit your manuscripts at
<http://www.hindawi.com>



Relation of Cytokine Profile to Clinical and Hemodynamic Features in Young Patients With Congenital Heart Disease and Pulmonary Hypertension



Leína Zorzaneli, MD^a, Nair Maeda, PhD^b, Mariana Clavé, BSc^a, Ana Thomaz, MD^a, Filomena Galas, MD^c, Marlene Rabinovitch, MD^d, and Antonio Lopes, MD^{a,*}

In congenital heart disease, severity of pulmonary hypertension and operability is defined by noninvasive parameters (clinical history, physical examination, and echocardiography) and sometimes, cardiac catheterization. We investigated how circulating levels of inflammatory mediators correlate with such parameters in a young pediatric population (age, 2.0 months to 3.1 years) and the effects of preoperative pulmonary vasodilator therapy with sildenafil. Cytokines were analyzed in serum using chemiluminescence signals. In the whole patient group (n = 47), interleukin 17E, a Th2 immune response mediator increased with increasing age, considered as a parameter of disease severity ($R^2 = 0.24$, $p < 0.001$), whereas the angiogenic chemokine growth-regulated oncogene alpha decreased ($R^2 = 0.21$, $p = 0.001$). Macrophage migration inhibitory factor chemokine was greater in subjects with elevated pulmonary vascular resistance (n = 16, $p = 0.022$), whereas regulated on activation, normal T cell expressed and secreted chemokine was greater in subjects with pulmonary congestion due to increased pulmonary blood flow (n = 31, $p = 0.037$). The observations were the same for the specific subpopulation of patients with Down syndrome ($p = 0.009$ and $p = 0.012$ for migration inhibitory factor and regulated on activation, normal T cell expressed and secreted in the respective subgroups). Sildenafil administration to patients with elevated pulmonary vascular resistance resulted in improvement of pulmonary blood flow ($p = 0.012$) and systemic oxygen saturation ($p = 0.010$), with a decrease in serum interleukin 6 ($p = 0.027$) and soluble ICAM-1 ($p = 0.011$). In conclusion, levels of circulating inflammatory molecules seem to correlate with disease severity in this population, with potential pathophysiological and therapeutic implications. © 2016 Elsevier Inc. All rights reserved. (Am J Cardiol 2017;119:119–125)

Pediatric patients with congenital cardiac shunts now undergo repair of the anomalies early in life. For most of them, treatment is followed by normalization of preoperative clinical and hemodynamic abnormalities. However, despite early treatment, some patients still have either a difficult immediate postoperative course or moderate to more long-term severe residual hemodynamic abnormalities reflected in an elevated pulmonary vascular resistance.^{1–5} A number of early insults may initiate pulmonary vascular remodeling. Although the altered hemodynamics creating increased shear and stretch and disturbed flow are critical

initiators of remodeling, chronic inflammation likely also has a role in the extent and potential for reversibility of the pathology.^{6–10} The purpose of the present study was to analyze serum cytokine profile in young candidates to surgical repair of congenital cardiac shunts. A “higher pulmonary vascular resistance” group was analyzed for possible effects of preoperative vasodilator therapy with sildenafil. The study was approved by the institutional scientific and ethics committee (CAPPesq #0502/11).

Methods

Young pediatric patients considered for biventricular surgical repair of congenital cardiac shunts at the Heart Institute (InCor), University of São Paulo, Brazil, that met inclusion criteria were consecutively enrolled in the study. Parents signed a written informed consent before enrollment. All had nonrestrictive septal defects (or communications between the great arteries) associated with clinical features suggestive of elevated pulmonary arterial pressure. Two study groups were defined according to the following preestablished criteria: 1, age >18 months; 2, absence of clinical features suggestive of pulmonary overcirculation and congestion, thus indicating elevation of pulmonary vascular resistance; 3, presence of Down syndrome; 4, bidirectional flow across the cardiac communications; and 5, sustained or intermittent systemic oxygen saturation of

^aDepartment of Pediatric Cardiology and Adult Congenital Heart Disease, Heart Institute, University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, Brazil; ^bPró-Sangue Foundation, São Paulo, Brazil; ^cDepartment of Anesthesiology, Heart Institute, University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, Brazil; and ^dStanford University School of Medicine, Stanford, California. Manuscript received May 18, 2016; revised manuscript received and accepted September 19, 2016.

Part of a doctoral thesis by Dr. Zorzaneli to the Program in Cardiology, University of São Paulo School of Medicine.

This work was supported by grant # 2011/09341-0 from FAPESP (Foundation for Research Support of the State of São Paulo, Brazil).

See page 124 for disclosure information.

*Corresponding author: Tel: (55) 11-2661-5350; fax: (55) 11-2661-5409.

E-mail address: aablopes@usp.br (A. Lopes).

Table 1
Demographic, diagnostic and functional data in patient groups

Variable	Group 1 (n=16)	Group 2 (n=31)	p value
Age (years)	1.13 (0.76 – 2.48)	0.71 (0.43 – 1.02)	0.009*
Male:Female	5:11	13:18	0.691 [†]
Down syndrome	11	21	0.999 [†]
Weight (Kg)	6.45 (5.40 – 10.40)	6.10 (4.70 – 7.10)	0.141*
Peripheral oxygen saturation (%)	93 (89 – 96)	96 (95 – 98)	0.011*
Diagnosis			
A	1 (6%)	1 (3%)	0.451 [‡]
B	7 (44%)	17 (55%)	
C	7 (44%)	13 (42%)	
D	1 (6%)	0 (0%)	
Echocardiography			
Mean pulmonary arterial pressure (mmHg) [§]	43 (40 – 54)	41 (31 – 52)	0.338*
Pulmonary-to-systemic blood flow ratio	1.9 (1.3 – 2.6)	2.8 (2.3 – 3.3)	0.008*
Velocity-time integral of blood flow in pulmonary veins (cm)	21.4 (15.9 – 23.3)	22.6 (20.2 – 26.0)	0.059*
Cardiac catheterization			
Mean pulmonary arterial pressure (mmHg)	52 (43 – 66)		
Mean systemic arterial pressure (mmHg)	63 (56 – 73)		
Pulmonary blood flow index (L/min/m ²)	6.6 (4.8 – 7.7)		
Pulmonary-to-systemic blood flow ratio	1.7 (1.2 – 2.6)		
Pulmonary vascular resistance index (Wood U x m ²)	5.2 (4.2 – 8.9)		
Pulmonary-to-systemic vascular resistance ratio	0.42 (0.28 – 0.65)		

Results of numeric variables are presented as median and interquartile range. Group 1 and group 2 correspond to patients with greater pulmonary vascular resistance and greater pulmonary flow, respectively.

Diagnostic categories: A, pretricuspid defects; B, posttricuspid defects (eventually associated with pretricuspid communications), except atrioventricular septal defects; C, atrioventricular septal defects; D, conotruncal defects.

* Mann-Whitney test.

[†] Chi-square test.

[‡] Likelihood ratio.

[§] Obtained for 10 patients in group 1 and 12 patients in group 2.

<90%. Patients with ≥ 3 of these criteria were assumed to have higher levels of pulmonary vascular resistance and classified as group 1; preoperative cardiac catheterization was considered as necessary. Group 1 patients were started on short-term preoperative treatment with sildenafil. The remaining patients were assigned to surgery based on complete noninvasive evaluation only, without preoperative vasodilator therapy (group 2). A control group was included for analysis of biochemical parameters (pediatric controls).

In addition to providing anatomic data and mean pulmonary arterial pressure whenever possible, Doppler echocardiography was used to estimate the pulmonary-to-systemic blood flow ratio (Qp/Qs) and the velocity-time integral of blood flow in pulmonary veins (VTI_{PV}).^{11,12}

These flow parameters were measured at baseline in all patients and at the maximal dose of sildenafil (before surgery) in group 1 subjects. Peripheral oxygen saturation was assessed by pulse oximetry under the same conditions. Cardiac catheterization was performed at baseline for all group 1 patients. Pulmonary and systemic blood flow were calculated by the Fick method and used in the assessment of pulmonary vascular resistance.

The objective of pulmonary vasodilator therapy was to render patients better surgical candidates as far as possible, not to make inoperable subjects operable. Sildenafil was started at the dose of 1.0 mg/kg/day, and increased progressively until one of the following situations: 1, dyspnea associated with an elevation in peripheral oxygen saturation and need for an increase in diuretics, and/or improvement of

echocardiographic pulmonary blood flow measurements, indicating a favorable response and need to proceed to surgical correction; 2, absence of any of these effects at a maximum tolerated dose of 5.0 mg/kg/day, indicating an unfavorable response and failure to proceed to surgery; 3, decrease of >10% in mean systemic blood pressure at any sildenafil dose, indicating the need for dose reduction; 4, development of clinically relevant adverse effects at any sildenafil dose, indicating the need for discontinuation. Transition from 1.0 to 1.5 or 2.0 mg/kg/day of sildenafil was carried out in 2 to 3 days, if response criteria were not achieved. Escalation to higher doses (e.g., 2.0 to 5.0 mg/kg/day) required at least 1 week of observation. For patients using higher doses (4.0 to 5.0 mg/kg/day according to the tolerance) to be considered as nonresponders, at least 4 weeks of observation was considered as necessary. Complete pretreatment ophthalmological evaluation was performed for all group 1 patients before and after the course of sildenafil.

Samples of peripheral venous blood were obtained for cytokine measurements. Two samples were obtained from group 1 patients. The first one (baseline) was collected 8 to 70 days before surgery (duration of sildenafil treatment). The second one was collected at peak sildenafil dose, 1 day before surgery. In group 2, one single sample was collected 1 day before surgery. Serum aliquots were stored at -80°C until use. Cytokines and related proteins were analyzed using a human cytokine array (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota). The manufacturer and immunoblotting

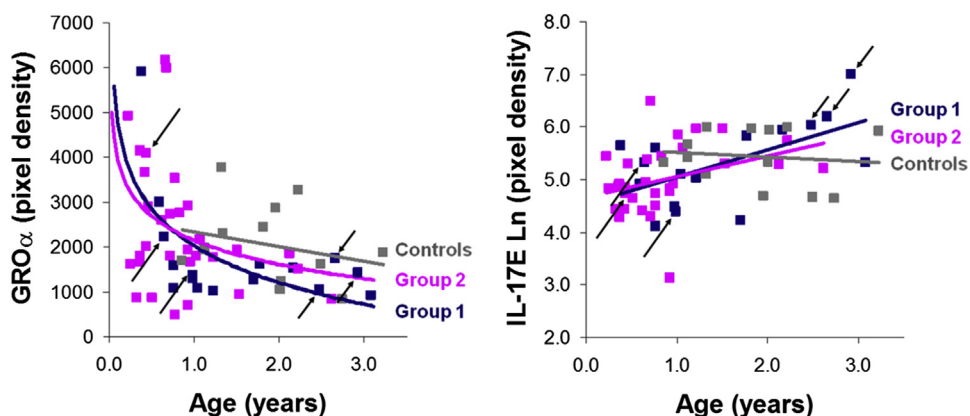


Figure 1. Baseline circulating levels of GRO α and IL-17E as a function of age (considered as an index of pulmonary vascular disease severity) in pediatric subjects with nonrestrictive cardiac communications and healthy pediatric controls. Logarithmic transformation (Ln) was required for regression analysis of IL-17E. Group 1 and group 2 correspond to subjects with greater pulmonary vascular resistance and greater pulmonary flow, respectively. The regression equation for GRO α (whole patient population, n = 47) was: $y = 2,043 - 955 \times \text{Ln}(x)$, $R^2 = 0.21$, $p = 0.001$; controls (n = 13): $y = 2,670 - 328 \times x$, $R^2 = 0.07$, $p = 0.377$. The regression equation for IL-17E (patients, n = 47) was: $y = 4.61 + 0.46 \times x$, $R^2 = 0.24$, $p < 0.001$; controls (n = 13): $y = 5.59 - 0.09 \times x$, $R^2 = 0.01$, $p = 0.710$. Short and long arrows indicate patients who were inoperable and patients who died, respectively.

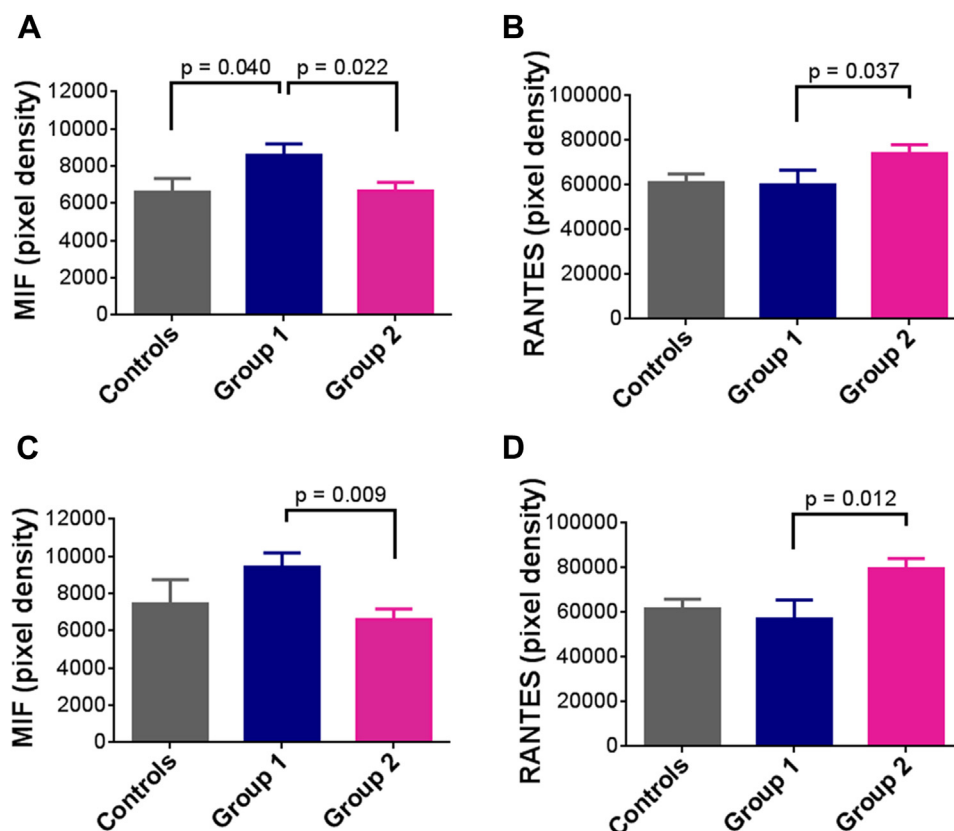


Figure 2. Baseline serum levels of MIF and RANTES chemokines in pediatric subjects with congenital cardiac communications, with or without signs of elevated pulmonary vascular resistance (respectively, group 1 and group 2). (A) and (B) represent the whole patient group (group 1, n = 16; group 2, n = 31). (C) and (D) represent patients with Down syndrome (group 1, n = 11; group 2, n = 21). Controls for the whole group (n = 13) and for the Down syndrome subgroup (n = 5) are presented. Results are expressed as mean with standard error. MIF concentration was adjusted for the age. p Values correspond to multiple comparison tests after analysis of covariance (MIF) or analysis of variance (RANTES).

procedures were as previously reported.¹³ Chemiluminescence was used for semiquantitative detection. The average signal (pixel density) of the pair of duplicate spots representing each cytokine was normalized using internal

controls on the same membrane. Fifteen of the 36 proteins that were analyzed (between and within assay coefficients of variability, 3.7% and 2.0% respectively) had signals within the detection level and were relevant in terms of

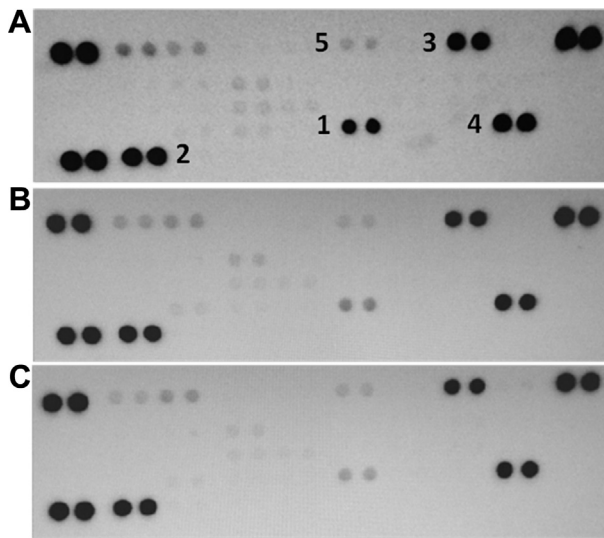


Figure 3. Representative dot blots (triplicates) showing increased concentration of MIF chemokine (1) in a group 1 patient (A) compared with a group 2 patient (B) and a healthy pediatric control (C). Also indicated by numbers are RANTES chemokine (2), soluble ICAM-1 (3), serpin E1 (4), and GRO α chemokine (5). Internal controls are on the right and left borders.

relations to clinical features: growth-regulated oncogene alpha (GRO α); human CC chemokine I-309 (I-309); soluble intercellular adhesion molecule-1; interleukins (ILs) 6, 10, 13, 16, 17E, and 23; macrophage migration inhibitory factor (MIF); macrophage inflammatory protein-1 beta; regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES); serpin E1; stromal cell-derived factor-1 (SDF-1); soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1.

Results of numeric variables are presented as median with range or interquartile range or mean with standard error. Categorical variables are reported as proportions or percentages. Differences between the study groups were analyzed using the Student *t* test, Mann-Whitney test, chi-square test, or the likelihood ratio. Differences involving the study groups and controls were tested by analysis of variance or the Kruskal-Wallis test. Analysis of covariance was used to adjust for age. Differences between conditions (e.g., baseline vs vasodilator therapy) were analyzed using the paired *t* test or the Wilcoxon test. Regression (linear and nonlinear) and correlation procedures were used to test for possible associations of biochemical data with clinical and hemodynamic parameters. The coefficient of determination (R^2), Pearson's coefficient (*r*) or Spearman's rho (r_s) was calculated accordingly. Logarithmic transformation (Ln) of the dependent variable was eventually necessary. In all statistical procedures, 0.05 was assumed as the significance level. All tests were carried out using the IBM SPSS statistical software, version 22, Armonk, New York.

Results

Forty-seven patients were enrolled, with age range of 2.0 months to 3.1 years (median, 10 months). Demographic, diagnostic, and functional data are presented in Table 1.

Compared with group 2, group 1 patients had lower Qp/Qs ratio. They were a little older and had lower peripheral oxygen saturation, although these variables were among the criteria for group classification. Cardiac catheterization data confirmed elevation of pulmonary arterial pressure and pulmonary vascular resistance in group 1. Pulmonary-to-systemic vascular resistance ratio (PVR/SVR) was directly associated with patient age ($R^2 = 0.36$, $p = 0.014$). Pediatric controls ($n = 13$) included for biochemical analyses were aged 10.3 months to 3.2 years (1.95 [1.22 to 2.36], median and interquartile range). Five of them had Down syndrome. The lack of controls under the age of 10 months was considered as a limitation of the study.

Group 1 patients were treated preoperatively with sildenafil for 8 to 70 days (median, 25 days). The maximal sildenafil dose per patient was 1.5 to 5.0 mg/kg/day (median, 3.0 mg/kg/day) with no adverse effects. Thirteen of 16 patients had changes in clinical and/or echocardiographic variables that suggested effective pulmonary vasodilation. They were shortly assigned to surgery. Three patients did not develop any signs to pulmonary overcirculation. They were considered as unsuitable for corrective surgery. In 2 of them, pulmonary vascular resistance was 8.9 and 14.5 units \times m². The third one had a pulmonary vascular resistance of 4.6 units \times m² but had a diagnosis of persistent truncus arteriosus, age of 2.5 years, with no signs of congestive heart failure at all. All 31 group 2 patients were operated on. There were 3 immediate postoperative deaths (all cause mortality of 6.4%). In 2 group 1 patients, death was associated with severe pulmonary hypertensive crises. Histological examination of the lungs revealed widespread medial hypertrophy of small pulmonary arteries; additionally, one of them had intimal proliferative lesions. Death in the third patient (group 2) was unrelated to pulmonary vascular disturbances.

When patients were analyzed as a whole ($n = 47$), there were significant correlations of cytokine levels with age (GRO α , $r_s = -0.47$, $p < 0.001$; IL-13, $r = 0.33$, $p = 0.022$; IL-17E, $r_s = 0.44$, $p = 0.002$), Qp/Qs ratio (interferon gamma, $r_s = -0.33$, $p = 0.027$; IL-23, $r_s = -0.37$, $p = 0.011$; IL-10, $r_s = 0.35$, $p = 0.018$) and VTI_{PV} (I-309, $r_s = -0.29$, $p = 0.048$; IL-16, $r_s = -0.34$, $p = 0.018$; macrophage inflammatory protein-1 beta, $r_s = -0.29$, $p = 0.049$; SDF-1, $r_s = -0.41$, $p = 0.004$; soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1, $r_s = -0.35$, $p = 0.015$). Thus, except for IL-10, all correlations with pulmonary blood flow were negative. The associations between patient age and the concentrations of GRO α and IL-17E are shown in detail in Figure 1. Curves were similar when subjects with Down syndrome were considered separately ($n = 32$, not shown), with sufficient power for analysis of IL-17E ($R^2 = 0.21$, $p = 0.008$) but not GRO α ($R^2 = 0.09$, $p = 0.103$). No clear associations with age were observed in controls (Figure 1).

When patient groups were analyzed comparatively, elevated concentration of MIF chemokine was found to be a characteristic of group 1, whereas elevated RANTES chemokine was typically observed in group 2 compared with group 1. Observations were similar for the specific subpopulation of subjects with Down syndrome (Figure 2). Representative dot blots are shown in Figure 3. In addition, in group 1, a borderline positive association was observed between IL-17E level and pulmonary vascular resistance

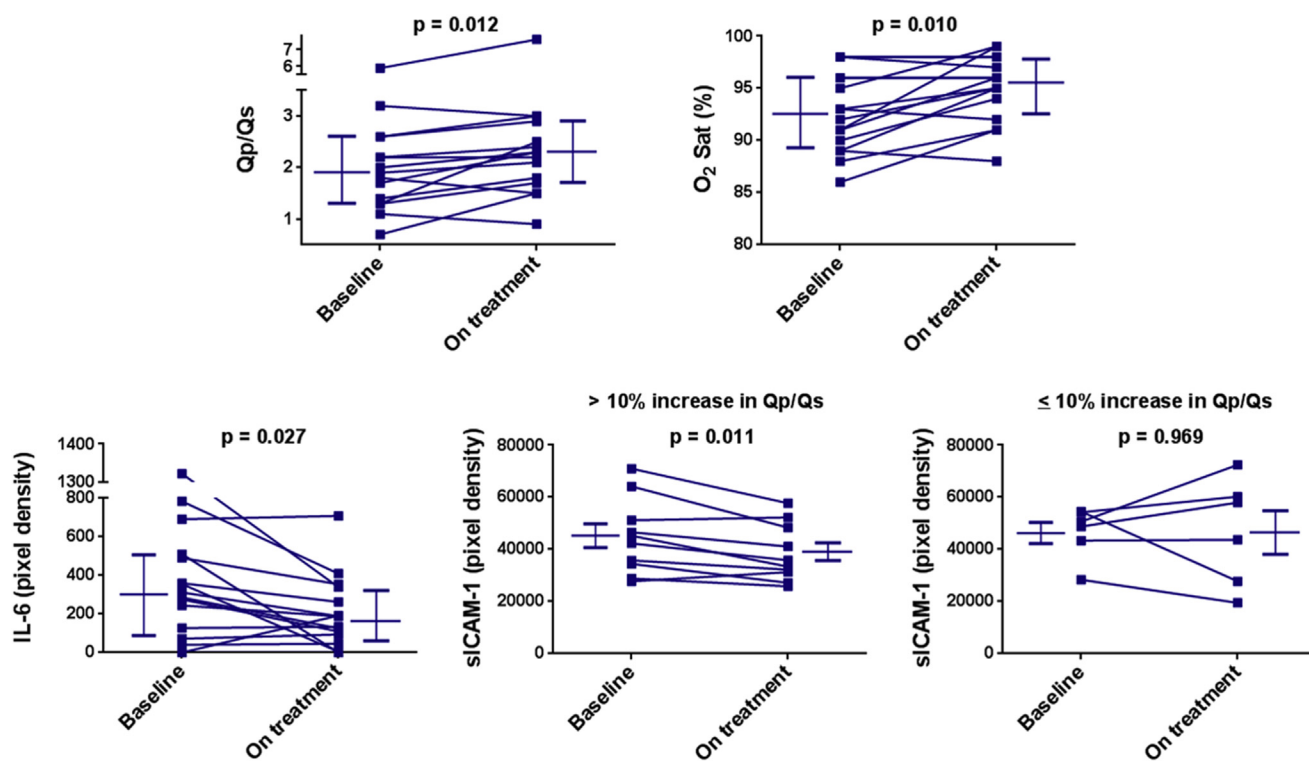


Figure 4. Effects of oral vasodilator therapy (sildenafil) on hemodynamic, oximetric, and biochemical parameters (group 1, $n = 16$). Represented are pulmonary-to-systemic blood flow ratio (Qp/Qs, echocardiography), peripheral oxygen saturation (O_2 Sat), and serum concentrations of IL-6 and sICAM-1. Error bars represent mean with standard error for sICAM-1 (paired t test used to analyze changes) and median with interquartile range for the other parameters (analyzed using the Wilcoxon test).

expressed as PVR/SVR ratio ($R^2 = 0.25$, $p = 0.049$). The upper IL-17E level observed in controls corresponded to a chemiluminescence signal of 401 pixels. The 3 group 1 patients considered as unsuitable for surgery had IL-17E signals of 414, 485, and 1,084 pixels.

The effects of sildenafil therapy on clinical and biochemical variables are shown in Figure 4. There was a significant increase in Qp/Qs ratio associated with improvement of peripheral oxygen saturation. Serum level of IL-6 decreased significantly. Soluble ICAM-1 did not change when all group 1 patients were analyzed as a whole but decreased significantly in subjects who had a $>10\%$ increase in Qp/Qs ratio as a result of vasodilator therapy. No other cytokine changes were observed.

Discussion

In the study, we demonstrated associations between clinical and biochemical parameters (markers of inflammation) in young candidates to surgical repair of congenital cardiac communications. This leads to the assumption that inflammation plays a role in altered pulmonary vascular dynamics that takes place in the first months or years of life in this population. $GRO\alpha$ and IL-17E correlated with patient age, which has been considered as an index of pulmonary hypertension severity.^{2,14} Levels of several proteins correlated inversely with pulmonary flow parameters, suggesting a direct relation to pulmonary vascular resistance. MIF and RANTES chemokines characterized high-risk and low-risk

patients, respectively, including subjects with Down syndrome. It seems important to have markers for subpopulations of patients with Down syndrome. In terms of pulmonary hypertension, all patients with Down syndrome have been considered as “high-risk” so far. Perhaps, this generalization is inappropriate. Finally, there were biochemical responses to sildenafil treatment, suggesting that the effects of pulmonary arterial hypertension therapies go beyond the limits of simple vasodilation. A similar beneficial effect of sildenafil on cytokine production, independent and additional to its vasodilatory effect has been demonstrated in experimental pulmonary hypertension.¹³

MIF and $GRO\alpha$ are members of the CXC chemokine subfamily and are expressed by a number of cells, including components of the vascular wall. Binding of MIF to CXCR2/CD74 complex elicits chemotaxis and arrest of monocytes and T cells, which is central in inflammatory disorders and atherogenesis.^{15–17} The pleiotropic nature of this chemokine is illustrated by activation of several signaling pathways that result in inhibition of apoptosis (endothelial cells) and induction of cellular proliferation (smooth muscle cells).⁶ Its role in pulmonary hypertension has been investigated and confirmed.^{18–20} Interestingly, both MIF and IL-17E have been shown to elicit Th2-type immune response,^{21,22} which has been demonstrated to play a role in pulmonary vascular remodeling in animal models.²³

Another observation of potential pathophysiological interest was the elevated concentration of $GRO\alpha$ early in life, with a subsequent exponential decay. $GRO\alpha$ plays a central

role in angiogenesis, particularly in thrombin-induced vascular growth.²⁴ It is known that decreased density of small intraacinar pulmonary vessels is an index of severity of pulmonary vasculopathy in congenital heart disease.²⁵ We therefore speculate that an age-dependent decrease in GRO α concentration might contribute to impairment of pulmonary vascular growth in young patients with cardiac shunts.

Of the negative correlations that we observed between cytokine levels and pulmonary flow parameters, the one involving SDF-1 deserves consideration, as this chemokine has been shown to play an important role in neointima formation and maladaptive vascular response to injury.²⁶ In contrast, RANTES, a member of the CC chemokine subfamily was greater in patients with higher pulmonary blood flow (group 2). It is known that infants with pulmonary congestion due to cardiac shunts are predisposed to repeated respiratory infections, and RANTES is associated with respiratory viral insults.²⁷

Although this study was planned essentially to provide additional data on the pathophysiological role of inflammation in pediatric pulmonary arterial hypertension, it is possible to anticipate potential clinical implications. It is now possible to identify subjects with cardiac communications at a greater risk of perioperative complications that deserve special attention and care. Identification of such patients is based on a number of clinical features (group 1 characteristics). Complete echocardiographic and sometimes cardiac catheterization data are required to create a diagnostic picture that serves as the basis for planning therapeutic strategies. In the future, this signature of disease severity will probably be extended by inclusion of genetic and biochemical markers. Mediators of inflammation will probably have a place as part of the preoperative picture of disease severity. Importantly, pulmonary vasoreactivity alone can no longer be considered as a predictor of favorable postoperative course. In this study, both group 1 patients who died after surgery were responders to sildenafil therapy, with a >10% increase in Qp/Qs ratio and decreased circulating levels of IL-6 and ICAM-1. Thus, pulmonary vasoreactivity is now considered just as “one of the pieces of the puzzle.”

Acknowledgment: The authors gratefully acknowledge the outstanding contribution of Dr. Luiz J. Kajita, MD (Cardiac Catheterization Laboratory) and the dedicated work of the pediatric cardiology nurses Eponina N.M. Bastos, RN and Janete F. Hironaka, RN, as well as the physiotherapist Luiza Manoel, PT. They express their thankfulness to all member of the Anesthesiology Department of the Heart Institute (InCor) who have been involved with pediatric care. They also express their gratitude to Roseli Polo for her technical assistance in all phases of the study.

Disclosures

The authors have no conflicts of interest to disclose.

1. Beghetti M, Tissot C. Pulmonary hypertension in congenital shunts. *Rev Esp Cardiol* 2010;63:1179–1193.

2. Giglia TM, Humpl T. Preoperative pulmonary hemodynamics and assessment of operability: is there a pulmonary vascular resistance that precludes cardiac operation? *Pediatr Crit Care Med* 2010;11:S57–S69.
3. Lopes AA, Barst RJ, Haworth SG, Rabinovitch M, Al Dabbagh M, Del Cerro MJ, Ivy D, Kashour T, Kumar K, Harikrishnan S, D'Alto M, Thomaz AM, Zorzaneli L, Aiello VD, Mocumbi AO, Santana MV, Galal AN, Banjar H, Tamimi O, Heath A, Flores PC, Diaz G, Sandoval J, Kothari S, Moledina S, Gonçalves RC, Barreto AC, Binotto MA, Maia M, Al Habshan F, Adatia I. Repair of congenital heart disease with associated pulmonary hypertension in children: what are the minimal investigative procedures? Consensus statement from the Congenital Heart Disease and Pediatric Task Forces, Pulmonary Vascular Research Institute (PVRI). *Pulm Circ* 2014;4:330–341.
4. Bando K, Turrentine MW, Sharp TG, Sekine Y, Aufiero TX, Sun K, Sekine E, Brown JW. Pulmonary hypertension after operations for congenital heart disease: analysis of risk factors and management. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996;112:1600–1607; discussion 1607–1609.
5. Krishnan U, Rosenzweig EB. Pulmonary arterial hypertension associated with congenital heart disease. *Clin Chest Med* 2013;34:707–717.
6. Rabinovitch M, Guignabert C, Humbert M, Nicolls MR. Inflammation and immunity in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *Circ Res* 2014;115:165–175.
7. Pinto RF, Higuchi ML, Aiello VD. Decreased numbers of T-lymphocytes and predominance of recently recruited macrophages in the walls of peripheral pulmonary arteries from 26 patients with pulmonary hypertension secondary to congenital cardiac shunts. *Cardiovasc Pathol* 2004;13:268–275.
8. Brun H, Holmström H, Thaulow E, Damás JK, Yndestad A, Aukrust P, Ueland T. Patients with pulmonary hypertension related to congenital systemic-to-pulmonary shunts are characterized by inflammation involving endothelial cell activation and platelet-mediated inflammation. *Congenit Heart Dis* 2009;4:153–159.
9. Sungprem K, Khongphatthanayothin A, Kiettisanpipop P, Chotivitayatarakorn P, Poovorawan Y, Lertsapcharoen P. Serum level of soluble intercellular adhesion molecule-1 correlates with pulmonary arterial pressure in children with congenital heart disease. *Pediatr Cardiol* 2009;30:472–476.
10. Duncan M, Wagner BD, Murray K, Allen J, Colvin K, Accurso FJ, Ivy DD. Circulating cytokines and growth factors in pediatric pulmonary hypertension. *Mediators Inflamm* 2012;2012:143428.
11. Laird TH, Stayer SA, Rivenes SM, Lewin MB, McKenzie ED, Fraser CD, Andropoulos DB. Pulmonary-to-systemic blood flow ratio effects of sevoflurane, isoflurane, halothane, and fentanyl/midazolam with 100% oxygen in children with congenital heart disease. *Anesth Analg* 2002;95:1200–1206.
12. Liu JX, Wang JH, Yang SR, Liu M, Xu Y, Sun JH, Yan CY. Clinical utility of the ventricular septal defect diameter to aorta root diameter ratio to predict early childhood developmental defects or lung infections in patients with perimembranous ventricular septal defect. *J Thorac Dis* 2013;5:600–604.
13. Kiss T, Kovacs K, Komocsi A, Tornóyos A, Zalan P, Sümegi B, Gallyas F. Novel mechanisms of sildenafil in pulmonary hypertension involving cytokines/chemokines, MAP kinases and Akt. *PLoS One* 2014;9:e104890.
14. Rabinovitch M, Keane JF, Norwood WI, Castaneda AR, Reid L. Vascular structure in lung tissue obtained at biopsy correlated with pulmonary hemodynamic findings after repair of congenital heart defects. *Circulation* 1984;69:655–667.
15. Weber C, Kraemer S, Drechsler M, Lue H, Koenen RR, Kapurniotu A, Zernecke A, Bernhagen J. Structural determinants of MIF functions in CXCR2-mediated inflammatory and atherogenic leukocyte recruitment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:16278–16283.
16. Bernhagen J, Krohn R, Lue H, Gregory JL, Zernecke A, Koenen RR, Dewor M, Georgiev I, Schober A, Leng L, Kooistra T, Fingerle-Rowson G, Ghezzi P, Kleemann R, McColl SR, Bucala R, Hickey MJ, Weber C. MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. *Nat Med* 2007;13:587–596.
17. Zernecke A, Bernhagen J, Weber C. Macrophage migration inhibitory factor in cardiovascular disease. *Circulation* 2008;117:1594–1602.
18. Zhang B, Shen M, Xu M, Liu LL, Luo Y, Xu DQ, Wang YX, Liu ML, Liu Y, Dong HY, Zhao PT, Li ZC. Role of macrophage migration inhibitory factor in the proliferation of smooth muscle

- cell in pulmonary hypertension. *Mediators Inflamm* 2012;2012:840737.
19. Tu L, Huertas A, Le Hires M, Ricard N, Phan C, Fadel E, Seferian A, Montani D, Simonneau G, Humbert M, Guignabert C. MIF/CD74-dependent interleukin-6 and monocyte chemoattractant protein-1 secretion by pulmonary endothelial cells in idiopathic pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;187:A1739.
 20. Le Hires M, Tu L, Ricard N, Phan C, Thuillet R, Fadel E, Dorfmueller P, Montani D, de Man F, Humbert M, Huertas A, Guignabert C. Proinflammatory signature of the dysfunctional endothelium in pulmonary hypertension. Role of the macrophage migration inhibitory factor/CD74 complex. *Am J Respir Crit Care Med* 2015;192:983–997.
 21. Das R, Moss JE, Robinson E, Roberts S, Levy R, Mizue Y, Leng L, McDonald C, Tigelaar RE, Herrick CA, Bucala R. Role of macrophage migration inhibitory factor in the Th2 immune response to epicutaneous sensitization. *J Clin Immunol* 2011;31:666–680.
 22. Kim MR, Manoukian R, Yeh R, Silbiger SM, Danilenko DM, Scully S, Sun J, DeRose ML, Stolina M, Chang D, Van GY, Clarkin K, Nguyen HQ, Yu YB, Jing S, Senaldi G, Elliott G, Medlock ES. Transgenic overexpression of human IL-17E results in eosinophilia, B-lymphocyte hyperplasia, and altered antibody production. *Blood* 2002;100:2330–2340.
 23. Daley E, Emson C, Guignabert C, de Waal Malefyt R, Louten J, Kurup VP, Hogaboam C, Taraseviciene-Stewart L, Voelkel NF, Rabinovitch M, Grunig E, Grunig G. Pulmonary arterial remodeling induced by a Th2 immune response. *J Exp Med* 2008;205:361–372.
 24. Caunt M, Hu L, Tang T, Brooks PC, Ibrahim S, Karpatkin S. Growth-regulated oncogene is pivotal in thrombin-induced angiogenesis. *Cancer Res* 2006;66:4125–4132.
 25. Rabinovitch M, Haworth SG, Castaneda AR, Nadas AS, Reid LM. Lung biopsy in congenital heart disease: a morphometric approach to pulmonary vascular disease. *Circulation* 1978;58:1107–1122.
 26. Schober A. Chemokines in vascular dysfunction and remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:1950–1959.
 27. Thompson TM, Roddam PL, Harrison LM, Aitken JA, DeVincenzo JP. Viral specific factors contribute to clinical respiratory syncytial virus disease severity differences in infants. *Clin Microbiol* 2015;4; pii.206.