

LÚCIA HELENA CARAMURÚ

Estudo do impacto da disfunção endotelial e
fatores correlacionados sobre a evolução de
pacientes com síndrome de Eisenmenger

Tese apresentada ao Departamento de Cardio-
Pneumologia da Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Cardiologia

Orientador: Prof. Antonio Augusto Barbosa Lopes

São Paulo

2004

“Os grandes pensamentos vêm do coração”

Vauvenargues (1715-1747)

Dedicatória

Aos meus pais Ronald e Priscilla pelo carinho, dedicação e apoio em todos os momentos de minha vida.

Ao meu marido Sérgio o meu amor e a minha admiração pela pessoa maravilhosa que é.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Antonio Augusto Barbosa Lopes pela oportunidade de realizar esta tese e pelos ensinamentos tão preciosos transmitidos.

Aos pacientes, um agradecimento muito especial pelo aprendizado obtido durante a realização do estudo e pelo respeito e vínculo de amizade que se formou.

A Nair Y. Maeda e Rosangela P. S. Soares pelas análises tão primorosas dos dados laboratoriais e pelo laço de amizade formado.

Ao Dr. Cyrillo Cavalheiro Filho pela colaboração e conhecimentos transmitidos.

Ao meu irmão Frank e a sua esposa Jacqueline pelo auxílio prestado e por estarem sempre por perto.

À Dra. Maria Vitória Martin por seu pioneirismo na Cardiologia Pediátrica e pelo exemplo de dedicação e competência.

À Dra. Maria Lúcia Bastos Passarelli pela sua paixão pela Cardiologia Pediátrica e pelos ensinamentos transmitidos.

À Coordenadoria de Pós Graduação do Incor pelo estímulo e orientações prestadas.

À Sra. Maria do Carmo C. Barreto, diretora do Serviço de Biblioteca Documentação Científica e Didática do Incor, pelo profissionalismo e auxílio prestado.

A todos os membros da Unidade Clínica de Cardiologia Pediátrica e Cardiopatias Congênitas do Adulto do Incor pela colaboração e apoio.

Às enfermeiras, auxiliares de enfermagem e funcionários da Unidade de Emergência do Incor pelo carinho com os pacientes.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta tese, meu sincero agradecimento.

Sumário

	página
Lista de abreviaturas	
Lista de símbolos	
Lista de siglas	
Lista de tabelas	
Lista de gráficos	
Lista de figuras	
Resumo	
Summary	
Introdução.....	1
Objetivos.....	20
Métodos.....	23
População estudada.....	24
Critérios de inclusão.....	24
Critérios de exclusão	25
Subgrupos de pacientes	26
Tratamento	26
Procedimento de hemodiluição	27
Variáveis analisadas e desenho do estudo	29
Dados demográficos e laboratoriais gerais	29
Diagnóstico de trombose arterial pulmonar	30
Investigação de síndrome antifosfolípide	31
Determinações específicas dos marcadores de disfunção endotelial e coagulação intravascular	31
Desenho do estudo	34
Análise estatística	35
Aspectos éticos	37

Resultados.....	38
Análise descritiva.....	39
Análise inferencial.....	43
Disfunção endotelial e coagulação intravascular.....	43
Discriminação entre subgrupos de pacientes com apresentação clínica distinta.....	44
Evolução das variáveis bioquímicas: comportamento dos subgrupos de pacientes.....	46
Análise evolutiva do fator de de von Willebrand.....	47
Análise evolutiva da trombomodulina.....	49
Análise evolutiva do ativador do tipo tecidual do plasminogênio.....	51
Análise evolutiva do dímero D	53
Análise evolutiva do inibidor do ativador do plasminogênio....	55
Análise dos fatores associados à trombose arterial pulmonar central.....	57
Investigação de síndrome antifosfolípide.....	60
O papel da hemodiluição.....	61
Hipóxia, plaquetas, multímeros do fator de von Willebrand e efeitos da hemodiluição.....	63
Discussão	68
Conclusões	80
Referências bibliográficas.....	83

Lista de abreviaturas

ADP	difosfato de adenosina
AML-1	<i>acute myelogenous leukemia 1</i>
CSFs	fatores estimuladores de colônias
ECE-1	enzima conversora da endotelina 1
ECGF	<i>endothelial cell growth factor</i>
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGR-1	<i>early growth response gene 1</i>
ELISA	ensaio imunoenzimático
ERK1	<i>externally regulated kinases</i>
ET-1	endotelina 1
FGF	fator de crescimento de fibroblastos
GMP cíclico	<i>guanosine 3' 5'- cyclic monophosphate</i>
HIF- 1	<i>hypoxia- inducible factor 1</i>
IGF-I	fator de crescimento insulina simile
IL-1	interleucina 1
INR	<i>international normalized ratio</i>
BPM	baixo peso molecular
MAP- kinase	<i>mitogen activated protein kinase</i>
NO	óxido nítrico
PAI-1	inibidor do ativador do plasminogênio
PDGF	fator de crescimento derivado de plaquetas
PMAP	pressão média de artéria pulmonar
SpO ₂	saturação periférica de oxigênio
TAPC	trombose arterial pulmonar central
TGF- β	fator de crescimento transformador do tipo beta
TN-C	tenacina C
t-PA	ativador do tipo tecidual do plasminogênio

u-PA	ativador do tipo uroquinase do plasmonogênio
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
vWF:Ag	antígeno do fator de von Willebrand
β-TG	beta tromboglobulina

Lista de símbolos

°C	graus Celsius
%	porcentagem
cm	centímetro
dl	decilitro
g	grama
h	hora
kDa	quilodalton
kg	quilograma
l	litros
m ²	metro quadrado
min	minuto
ml	mililitro
mm	milímetro
mM	milimol
mmHg	milímetro de mercúrio
ng	nanograma
seg	segundo
U	unidade
µl	microlitro
µm	micrômetro

Lista de Siglas

HC	Hospital das Clínicas
FMUSP	Faculdade de medicina da Universidade de São Paulo
InCor	Instituto do Coração
NYHA	New York Heart Association
WHO	World Health Organization

Lista de Tabelas

	página
Tabela 1 Classificação de hipertensão pulmonar (Veneza, 2003)	4
Tabela 2 Classe funcional adaptada para hipertensão pulmonar (NYHA/WHO)	30
Tabela 3 Dados diagnósticos e evolutivos individuais	41
Tabela 4 Evolução de condutas terapêuticas comparativamente no início e final estudo	43
Tabela 5 Marcadores de disfunção endotelial e coagulação intravascular	44
Tabela 6 Discriminação entre subgrupos de pacientes com diferentes graus de limitação funcional	45
Tabela 7 Contribuição de diferentes variáveis para a discriminação entre subgrupos de pacientes	46
Tabela 8 Valores de PAI-1, dímero D, t-PA e da relação PAI-1/t-PA aos 12 meses de evolução, dos pacientes 7, 8 e 12 (Tabela 3)	56
Tabela 9 Discriminação entre pacientes com e sem trombose arterial pulmonar central	58
Tabela 10 Valores preditivos do dímero D em relação à trombose arterial pulmonar.....	59
Tabela 11 Efeito da hemodiluição terapêutica sobre as variáveis laboratoriais	63
Tabela 12 Variáveis com possível impacto sobre a composição multimérica do fator de von Willerbrand, analisadas comparativamente antes e após a hemodiluição terapêutica.....	64

Lista Gráficos

	página
Gráficos 1 a 4 Comportamento diferencial do antígeno do fator de von Willebrand (vWF:Ag) ao longo de 24 meses (n=12) e 18 meses (n=17) de seguimento.	48
Gráficos 5 a 8 Comportamento evolutivo da trombomodulina ao longo de 24 meses (n=10) e 18 meses (n=13) de seguimento	50
Gráficos 9 a 12 Comportamento evolutivo do ativador tecidual do plasminogênio (t-PA) ao longo de 24 meses (n=12) e 18 meses (n=15) de seguimento	52
Gráficos 13 a 16 Comportamento evolutivo do dímero D ao longo de 24 meses (n=11) e 18 meses (n=15) de seguimento.....	54
Gráfico 17 Comportamento evolutivo do PAI-1 ao longo de 24 meses (n=11) de seguimento.....	55
Gráfico 18 Curvas de probabilidade de existência de trombose arterial pulmonar central em função da idade e da saturação periférica oxigênio	60
Gráfico 19 Evolução da temperatura atmosférica na cidade de São Paulo, do hematócrito e do número de hemodiluições no período de fevereiro de 2000 a março de 2003.....	62
Gráficos 20 e 21 Influência da saturação de oxigênio e do número de plaquetas circulantes sobre a composição multimérica do fator de von Willerbrand	66

Lista de Figuras

	página
Figura 1. Imagem angiotomográfica positiva para trombose arterial pulmonar central.....	57
Figura 2. A: “Western immunoblot” representativo das alterações multiméricas do fator de von Willebrand.....	67
B: Valores individuais da concentração relativa de multímeros menores (BPM/total) representados antes e após a hemodiluição ($p=0,0079$)	67

Resumo

Caramurú LH. *Estudo do impacto da disfunção endotelial e fatores correlacionados sobre a evolução de pacientes com síndrome de Eisenmenger* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2004. 98p.

Complexos mecanismos estão envolvidos na fisiopatologia da síndrome de Eisenmenger, destacando-se entre eles a disfunção endotelial. O objetivo deste trabalho foi o de estudar correlações entre a disfunção endotelial e a forma de apresentação clínica e evolução dessa doença. Foram analisadas variáveis demográficas e laboratoriais, na situação basal, evolutivamente (durante 24 meses), comparativamente entre subgrupos com apresentação clínica diversa, antes e após hemodiluição e prováveis associações com o risco de apresentar trombose arterial pulmonar central (TAPC). Os marcadores de disfunção endotelial estudados foram o fator de von Willebrand (vWF:Ag, antígeno do fator de von Willebrand), o ativador do tipo tecidual do plasminogênio (t-PA), a trombomodulina e o inibidor do ativador do plasminogênio do tipo 1 (PAI-1). O dímero D foi utilizado como marcador de coagulação intravascular. O método empregado para análise desses marcadores bioquímicos foi o ensaio imunoenzimático (ELISA). As variáveis demográficas e laboratoriais gerais consideradas foram a idade, o gênero, o diagnóstico da cardiopatia, a classe funcional segundo a *New York Heart Association* adaptada para hipertensão pulmonar pela *World Health Organization* (NYHA/WHO), o hematócrito, a contagem de plaquetas em sangue periférico, a pressão média de artéria pulmonar e a saturação periférica de oxigênio (SpO₂). Os pacientes foram divididos em dois subgrupos, conforme a gravidade clínica: o subgrupo A foi constituído de 20 pacientes em classe funcional II ou III e o subgrupo B de 10 indivíduos em classe funcional III com episódios de piora clínica característicos de classe IV. A pesquisa de TAPC foi feita por meio da angiotomografia de tórax. As principais medidas terapêuticas instituídas durante o acompanhamento foram a hemodiluição, a oxigenioterapia, a anticoagulação com warfarina e a reposição de ferro sérico. No período de fevereiro de 2000 a março 2003 foram estudados 30 pacientes (16 do gênero feminino) portadores de síndrome de Eisenmenger. A idade variou de 4 a 61 anos (32,3 ± 12,7 anos); a pressão média de artéria pulmonar foi de 30 a 98 mmHg (57 ± 15 mmHg), a SpO₂ oscilou entre 67 a 97% (85 ± 8%); o hematócrito situou-se entre 39 a 69% (57 ± 8%). Em situação basal, evidenciaram-se níveis plasmáticos elevados do vWF:Ag (p=0,0007), do t-PA (p=0,0007) e diminuídos de trombomodulina (p<0,0001) em relação ao grupo controle, caracterizando-se o quadro de disfunção endotelial. A discriminação entre os subgrupos com gravidade clínica distinta fez-se pelo registro no subgrupo B de concentrações plasmáticas maiores de vWF:Ag (p=0,0455), dímero D (p=0,0204) e níveis menores de SpO₂ (p<0,0001). Evolutivamente, no grupo como um todo, observou-se diminuição dos níveis plasmáticos do vWF:Ag (p<0,0001) e do t-PA (p=0,028). Por outro lado os níveis de trombomodulina

permaneceram baixos. Embora o dímero D não tenha apresentado alteração significativa de seus valores, houve o registro de níveis plasmáticos superiores a 400 ng/ml em indivíduos adequadamente anticoagulados com warfarina. Na análise evolutiva do PAI-1 registraram-se alguns valores superiores ao intervalo de tolerância (intervalo que contém 90% das observações em indivíduos normais, com probabilidade superior a 0,95). Na evolução, o subgrupo B manteve níveis maiores de vWF:Ag em relação ao A ($p=0,0063$). Diagnosticou-se a TAPC em nove dos 24 pacientes (37,5%) submetidos à investigação. As variáveis que estiveram associadas à presença de TAPC foram a idade mais avançada, a menor SpO_2 e níveis maiores de dímero D plasmático. Com base nos resultados obtidos demonstrou-se que pacientes com síndrome de Eisenmenger e SpO_2 em torno de 85% têm, a partir dos trinta anos de idade, probabilidade exponencialmente crescente de apresentarem TAPC. Após a hemodiluição, realizada nos pacientes que preencheram os critérios clínicos e laboratoriais de indicação, houve discreto aumento dos níveis de trombomodulina, melhora das alterações multiméricas do fator de von Willebrand, diminuição do hematócrito e aumento do número de plaquetas circulantes. Ao se efetuar a análise qualitativa do fator de von Willebrand observou-se que as alterações multiméricas encontradas (desaparecimento das frações de alto peso molecular e aumento das formas de baixo peso) tiveram relação direta com o grau de hipoxemia e trombocitopenia. No presente estudo, a análise em conjunto dos resultados mostrou que o quadro de disfunção endotelial está presente nesses pacientes e correlaciona-se com a gravidade clínica, assim como com os fenômenos trombóticos. A melhora apenas parcial do nível plasmático de alguns marcadores ao longo do tempo, frente ao tratamento clínico convencional, tem implicações prognósticas, uma vez que persistem as condições para desenvolvimento de fenômenos trombóticos. Tais observações refletem a necessidade da utilização de recursos terapêuticos mais eficazes e com maior precocidade.

Summary

Caramurú LH. *Study of the impact of endothelial dysfunction and correlated factors upon the evolution of patients with Eisenmenger syndrome* [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2004. 98p.

Complex mechanisms are involved in the pathophysiology of Eisenmenger syndrome, amongst which the endothelial dysfunction appears as a key factor to be analysed. The goal of this work was to study correlations between endothelial dysfunction and the clinical form of presentation and evolution of this disease. Demographic and laboratorial variables were analysed in baseline situation, as well as their evolution was followed during a period of 24 months, comparatively amongst subgroups with different clinical aspects, before and after hemodilution, and probable associations to the risk of presenting central pulmonary arterial thrombosis (CPAT). The endothelial dysfunction markers studied were the following: the von Willebrand factor (vWF:Ag, von Willebrand factor antigen), the plasminogen tissue activator (t-PA), thrombomodulin and the plasminogen inhibitor type 1 (PAI-1). The D dimer was used as a marker of intravascular coagulation. The method employed to analyse these biochemical markers was the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Demographic and general laboratorial variables considered were age, gender, diagnosis of cardiopathy, functional class according the New York Heart Association and adapted to pulmonary hypertension by the World Health Organization (NYHA/WHO), hematocrit, the platelets count in peripheral blood, the mean pulmonary artery pressure and peripheral oxygen saturation (SpO₂). Patients were divided into two subgroups according the clinical aggravation: subgroup A contained 20 patients in functional class II or III and subgroup B contained 10 patients in functional class III with episodes of clinical worsening characteristic of class IV. The investigation of CPAT was done through thorax angiothomography. The main therapeutical measures applied following the study were hemodilution, oxygen therapy, anticoagulation with warfarin and seric iron reposition. From February 2000 to March 2003, 30 patients (16 female) with Eisenmenger syndrome were studied. The patients' ages varied from 4 to 61 years old (32.3 ± 12.7 years). Their mean pulmonary arterial pressure varied from 30 to 98 mmHg (57 ± 15 mmHg), and their SpO₂ fluctuated between 67 and 97% ($85 \pm 8\%$). Hematocrit showed between 39 and 69% ($57 \pm 8\%$). At baseline condition, higher plasmatic levels of vWF:Ag ($p=0.0007$) and of t-PA ($p=0.0007$) became evident as well as lower levels of thrombomodulin ($p<0.0001$) in comparison to those of the control group, characterizing typical endothelial dysfunction. The subgroup B was discriminated from the subgroup A by finding evidence of higher plasmatic levels of vWF:Ag ($p=0.0455$), D dimer ($p=0.0204$) and lower levels of SpO₂ ($p<0.0001$). Considering the group as a whole, we verified an evolution of decreasing plasmatic levels of vWF:Ag ($p<0.0001$) and t-PA ($p=0.028$). On the other hand, thrombomodulin levels remained low. Although the D dimer did not present significant changes, we found plasmatic levels higher than

400 ng/ml in properly anticoagulated individuals with the use of warfarin. The evolutive analysis of PAI-1 showed some peak values ranging above the tolerance interval (interval which contains 90% of observations in normal individuals, with probability above 0.95). In evolution, subgroup B maintained higher levels of vWF:Ag as compared to subgroup A ($p=0.0063$). CPAT was diagnosed in 9 out of 24 patients (37,5%) submitted to this study. Variables associated to the presence of TAPC were: higher age, lower level of SpO₂ and higher levels of plasmatic D dimer. Based on the results, it became evident that patients from the age of 30 on, with Eisenmenger syndrome and SpO₂ of about 85%, will have exponentially increasing probability of presenting CPAT. After hemodilution procedures applied to patients who fulfilled clinical and laboratorial reference criteria, we verified a slight increase in thrombomodulin levels, improvement of the changes in the multimeric composition of the von Willerbrand factor, decrease of hematocrit and increase of the circulating platelets count. During the qualitative analysis of the von Willerbrand factor, we observed that the changes found in the multimeric composition (disappearance of fractions of high molecular weight and increase of low weight forms) are directly related to the degree of hypoxemia and thrombocitopenia. In this study, the conjoint analysis of the findings showed that endothelial dysfunction is present in these patients and is correlated to clinical aggravation as well as to thrombotic phenomena. With time, considering conventional treatment, the merely partial improvement of plasmatic levels of some markers has implications in prognosis, once conditions to develop thrombotic phenomena persisted. These findings show the need of using more effective therapeutic means at an earlier stage of the disease.

Introdução

HIPERTENSÃO PULMONAR: DEFINIÇÃO E CLASSIFICAÇÃO

A circulação pulmonar é dotada de propriedades particulares que a diferenciam, em certos aspectos, da circulação sistêmica. O fluxo sanguíneo pulmonar tem igual magnitude ao fluxo fornecido a todos os outros órgãos de nosso corpo. Para acomodar tal volume, o pulmão é dotado de extenso leito vascular, com uma grande área de superfície celular endotelial recobrando o mesmo. Em condições de normalidade, o leito vascular pulmonar constitui um sistema de alto fluxo, de baixa pressão e de alta complacência ¹. Estas propriedades trazem a esse sistema, quando íntegro de suas funções, a capacidade de acomodar volumes de até seis vezes o normal, como por exemplo, frente a situações de exercício físico ².

A pressão média arterial pulmonar situa-se entre 12 e 16 mmHg. Considerando-se que a pressão média venosa pulmonar encontra-se normalmente entre 6 e 10 mmHg, o gradiente transpulmonar total varia entre 2 e 10 mmHg em indivíduos normais. Em geral, o valor da resistência pulmonar total equivale a 1 unidade Wood/m² ou 67±23 dyne-seg·cm⁻⁵, correspondendo a menos de um décimo da resistência sistêmica ¹.

Pacientes portadores de alterações na circulação pulmonar têm limitação de resposta a situações de maior demanda, pois apresentam déficit de complacência e perda da capacidade de recrutar vasos (normalmente não perfundidos). Ao conjunto de alterações vasculares que culminam com o aumento de pressão na pequena circulação denomina-se “remodelagem patológica” dos vasos pulmonares, que difere da “remodelagem fisiológica” que se segue ao nascimento ³.

O termo hipertensão pulmonar foi adotado em 1951 por Dresdale e Michtom ⁴ apud Boyce e Waxman, ao descreverem um grupo de 39 pacientes com pressão arterial pulmonar elevada. A hipertensão pulmonar constitui uma síndrome de etiologia diversa e caracteriza-se por elevação da pressão média arterial pulmonar a níveis superiores a 25 mmHg em repouso ou a 30 mmHg durante o exercício ⁵.

Em 1998, em Evian, França, a *World Health Organization* (WHO) propôs a classificação da hipertensão pulmonar baseada na localização anatômica da doença, assim como na presença ou não de doenças associadas ⁶. Em 2003, em Veneza, Itália, a proposta anterior de classificação foi revista, discutida e atualizada, com base em novos conceitos etiopatogênicos e fisiopatológicos ⁷. Os itens correspondentes a essa classificação mais recente encontram-se dispostos na Tabela 1.

TABELA 1. Classificação de hipertensão pulmonar (Veneza, 2003)

Hipertensão arterial pulmonar

Idiopática

Familiar

Relacionada a

*Doenças do tecido conectivo**Cardiopatias congênitas**Hipertensão portal**Infecção pelo vírus HIV**Drogas/toxinas**Outras*

Hipertensão arterial pulmonar com envolvimento venoso e/ou capilar importante

Hipertensão pulmonar persistente do recém nascido

Hipertensão pulmonar com doença do coração esquerdo

Doença atrial ou ventricular

Doença cardíaca valvar

Hipertensão pulmonar associada a alterações do sistema respiratório e/ou hipoxemia

Doença pulmonar obstrutiva crônica

Doença pulmonar intersticial

Distúrbio respiratório do sono

Distúrbios hipoventilatórios alveolares

Exposição crônica a grandes altitudes

Anomalias do desenvolvimento pulmonar

Hipertensão pulmonar secundária à doença trombótica e/ou embólica crônica

Obstrução tromboembólica de artérias pulmonares proximais

Obstrução tromboembólica de artérias pulmonares distais

Embolia pulmonar (trombo, tumor, ovos e/ou parasitas, material estranho)

Miscelânea

Sarcoidose

Histiocitose X

Linfangiomasose

Compressão de vasos pulmonares

*Adenopatias**Tumores**Mediastinite fibrosante*

No presente estudo, acompanhamos um grupo de pacientes portadores exclusivamente de hipertensão arterial pulmonar associada a cardiopatias congênitas, visando a melhor compreensão de mecanismos fisiopatológicos envolvidos e possíveis implicações terapêuticas.

HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR ASSOCIADA A CARDIOPATIAS CONGÊNITAS: PECULIARIDADES DA SÍNDROME DE EISENMENGER

A primeira descrição da síndrome de Eisenmenger data de 1897, quando Victor Eisenmenger⁸ apud Rozenzweig, Barst relatou o caso clínico de um paciente de 32 anos, do sexo masculino, portador de comunicação interventricular e doença vascular pulmonar hipertensiva grave, que fora a óbito por quadro de hemoptise exuberante. Em 1958, Paul Wood⁹ apud Rozenzweig, Barst descreve a ocorrência de hipertensão arterial pulmonar (com elevada resistência vascular) em outros tipos de defeitos congênitos do sistema cardiovascular, com comunicações intra ou extra cardíacas.

Após esses relatos, a síndrome de Eisenmenger passou a ser definida como hipertensão arterial pulmonar acentuada, associada a cardiopatias congênitas, onde as seguintes características estariam presentes: pressão arterial pulmonar em nível sistêmico ou próximo a este; resistência vascular pulmonar elevada; fluxo bidirecional ou com sentido de direita para esquerda através dos diversos tipos de comunicações; graus variados de hipoxemia e eritrocitose.

FISIOPATOLOGIA

Estrutura normal dos vasos pulmonares e modificações na hipertensão pulmonar

A parede das artérias possui três camadas: a mais externa é a adventícia, contendo fibroblastos; a média é composta de células musculares lisas e uma ou duas lâminas elásticas (limitantes interna e externa); a mais interna, denominada íntima, é composta por uma única camada de células endoteliais, que repousa sobre a membrana basal. Em cada uma delas, há também vários tipos de componentes extracelulares, tais como o colágeno, a elastina, a laminina, a fibronectina e os proteoglicanos.

A anatomia dos vasos arteriais pulmonares obedece a um padrão funcional ^{1,3,10}, sendo que os vasos condutores encontram-se localizados mais centralmente e os vasos de resistência mais periféricamente. Partindo-se de vasos de maior para menor diâmetro, as fibras elásticas tornam-se, distalmente, menos proeminentes e há predomínio de células musculares lisas. Em pequenas artérias musculares, a lâmina elástica externa desaparece. Distalmente aos bronquíolos terminais (entrada dos ácinos respiratórios) as artérias tornam-se apenas parcialmente muscularizadas, sobretudo em crianças, sendo que, nas pequenas artérias intra-acinares, não há camada muscular. Este segmento pré-capilar é o local de maior dissipação de pressão no sistema circulatório pulmonar. Levando-se em consideração que esta região é a maior responsável pelo controle da resistência vascular pulmonar, devemos ter em mente que pequenas

alterações funcionais (tônus) ou estruturais neste local podem levar a grandes aumentos na pressão arterial pulmonar. Os segmentos mais distais das arteríolas pré-capilares contêm uma camada única de células endoteliais apoiada na lâmina basal.

Durante o desenvolvimento da hipertensão pulmonar, ocorrem marcantes modificações estruturais nas células endoteliais, musculares lisas e nos fibroblastos (presentes na adventícia) dos vasos pulmonares ^{10,11}. Essas mudanças nos diversos tipos de células determinam alterações do tônus, da reatividade e da resistência vascular pulmonar, presentes na doença. A remodelagem vascular caracteriza-se por aumento da espessura das três camadas do vaso, decorrente de hipertrofia e/ou hiperplasia celular e deposição aumentada de componentes da matriz extracelular. Quando o processo se instala nos primeiros anos de vida, ocorre a muscularização de arteríolas distais, as quais, em condições fisiológicas, não são muscularizadas.

Os mecanismos envolvidos no processo de muscularização distal ainda não estão totalmente esclarecidos. Evidências sugerem que células intermediárias são recrutadas para próximo do vaso, sendo então incorporadas e diferenciadas em miócitos. Assim, nas artérias mais distais (com 20 a 30 μm de diâmetro) a diferenciação de pericitos e o recrutamento de fibroblastos vizinhos constituem parte do processo de remodelagem, considerando-se que algumas dessas células acabam por adquirir fenótipo de célula muscular lisa ¹².

A hipertrofia da camada muscular em artérias já muscularizadas, a formação de novas camadas elásticas entre as células e o aumento de colágeno do tipo I contribuem para a diminuição do lúmen e endurecimento da parede vascular. Os mecanismos envolvidos neste processo parecem ter início na lesão de células endoteliais e aumento de sua permeabilidade a fatores séricos ¹³.

Outro achado característico em várias formas de hipertensão pulmonar grave é a formação da neoíntima. Ela é composta de células (miofibroblastos), de matriz extracelular e desenvolve-se na região entre o endotélio e a lâmina elástica interna. Experimentos em modelos animais, com uso de monocrotalina em combinação com alto fluxo pulmonar (induzido por pneumectomia), demonstraram o desenvolvimento da neoíntima ¹⁴. Entretanto, quando se utilizou a monocrotalina ou a hipóxia, isoladamente como fator de injúria endotelial, na ausência de hiperfluxo, não houve a formação da neoíntima. Tais relatos sugerem que o aumento de fluxo, como ocorre nas cardiopatias congênitas com *shunt de* esquerda para direita, seria um importante estímulo à formação da neoíntima ¹⁵.

Nas formas mais avançadas de hipertensão pulmonar, evidenciam-se alterações histopatológicas particulares. As mesmas são representadas pelas lesões dilatadas (plexiformes, angiomatóides) e pela necrose fibrinóide ou arterite necrotizante. A lesão plexiforme caracteriza-se pela proliferação desordenada de células de origem diversa, formando aglomerados ou tufos que delimitam capilares. A lesão angiomatóide caracteriza-se por numerosos vasos de paredes finas, congestionados, com diâmetros diversos, que circundam

uma artéria muscular. Acredita-se que o processo de reparação das lesões do tipo necrose fibrinóide possa dar origem a essas “lesões dilatadas”.

Em 1958 Heath e Edwards ¹⁶ apud Granton, Rabinovitch propuseram uma classificação da vasculopatia pulmonar baseada nos achados histológicos das lesões. Foram seis os níveis descritos de alterações: grau I, hipertrofia da túnica média; grau II, hipertrofia da túnica média acompanhada de espessamento intimal; grau III, espessamento intimal com fibrose oclusiva da luz vascular; grau IV, lesões plexiformes; grau V, lesões angiomasóides; grau VI, arterite necrotizante. Permanece ainda em discussão se os níveis descritos representam necessariamente uma progressão temporal em todos os casos. Fica também como um ponto ainda não esclarecido, se as lesões dilatadas antecedem ou ocorrem como consequência da necrose fibrinóide.

Disfunção endotelial: aspectos relevantes na hipertensão pulmonar

O endotélio possui características particulares, sendo dotado de superfície lisa, com propriedades antiaderentes, antiagregantes e antitrombóticas. Em situações de injúria, há perda dessas propriedades, com desvio da condição basal de equilíbrio para um estado pró-agregante e pró-trombótico ¹⁷. Paralelamente a essas alterações, observa-se a perda da propriedade de gerar vasodilatação ¹⁸. Ao conjunto de alterações morfológicas, bioquímicas e funcionais do endotélio que ocorrem em diferentes situações patológicas denomina-se disfunção endotelial.

A disfunção endotelial na hipertensão pulmonar caracteriza-se, entre outras alterações, pela produção deficiente de substâncias vasodilatadoras, antiagregantes plaquetárias e anti mitogênicas, tais como a prostaciclina e o óxido nítrico (NO) ¹⁹⁻²². Essa ocorrência está associada ao aumento na expressão e secreção (endotelial e plaquetária) de potentes vasoconstritores e indutores de crescimento celular como o tromboxane A₂ e a endotelina-1 (ET-1) ¹⁹⁻²¹.

A síndrome de Eisenmenger, antes de caracterizada como tal, tem como primeiro fator de injúria endotelial o elevado fluxo pulmonar, com conseqüente aumento das forças mecânicas agindo em sua superfície ^{23,24}. Com a evolução do quadro lesional, ocorre inversão do fluxo nas cavidades cardíacas ou grandes vasos (agora de direita para esquerda), hipoxemia e eritrocitose. Além da hipoxemia crônica e da hiperviscosidade sangüínea decorrente da eritrocitose (efeito mecânico), uma série de alterações na função endotelial é descrita em decorrência da liberação aumentada da eritropoetina ²⁵. Esta possui propriedades mitogênica, quimiotática e angiogênica, além de induzir o aumento da síntese de ET-1 e do inibidor do ativador do plasminogênio do tipo 1 (PAI-1).

Perda da capacidade endotelial de mediar a vasodilatação

Estudos clássicos demonstraram que o NO, em indivíduos sadios e em condições de normóxia, tem importante papel na manutenção do tônus vascular basal ²⁶⁻²⁸. O NO é produzido na célula endotelial através da ação

da enzima óxido nítrico sintase constitutiva sobre o aminoácido L-arginina. Após ser liberado pela célula endotelial, difunde-se para a célula muscular lisa adjacente e aumenta a atividade da guanilato ciclase, que catalisa a produção de GMP cíclico. A diminuição subsequente do cálcio intracelular resulta em vasodilatação. Além da ação vasodilatadora, o NO tem a propriedade de inibir o crescimento de células musculares lisas e a agregabilidade plaquetária.

Giaidi e Saleh ²⁹, em 1995, demonstraram haver diminuição de expressão da NO sintase nas células endoteliais pulmonares de pacientes com hipertensão pulmonar idiopática e secundária. Experimentos com camundongos, com mutação no gene da enzima óxido nítrico sintase endotelial ³⁰, demonstraram aumento na pressão arterial pulmonar destes animais e vasodilatação deficiente frente ao estímulo com acetilcolina. Estes achados sugerem o importante papel do NO na manutenção do tônus vascular pulmonar.

Christman *et al.* ³¹, em 1992, demonstraram que pacientes com hipertensão pulmonar primária e secundária apresentavam excreção urinária diminuída de metabólitos da prostaciclina e aumentada de metabólitos do tromboxane A₂. O tromboxane A₂, cuja principal fonte de produção é a plaqueta, é um potente vasoconstrictor e tem ação de estimular a agregação plaquetária. O aumento da excreção urinária de seus metabólitos sugere a ocorrência, *in vivo*, de hiperatividade plaquetária e estímulo à vasoconstrição. As ações da prostaciclina são opostas às do tromboxane A₂, ou seja, é vasodilatadora e antiagregante plaquetária. Sua principal fonte de

produção é a célula endotelial. O encontro de diminuição da excreção urinária de seus metabólitos em hipertensão pulmonar retrata a disfunção endotelial e conseqüente perda da capacidade vasodilatadora e antiagregante plaquetária.

A ET-1, um peptídeo de 21 aminoácidos, resultante da ação de sua enzima conversora (ECE-1) sobre a pró-endotelina, é o mais potente agente vasoconstrictor endógeno identificado. Agindo, sobretudo através de receptores ET-A em células musculares lisas, a ET-1 promove sinalização intracelular através da proteína G e fosfolipase C, aumentando a concentração intracelular de diacil glicerol e trifosfato de inositol. Além disso, a ET-1 é ativadora da via das MAP- kinases. Através desses mecanismos, a ET-1 promove aumento na concentração intracelular de cálcio, vasoconstrição e replicação celular^{32,33}.

Na hipertensão pulmonar idiopática e na síndrome de Eisenmenger, há evidências de aumento da concentração plasmática e de hiper-expressão de ET-1 nas células endoteliais pulmonares, sugerindo seu envolvimento fisiopatológico³⁴⁻³⁷. Em condições de normalidade, o pulmão tem a função de realizar a depuração da ET-1 circulante. Dessa forma, sua concentração em veias pulmonares é menor do que na artéria pulmonar. Em situações patológicas, como na hipertensão pulmonar idiopática, a perda da capacidade endotelial pulmonar de promover a depuração da ET-1, associada ao aumento da síntese e secreção da mesma, resulta em aumento da sua concentração em veias pulmonares³⁸. Estudos sugerem

correlação entre níveis mais elevados de ET-1 e gravidade da hiperresistência pulmonar, na hipertensão pulmonar idiopática ³⁹.

Giaid ⁴⁰ em 1993 mostrou haver aumento da imunorreatividade para a ECE-1 em células endoteliais pulmonares de indivíduos com hipertensão pulmonar. Esta enzima é essencial para a geração da forma ativa do peptídeo. Tal achado indica que o aumento de ET-1 plasmática nesses pacientes pode ser, em parte, resultado deste processo de conversão.

Endotélio e remodelagem vascular na hipertensão pulmonar

O endotélio tem participação ativa e passiva no processo de remodelagem vascular pulmonar na hipertensão pulmonar. A participação ativa ocorre através da produção e liberação de mitógenos, fatores peptídicos de crescimento, enzimas proteolíticas e componentes de matriz extracelular. Lembremos que a ET-1, além de ser um peptídeo vasoativo, é um mitógeno para a célula muscular lisa. Alguns dos fatores de crescimento expressos pela célula endotelial são a interleucina 1 (IL-1), o fator de crescimento transformador do tipo beta (TGF- β), o fator de crescimento semelhante ao derivado de plaquetas (ECGF/PDGF), os fatores de crescimento de fibroblastos de tipo ácido e básico (FGF1 e FGF2), fatores estimuladores de colônias (CFSs) e o fator de crescimento insulina simile do tipo I (IGF-I) ⁴¹⁻⁴³. A célula endotelial possui receptores de alta afinidade para a maioria desses fatores de crescimento, os quais são capazes de agir de forma autócrina ou parácrina. Como exemplo de serino proteases expressas

pelo endotélio, com conhecida ação moduladora do crescimento celular, temos a elastase, os ativadores do plasminogênio (u-PA, ativador do tipo uroquinase do plasminogênio; t-PA, ativador do tipo tecidular do plasminogênio) e o PAI-1.^{44,45} Os ativadores do plasminogênio (em especial o u-PA) têm a propriedade de liberar da matriz extra-celular fatores de crescimento, como o TGF- β e o FGF2.

A participação passiva do endotélio decorre das alterações estruturais. No processo lesional, falhas da continuidade entre as células endoteliais levam à perda da função de barreira, permitindo que fatores séricos, entre eles presumivelmente a apolipoproteína A 1, penetrem na região sub endotelial^{46,47}. Há evidências de que esses fatores promoveriam uma interação entre a membrana das células musculares lisas e a elastina, resultando numa série de eventos de sinalização celular, que culminariam com a ativação de MAP-kinases (ERK1) e da proteína AML-1 (*acute myelogenous leukemia 1*). Esta última, já identificada como um fator de transcrição para a elastase de neutrófilos, seria também uma candidata à indução da elastase endovascular. O papel das elastases tem sido exaustivamente estudado na doença vascular pulmonar, tanto na liberação de fatores de crescimento armazenados na matriz, como na modulação fenotípica de células musculares lisas, através dos peptídeos da elastina.

Para que as células musculares lisas respondam de maneira otimizada a fatores de crescimento, as mesmas devem ser previamente “preparadas”. Conforme modelo proposto, este “preparo” ocorreria a partir da ligação das mesmas com uma proteína de matriz extracelular denominada tenacina C

(TN-C)⁴⁸. A síntese de TN-C é induzida por elastases, metaloproteinases e pelo FGF-2. A ligação das células com a TN-C (através de integrinas da classe β_3), induziria a expressão de receptores para diversos fatores de crescimento como FGF e EGF, deixando-as prontas para o processo de replicação. Desta forma, proteínas de matriz extracelular, como a TN-C e a fibronectina, esta última induzida, por exemplo, por peptídeos de elastina, seriam capazes de modular fenotipicamente as células musculares lisas, alterando sua capacidade de responder a fatores de crescimento e, conseqüentemente, suas propriedades de síntese, secreção, movimento e replicação.

Alterações das propriedades anticoagulantes e antitrombóticas do endotélio na hipertensão pulmonar

O endotélio tem importante papel na manutenção do fluxo sangüíneo e na prevenção do desenvolvimento de trombos no sistema circulatório. Sua participação neste cenário ocorre através de três principais propriedades: a de inibir a cascata da coagulação, a de prevenir a ativação e agregação plaquetária e a de estimular a fibrinólise.

A propriedade anticoagulante caracteriza-se pela síntese de sulfato de heparan (que se liga à antitrombina III), da trombomodulina e do inibidor da via extrínseca da coagulação (inibidor da via do fator tecidual). A trombomodulina, um proteoglicano rico em sulfato de condroitin, inibe a atividade trombínica e induz a formação de proteína C ativada, a qual é responsável pela degradação dos fatores Va e VIIIa da coagulação⁴⁹⁻⁵¹.

A prevenção da ativação plaquetária ocorre através da produção de PGI₂ e NO, assim como da expressão de ectonucleotidases em sua superfície. As últimas convertem ADP (que é ativador de plaquetas) em adenosina. Além disso, a presença de proteoglicanos com carga negativa na superfície endotelial, em especial o heparan sulfato, repele as plaquetas, prevenindo a sua adesão.

O mecanismo de fibrinólise é desencadeado a partir da liberação do t-PA de seus sítios de armazenamento nas células endoteliais. A ação do t-PA sobre o plasminogênio, gerando a serino protease plasmina, é modulada pela presença dos seus inibidores, por exemplo, o PAI-1, também liberado por células endoteliais e plaquetas.

Estudos clássicos têm demonstrado que pacientes portadores de hipertensão pulmonar idiopática têm alta propensão para a ocorrência de trombose arterial pulmonar ^{52,53}. O estado pró-coagulante e pró-trombótico, que se instala nestes pacientes seria, em certos aspectos, um resultado da disfunção endotelial. Neste contexto, o encontro de níveis plasmáticos diminuídos de trombomodulina e de proteína C, assim como do aumento do tempo de lise do coágulo pela euglobulina e dos níveis circulantes do PAI-1, apontam na direção de hipercoaguabilidade associada a fibrinólise defectiva ⁵⁴⁻⁶⁰.

Cacoub ⁶¹ *et al.* demonstraram que pacientes com hipertensão pulmonar, inclusive com síndrome Eisenmenger, têm níveis plasmáticos diminuídos de trombomodulina. As espécies de trombomodulina detectadas no plasma por métodos imunoenzimáticos são, em verdade, fragmentos

proteolíticos que perderam os domínios intracelular e transmembrana. Infere-se que a diminuição dos níveis plasmáticos desses fragmentos estaria refletindo a redução do proteoglicano na superfície endotelial. Lembremos que em alguns tipos de hipertensão pulmonar, como na síndrome de Eisenmenger, a hipoxemia se faz presente. Em estudo envolvendo animais transgênicos (murídeos) deficientes em trombosmodulina e submetidos a regime de hipóxia, demonstrou-se extensa deposição pulmonar de fibrina ⁶². Esses achados ressaltam o papel protetor da trombosmodulina em situações de hipoxemia crônica.

Em pacientes com síndrome de Eisenmenger, na presença de eritrocitose, a diminuição do número e da meia vida das plaquetas circulantes indica reciclagem aumentada das mesmas, sugerindo consumo crônico ⁶³. Este estado de ativação endógena pode ser confirmado pela observação de níveis elevados de β -tromboglobulina plasmática ⁶⁴, uma proteína liberada durante a reação de secreção plaquetária. Além disso, tem sido observada hiperfosforilação em tirosina, em diversas proteínas plaquetárias, achado este compatível com pré-ativação ⁶⁵. Acrescente-se a identificação de níveis circulantes elevados do fator de von Willebrand (vWF:Ag, antígeno do fator de von Willebrand). Esta proteína, expressa exclusivamente em células endoteliais e megacariócitos, atua como molécula de adesão plaquetária, além de aumentar a vida média do fator VIII da coagulação ⁶⁶.

IMPLICAÇÕES CLÍNICAS DA DISFUNÇÃO ENDOTELIAL, PLAQUETÁRIA E HIPERCOAGULABILIDADE NA SÍNDROME DE EISENMENGER

Alguns estudos descreveram a síndrome de Eisenmenger como uma doença complexa, onde há disfunção de múltiplos órgãos⁶⁷⁻⁶⁹. São ressaltadas alterações do sistema hematológico (coagulação, fibrinólise), do sistema nervoso central (acidente vascular isquêmico, parestesias), da função renal (aumento de uréia e creatinina, proteinúria elevada) e, na circulação pulmonar, há o aumento do risco de trombose e infarto. Apesar do elevado risco de complicações trombóticas pulmonares, episódios documentados de hemoptise exuberante trazem a estes indivíduos alto risco de sangramento e restrições à anticoagulação. Portanto, o estabelecimento de critérios que possam auxiliar na indicação do uso de anticoagulantes ainda permanece um assunto em discussão.

Na síndrome de Eisenmenger, as diferentes formas de apresentação clínica, no que diz respeito ao grau de hipoxemia e de limitação funcional, associadas a peculiaridades individuais quanto à ocorrência de trombose, sugerem diferenças (entre pacientes ou grupos de pacientes) no comportamento biológico das células endoteliais. Assim, a identificação de fatores que possam estar associados à forma de apresentação clínica e à tendência de trombótica, seria de grande interesse fisiopatológico, com implicações terapêuticas. A realização de hemodiluições periódicas para alívio de sintomas de hiperviscosidade sangüínea permitiu a análise do comportamento endotelial frente a diferentes condições reológicas. Outro

aspecto pouco conhecido é o impacto, ao longo do tempo, das medidas terapêuticas convencionais (hemodiluição, oxigenioterapia domiciliar crônica) sobre o comportamento evolutivo do quadro de disfunção endotelial. O interesse na melhor compreensão desses fenômenos estimulou-nos a realizar o presente estudo.

Objetivos

OBJETIVO GERAL

O presente estudo foi planejado visando identificar e caracterizar a disfunção endotelial e a ocorrência de coagulação intravascular em portadores de síndrome de Eisenmenger, correlacionando esses fatores com a gravidade clínica, ocorrência de trombose pulmonar e evolução frente ao tratamento clínico.

ESPECIFICAÇÕES

1. Verificar a presença de disfunção endotelial e coagulação intravascular em pacientes com síndrome de Eisenmenger.
2. Verificar se pacientes com níveis distintos de gravidade clínica em termos de sintomas, podem ser caracterizados através de variáveis bioquímicas relacionadas à disfunção endotelial e coagulação intravascular, além de dados demográficos, hemodinâmicos e oximétricos.
3. Analisar o comportamento de variáveis ligadas à disfunção endotelial e coagulação intravascular disseminada, cronicamente após o estabelecimento de medidas terapêuticas. Verificar possíveis diferenças evolutivas dessas variáveis, em pacientes com níveis distintos de gravidade clínica.
4. Analisar possíveis fatores de risco para a existência de trombose arterial pulmonar central nos mesmos pacientes.

5. Verificar o efeito da hemodiluição terapêutica, rotineiramente utilizada nesses pacientes, sobre as diferentes variáveis laboratoriais.
6. Verificar se as alterações estruturais do fator de von Willebrand, um marcador de lesão endotelial, poderiam estar associadas a outras anormalidades laboratoriais que ocorrem na síndrome, na tentativa de se estabelecer hipóteses fisiopatológicas para esta ocorrência. Analisar o impacto da hemodiluição sobre tais alterações.

Métodos

POPULAÇÃO ESTUDADA

O estudo desenvolveu-se no período compreendido entre fevereiro de 2000 e março de 2003 e incluiu pacientes portadores de síndrome de Eisenmenger, em faixa etária pediátrica e adulta, em seguimento no ambulatório da Unidade Clínica de Cardiologia Pediátrica e Cardiopatias Congênitas do Adulto, no Instituto do Coração - HCFMUSP. Esses pacientes manifestavam sintomas de classe funcional II ou III da *New York Heart Association* (NYHA), sendo que alguns deles tinham histórico de episódios de sintomas de classe IV. Alguns indivíduos, em virtude de apresentarem eritrocitose associada a sintomas de hiperviscosidade sangüínea, foram candidatos a sessões periódicas de hemodiluição.

Critérios de inclusão

Somente foram incluídos pacientes com hipertensão arterial pulmonar associada a cardiopatias congênitas, sendo que nenhuma outra forma de hipertensão pulmonar foi estudada. Consideraram-se, para efeito de inclusão, apenas os pacientes com pressão média arterial pulmonar igual ou superior a 30 mmHg em repouso, estimada de maneira não invasiva pelo ecocardiograma transtorácico. Em presença de cardiopatia originalmente cianogênica, somente foram incluídos pacientes com pressão média arterial pulmonar igual ou superior a 40 mmHg. A presença de insaturação periférica de oxigênio também foi estabelecida como critério de inclusão. Em raras

situações, a mesma não esteve presente na condição de repouso, porém tornou-se evidente em todos os indivíduos após mínimo esforço físico, como uma caminhada normal. Somente foram incluídos indivíduos sem sinais clínicos e radiológicos sugestivos de congestão veno-capilar pulmonar. Esses critérios foram adotados com o objetivo de se incluírem apenas pacientes com graus significantes de comprometimento da vasculatura pulmonar, excluindo aqueles portadores de cardiopatias congênitas associadas a hipertensão pulmonar ainda passíveis de tratamento cirúrgico. Obedecidos estes critérios, os pacientes foram incluídos no estudo de maneira consecutiva.

Critérios de exclusão

Foram excluídos os pacientes com alteração hemodinâmica grave, que necessitavam fazer uso de drogas vasoativas e cuidados intensivos por períodos prolongados. Entretanto, permitiu-se a inclusão de pacientes com episódios de descompensação clínica, manifestando sintomas compatíveis com classe funcional IV, sendo temporariamente assistidos em unidade de emergência. Ressalte-se que os dados referentes à avaliação laboratorial nesses indivíduos foram sempre obtidos em períodos não críticos, durante o seguimento ambulatorial.

Pacientes com quadro clínico e laboratorial compatível com tromboembolismo pulmonar crônico ou história (pessoal, familiar) de trombose venosa profunda ou trombofilia não foram incluídos.

Subgrupos de pacientes

Os pacientes que preencheram os critérios de inclusão foram divididos em dois grupos, conforme o quadro de apresentação clínica e história recente. Aqueles com sintomas de classe funcional II ou III foram designados como subgrupo A. Os pacientes com classe funcional III, mas que tinham o histórico de passagens transitórias e freqüentes pela unidade de emergência, motivadas por descompensação clínica, em classe funcional IV, foram designados como subgrupo B. As principais manifestações durante as internações na unidade de emergência foram dispnéia em repouso, piora da cianose, sintomas relacionados à insuficiência cardíaca direita (congestão hepática, edema de membros inferiores) e, ocasionalmente, dor torácica na presença ou ausência de escarros hemoptóicos.

TRATAMENTO

Após inclusão no estudo, os pacientes foram submetidos a tratamento clínico, tendo sido acompanhados em regime ambulatorial com retornos programados a cada três meses. As condutas terapêuticas estabelecidas não foram instituídas em todos os pacientes de maneira homogênea a partir da entrada no estudo. Devido a controvérsias existentes na literatura a respeito da utilização de algumas delas (anticoagulação, por exemplo), as mesmas foram sendo incorporadas progressivamente ao arsenal terapêutico, vindo a constituir um aprendizado com base em estreita observação clínica e laboratorial, que foi adquirido no evoluir do período de

três anos. As medidas terapêuticas utilizadas foram: anticoagulação oral com warfarina, uso crônico de oxigênio domiciliar, sessões de hemodiluição quando necessário (detalhes a seguir), reposição de ferro, controle da pressão arterial sistêmica, da função renal e eventuais manifestações neurológicas (tonturas, parestesias e alterações visuais).

A anticoagulação oral foi planejada para manter o INR (*international normalized ratio*) entre 2,0 e 3,0 (se possível ao redor de 2,5). A anticoagulação plena não foi indicada *a priori* em pacientes com contagem de plaquetas inferior a $50 \times 10^9/l$. A oxigenioterapia domiciliar foi orientada no sentido do uso de oxigênio via catéter nasal, com fluxo de dois a três litros por minuto, durante um período mínimo de 8 horas diárias. Esta medida terapêutica foi indicada apenas para pacientes com saturação periférica de oxigênio igual ou inferior a 92%.

Procedimento de hemodiluição

Os pacientes com sintomas clínicos relacionados a hiperviscosidade sangüínea secundária à eritrocitose, que tinham níveis de hematócrito acima de 60%, sem deficiência de ferro sérico, ou acima de 65%, mesmo na vigência de deficiência de ferro, foram submetidos a hemodiluição terapêutica, sendo que cada procedimento foi diretamente supervisionado pela equipe médica participante do estudo. O procedimento, já padronizado em nossa equipe, constituiu de punção venosa periférica e retirada de volume sangüíneo correspondente a 10% da volemia. A mesma foi individualmente estimada para cada paciente de acordo com a fórmula ⁷⁰:

Volemia (litros) = 1,3 + 0,08 x peso (kg). Simultaneamente, através de outra via venosa periférica, foi infundido igual volume de Dextran, de peso molecular 40.000. A duração do procedimento foi de aproximadamente 1 hora, período durante o qual o paciente permaneceu sob monitorização de frequência cardíaca, pressão arterial sistêmica e sinais neurológicos. Houve interesse em se determinar o efeito da hemodiluição sobre diversas variáveis clínicas e laboratoriais. Para tanto, as amostras de sangue para análise foram obtidas antes e quatro dias após o procedimento. Esse intervalo de tempo foi estabelecido para evitar possíveis influências da solução utilizada na reposição isovolumétrica sobre as determinações bioquímicas. As variáveis computadas antes e após a hemodiluição foram as seguintes: o hematócrito, o número de plaquetas circulantes, a saturação periférica de oxigênio, assim como o nível plasmático de marcadores endoteliais e de coagulação.

VARIÁVEIS ANALISADAS E DESENHO DO ESTUDO

Dados demográficos e laboratoriais gerais

Tendo sido preenchidos os critérios de inclusão no estudo, foram registradas informações gerais dos pacientes como: idade, gênero, diagnóstico da cardiopatia e classe funcional. Esta última foi baseada na classificação da NYHA, tendo sido adaptada para hipertensão pulmonar em 1998 no Simpósio Mundial de Hipertensão Pulmonar ⁶ (Tabela 2), realizado pela *World Health Organization* (WHO). Os valores do hematócrito e a contagem de plaquetas em sangue venoso periférico foram obtidos por método automatizado. A saturação periférica de oxigênio foi obtida por oximetria de pulso. A pressão média de artéria pulmonar foi calculada de maneira não invasiva através do ecocardiograma transtorácico ⁷¹ (com Doppler e mapeamento de fluxo em cores) a partir da curva de fluxo da insuficiência pulmonar, no plano paraesternal eixo curto. O gradiente de pressão no pico da curva, calculado através da equação de Bernoulli, representada por: $P = 4xV^2$ (onde P= gradiente de pressão e V= velocidade máxima de fluxo), equivale à pressão média de artéria pulmonar.

Tabela 2 – Classe funcional adaptada para hipertensão pulmonar*

Classe Funcional	Apresentação Clínica
Classe I	Pacientes com hipertensão pulmonar sem limitações da atividade física.
Classe II	Pacientes com hipertensão pulmonar e discreta limitação da atividade física. Apresentam-se confortáveis ao repouso, porém a atividade física habitual causa dispnéia ou fadiga, dor precordial ou pré-síncope.
Classe III	Pacientes com hipertensão pulmonar e acentuada limitação física. Apresentam-se confortáveis ao repouso, porém a atividade física mínima causa dispnéia ou fadiga, dor precordial ou pré-síncope.
Classe IV	Pacientes com hipertensão pulmonar e incapacidade de exercer qualquer tipo de atividade física sem apresentar sintomas. Esses pacientes manifestam sinais de insuficiência cardíaca direita. A dispnéia ou fadiga pode estar presente mesmo em repouso e o desconforto é exacerbado por qualquer tipo de atividade física.

* Padronização da *New York Heart Association*, adaptada para pacientes com hipertensão pulmonar, em reunião da World Health Organization, em 1998 (referência 6)

Diagnóstico de trombose arterial pulmonar

A pesquisa de trombose arterial pulmonar foi feita por angiotomografia de tórax, em aparelho Toshiba "X press", matriz 512 x 512, com uso de contraste endovenoso, colimação de 3mm, rotação em 1 segundo e velocidade de movimento da mesa de 5 mm/rotação. A reconstrução foi feita a cada 1,5 mm. Por meio deste exame, foi possível identificar falhas de enchimento em artéria pulmonar direita e esquerda, assim como em ramos lobares e segmentares. Entretanto, a árvore arterial pulmonar mais distal

não foi passível de análise. Tal limitação permitiu apenas o diagnóstico de trombose arterial pulmonar central (TAPC). As imagens foram fotografadas e armazenadas já digitalizadas para posterior análise comparativa.

Investigação de síndrome antifosfolípide

A investigação de síndrome antifosfolípide foi realizada neste estudo, por meio da pesquisa no plasma do anticorpo anticardiolipina (IgM e IgG) pelo ensaio imunoenzimático (ELISA).

Determinações específicas dos marcadores de disfunção endotelial e coagulação intravascular

Coleta das amostras e obtenção do plasma

Amostras de sangue venoso periférico foram coletadas sem garroteamento em 1:10 volumes de citrato de sódio 3,8%, contendo ácido edético (EDTA) 5mM, N-etilmaleimida 6mM, fluoreto de fenilmetilsulfonila 1mM, leupeptina 0,25mM e aprotinina 20 U/ml. As amostras foram submetidas imediatamente a centrifugação a 3000 x g por 20 min, sendo o plasma separado dos elementos figurados. Alíquotas de plasma foram estocadas a -70°C e descongeladas uma única vez para uso.

Determinação dos marcadores

Foram utilizados como índices de disfunção endotelial o vWF:Ag, a trombosmodulina, o t-PA e o PAI-1, sendo considerados neste estudo somente os respectivos níveis plasmáticos. O nível circulante do dímero D foi utilizado como índice de coagulação intravascular. Todas essas determinações foram realizadas por ELISA, utilizando-se *kits* de procedência Stago (Asnières, França), seguindo as especificações técnicas do fabricante. Os resultados foram obtidos mediante comparação dos valores de leitura óptica com uma curva padrão e expressos em ng/ml para a trombosmodulina, o t-PA, o PAI-1 e o dímero D. Os valores do vWF:Ag foram expressos em U/dl . Em todas as placas, sempre procuramos incluir controles normais de nosso laboratório, a fim de corrigir pequenas variações observadas entre diferentes lotes dos *kits* de ELISA. O número de controles nas determinações dos marcadores foi sempre superior a 20 indivíduos. O grupo controle foi constituído de indivíduos com distribuição de faixa etária e gênero semelhantes ao grupo de pacientes.

A concentração plasmática da β -trombosglobulina foi utilizada como marcador de ativação plaquetária. Sua análise foi feita por ELISA, sendo seus resultados expressos em U/ml.

Composição multimérica do fator de von Willebrand

O fator de von Willebrand foi também analisado quanto a sua estrutura multimérica. Para tanto, alíquotas de plasma (1 μ l) foram

denaturadas em Tris 10mM, SDS 2%, EDTA 1mM, uréia 8mM, azul de bromofenol 0,02%, pH 8,0, durante 1h a 56°C e posteriormente resolvidas em gel SDS-1% agarose, em Tris 40mM, SDS 0,1%, acetato de sódio 20mM e EDTA 2mM, pH 7,4. Após transferência para membrana de nitrocelulose (Tris 25mM, glicina 192mM, SDS 0,1%, metanol 20%), os multímeros do fator de von Willebrand foram identificados mediante incubação com anticorpo específico policlonal anti-vWF humano (Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA) na diluição de 1:150, por 6 h. A visualização dos multímeros foi feita por quimioluminescência, com uso de *kit* comercial (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA). Todos os filmes contendo os multímeros do fator de von Willebrand foram fotografados com a utilização de câmara digital, sendo as imagens armazenadas em computador e agrupadas para posterior análise. As fotos foram obtidas com o auxílio de transiluminador.

A análise semiquantitativa dos multímeros do fator de von Willebrand foi feita por densitometria a laser (densitômetro Ultrosan XL, Bromma, Suécia). As cinco bandas de menor massa molecular, com migração logo acima da IgM (usada como padrão, 950 kDa), foram analisadas e a soma das suas densidades foi relacionada à densidade total de todas as frações multiméricas. Assim, o índice utilizado para a semiquantificação das alterações multiméricas foi a densidade relativa dos multímeros de baixo peso molecular (BPM/Total). Esse controle interno foi usado para corrigir diferenças na quantidade de proteína do fator de von Willebrand aplicada em

cada poço do gel. Todos os experimentos foram realizados em duplicata ou triplicata e o resultado final foi expresso em valor médio.

Desenho do estudo

Este estudo representou uma série de verificações (hipóteses) que poderiam ser analisadas como trabalhos separados. Entretanto, como houve a participação do mesmo paciente em mais de uma verificação e como as diferentes hipóteses pertenciam ao mesmo tema, sendo verificadas na mesma época, optou-se por reunir os resultados sob um único título. Assim, algumas verificações tiveram característica transversal, como a análise de marcadores de disfunção endotelial e de coagulação intravascular, a caracterização em subgrupos de pacientes, o impacto da hemodiluição e a identificação de fatores relacionados à TAPC.

Um outro segmento do estudo teve característica longitudinal. Trata-se da evolução dos marcadores ao longo do tempo, frente a medidas terapêuticas adotadas. Nesta etapa, foi necessária a observação de pacientes durante um período pré-estabelecido. Inicialmente, o período de 24 meses foi assumido como adequado, considerando-se a cronicidade da doença. A análise longitudinal dos marcadores também foi levada a efeito, sob o ponto de vista estritamente estatístico, considerando-se o período de 18 meses de observação. Esta análise foi feita com o objetivo de comparação das observações com 24 meses, uma vez que o número de casos com 18 meses de seguimento foi mais expressivo.

Assim sendo, o desenho do presente estudo foi feito de tal forma que, após a inclusão no mesmo, os pacientes tiveram seguimento ambulatorial a cada três meses, tendo sido realizadas verificações laboratoriais semestralmente. Esse planejamento foi obedecido de maneira independente de eventuais visitas à unidade de emergência.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise de dados comportou a etapa descritiva e a inferencial. Na análise descritiva, as características demográficas e laboratoriais gerais foram expressas como média e desvio padrão ou mediana, limites e percentis, conforme apropriado.

A análise inferencial envolveu tanto variáveis contínuas como categóricas. Com relação às variáveis contínuas, as mesmas foram testadas quanto à sua aderência à distribuição normal, através do teste de Kolmogorov–Smirnov. Havendo aderência satisfatória, as mesmas foram subsequentemente analisadas por testes paramétricos. Não havendo aderência adequada, optou-se pelo uso de testes não paramétricos. Com relação especificamente ao nível plasmático do dímero D, esta variável foi analisada tanto por métodos não paramétricos, como após transformação logarítmica, por métodos paramétricos. As variáveis categóricas foram tratadas por procedimentos não paramétricos.

A análise univariada constituiu na comparação de resultados entre grupos de indivíduos ou no mesmo grupo em situações diferentes. A análise

intergrupos, tratando-se de dois grupos de indivíduos, foi feita com uso de teste de t de Student para observações desemparelhadas ou teste de Mann-Whitney. As comparações envolvendo mais de dois grupos foram feitas com uso de análise de variância (um fator) e testes de múltiplas comparações (Scheffé, Tukey-Kramer ou Games-Howell, conforme apropriado). Para variáveis sem distribuição normal, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis com múltiplas comparações através dos procedimentos de Newman-Kuel ou Dunn. As comparações no mesmo grupo de indivíduos analisados em situações diferentes foram feitas com uso do teste t de Student para observações emparelhadas, ou de Wilcoxon, se apenas duas situações estivessem em questão (antes e após hemodiluição). Havendo mais de duas situações em questão, em particular se a verificação foi feita em diversos grupos (exemplo, subgrupo A e B analisados em quatro ou cinco momentos diferentes), procedeu-se a análise de variância para mais de um fator (subgrupos e tempo) com medidas repetidas em um deles (tempo). O procedimento é conhecido como análise de perfil. Em todos os procedimentos univariados envolvendo variáveis contínuas, os testes foram bicaudais. As comparações entre os grupos de indivíduos envolvendo variáveis categóricas foram efetuadas através do teste exato de Fisher.

A análise multivariada foi utilizada para testar diferenças intergrupos, envolvendo mais de uma variável. Os procedimentos foram aplicados após a identificação das variáveis mais expressivas quanto a sua capacidade de diferenciação inter grupos, através de análise univariada conforme descrito acima. No caso da diferenciação entre subgrupos A e B de pacientes,

procurou-se ajustar um modelo discriminante linear (Fisher) aos dados observados. No caso da diferenciação entre pacientes sem e com TAPC e visando verificar a probabilidade de ocorrência da mesma, procurou-se ajustar um modelo de regressão logística (binária).

Em todos os testes adotou-se 0,05 como nível de significância

ASPECTOS ÉTICOS

Todas as coletas para determinação de marcadores bioquímicos envolveram punção venosa periférica com risco considerado mínimo, tendo sido efetuadas mediante consentimento livre e esclarecido. O protocolo do estudo foi aprovado pela Comissão Científica e de Ética do InCor sob o nº 1790/00/151 e pela Cappesq sob o nº 981/00.

Resultados

ANÁLISE DESCRITIVA

No período de fevereiro de 2000 a março de 2003, foram incluídos, consecutivamente, 30 pacientes no estudo (Tabela 2), sendo 16 do gênero feminino, com idade de 4 a 61 anos ($32,3 \pm 12,7$ anos), pressão média arterial pulmonar de 30 a 98 mmHg (57 ± 15 mmHg), saturação periférica de oxigênio de 67 a 97% ($85 \pm 8\%$) e hematócrito de 39 a 69 % ($57 \pm 8\%$). Apesar do encontro de níveis normais de saturação periférica de oxigênio em repouso em alguns pacientes, todos passaram a apresentar graus variáveis de insaturação, após serem submetidos a esforço físico mínimo. A TAPC foi investigada através da realização do exame de angiotomografia computadorizada de tórax, tendo sido constatada em nove dos 24 pacientes analisados (37,5%).

No momento do ingresso no estudo, os pacientes foram submetidos a uma avaliação clínica e a um interrogatório minucioso sobre o histórico da moléstia, sendo subdivididos em dois subgrupos, segundo a classe funcional (NYHA/WHO). O subgrupo denominado A foi constituído por 20 indivíduos em classe funcional II ou III. Esses pacientes encontravam-se estáveis, sob seguimento ambulatorial. O subgrupo denominado B foi constituído por 10 pacientes com sintomas alternando entre classe funcional III e IV. Esses pacientes tinham histórico de episódios freqüentes de instabilidade clínica, resultando em constantes visitas à unidade de emergência.

Para efeito de análise clínica evolutiva, 27 pacientes foram acompanhados por um período de três a 45 meses (mediana de 30 meses). Os três últimos pacientes incluídos no estudo tiveram apenas o registro dos

dados basais, por não ter havido tempo hábil para seguimento, sendo que um deles faleceu pouco tempo após sua avaliação inicial. Entre os pacientes como um todo, ocorreram quatro óbitos após o ingresso no estudo, todos atribuídos à evolução da doença.

Durante o seguimento clínico, as seguintes manifestações foram observadas, merecendo destaque dentro do quadro geral dos pacientes: sintomas de hiperviscosidade sangüínea, como piora do cansaço, cefaléia, tontura e artralgia (18 casos); insuficiência renal com redução do “clearance” de creatinina (dois casos); hipertensão arterial sistêmica (cinco casos); distúrbios visuais (um caso); sintomas neurológicos como parestesias ou alterações compatíveis com isquemia cerebral transitória (três casos).

Tabela 3 – Dados diagnósticos e evolutivos individuais

Pacientes	Gênero (M/F)	Idade (anos)	Diagnóstico	PMAP (mmHg)	SpO ₂ (%)	Ht (%)	CF (NYHA/ WHO)	TAPC	T. Seg. (m)	Estado Atual	
1	TCHS	F	35	CIA*	43	90	53	II	(+)	44	ac. clín.
2	MNKR	F	45	CIV	36	88	56	II	(-)	41	ac. clín.
3	ALR	F	43	DVSVD	58	75	61	III a IV	(+)	37	ac. clín.
4	ARM	M	49	CIA*	38	84	60	III a IV	(+)	41	ac. clín.
5	JGFP	M	23	DVSVD	98	82	66	II	(-)	36	ac. clín.
6	RKE	M	30	DVSVD	68	89	62	III	(-)	40	ac. clín.
7	VCF	F	36	CIV	58	78	55	III a IV	(+)	38	óbito
8	FRS	M	30	CIV	53	85	65	II	(-)	39	ac. clín.
9	JCS	M	34	CIV	53	87	61	III	(...)	35	ac. clín.
10	SGS	F	20	DSAV (s.Down)	64	81	64	III	(...)	11	óbito
11	EPS	F	11	DVSVD	66	67	69	III a IV	(-)	35	ac. clín.
12	MACOA	F	42	DATVP	46	79	56	III a IV	(-)	34	ac. clín.
13	NR	M	52	CIV	62	88	60	II	(+)	33	ac. clín.
14	PAMB	M	14	DSAV (s.Down)	30	89	62	III	(-)	30	ac. clín.
15	LCS	F	31	DSAV (s. inv.)	77	78	52	III a IV	(+)	28	ac. clín.
16	RM	M	34	CIV	50	88	60	II	(-)	29	ac. clín.
17	MN	F	38	CIV	71	93	51	III	(...)	45	ac. clín.
18	JMM	F	4	VUE	72	78	57	III	(...)	23	ac. clín.
19	RI	M	29	PCA	57	97	63	II	(...)	3	óbito
20	AI	M	22	DSAV (s.Down)	38	81	56	III a IV	(-)	24	ac. clín.
21	DCS	F	11	PCA	50	97	42	II	(-)	25	ac. clín.
22	JLSC	M	26	CIV	53	92	68	II	(-)	25	ac. clín.
23	SAVS	F	37	CIA*	55	91	54	III	(-)	18	ac. clín.
24	MGS	F	23	CIA*	42	96	42	III	(-)	7	ac. clín.
25	SAM	F	38	CIA*	49	89	47	III	(-)	9	ac. clín.
26	FMS	F	38	VUE	52	76	44	III a IV	(...)	16	ac. clín.
27	VRA	M	34	VUE	66	92	50	III	(-)	13	ac. clín.
28	RLS	F	40	CIA/DAPVP	50	72	39	IV	(+)	0	óbito
29	PAC	M	38	CIV	71	82	56	III a IV	(+)	0	ac. clín.
30	RRM	M	61	DVSVD	77	74	57	III	(+)	0	ac. clín.

ac. clín., em acompanhamento clínico; CIA*, comunicação interarrial do tipo *ostium secundum* com diâmetro de 13 a 22 milímetros; CIV, comunicação interventricular; CF, classe funcional; NYHA/WHO, *New York Heart Association/World Health Organization*; DAPVP, drenagem anômala parcial de veias pulmonares; DATVP, drenagem anômala total de veias pulmonares; DSAV, defeito do septo átrio-ventricular; DVSVD, dupla via de saída do ventrículo direito; F, feminino; M, masculino; m, meses; PCA, persistência do canal arterial; PMAP, pressão média de artéria pulmonar; s.Down, síndrome de Down; s. inv, *situs inversus*; TAPC, trombose arterial pulmonar central; T.Seg., tempo de seguimento; VUE, ventrículo único do tipo esquerdo
(+), presente; (-), ausente; (...), não investigada

O seguimento clínico foi marcado por importantes modificações no esquema terapêutico na maioria dos casos, no que diz respeito à anticoagulação, ao uso de oxigênio domiciliar, à indicação de hemodiluição, à reposição de ferro e à monitorização de sintomas neurológicos e da função renal. A Tabela 4 mostra a evolução destas medidas terapêuticas durante o período de acompanhamento e compara o número de pacientes convenientemente tratados no início e no final do estudo.

No decorrer do tempo, houve uma progressiva restrição à indicação do uso de antiagregantes plaquetários, mais especificamente do ácido acetil salicílico e do dipiridamol, sendo que a maioria dos pacientes passou a ser submetida a anticoagulação oral crônica com warfarina.

Em 16 pacientes, com insaturação periférica de oxigênio importante, adotou-se o uso domiciliar de oxigênio, via catéter nasal por, 8 horas diárias no mínimo.

A hemodiluição passou a ser realizada após a análise criteriosa de sintomas clínicos relacionados a hiperviscosidade sangüínea (eritrocitose), simultaneamente à análise dos valores do hematócrito, dos níveis séricos de ferro e dos índices hematimétricos. Houve também uma maior preocupação com as alterações neurológicas, oftalmológicas, da função renal e com o controle da pressão arterial sistêmica.

Tabela 4 – Evolução de condutas terapêuticas comparativamente no início e final estudo

Medidas Terapêuticas	Início do acompanhamento (número de casos)	Final do seguimento (número de casos)
Antiagregantes plaquetários	20	1
Anticoagulante oral	5	24
Oxigênio domiciliar	0	16
Hemodiluição criteriosa	0	18
Monitorização do ferro sérico	0	18
Monitorização de alterações sistêmicas	0	7

ANÁLISE INFERENCIAL

DISFUNÇÃO ENDOTELIAL E COAGULAÇÃO INTRAVASCULAR

Os valores obtidos no momento do ingresso no estudo, com relação aos níveis plasmáticos dos marcadores de disfunção endotelial e de coagulação intravascular nos pacientes com síndrome de Eisenmenger, comparativamente ao grupo controle, estão representados na Tabela 5. No grupo de pacientes, os níveis plasmáticos do vWF:Ag e do t-PA mostraram-se elevados e os da trombomodulina reduzidos, em relação aos controles. Quanto ao dímero D e ao PAI-1, não houve diferenças estatisticamente significantes.

Tabela 5 – Marcadores de disfunção endotelial e coagulação intravascular

Variável	Controles	N	Pacientes	N	Valor de p
vWF:Ag (U/dl)	93 ± 18	34	118 ± 29	26	0,0007
Trombomodulina (ng/ml)	38 (10,8 a 90,0)	45	13,7 (1,4 a 54,3)	23	<0,0001
t-PA (ng/ml)	6,5 ± 2,7	30	13,9 ± 8,5	23	0,0007
PAI-1 (ng/ml)	18,4 (6,7 a 38,4)	36	16,3 (3,4 a 27,7)	11	0,3929
Dímero D (ng/ml)	144 (54 a 318)	41	142 (22 a 678)	24	0,3588
Log [dímero D]	4,89 ± 0,46	41	5,13 ± 0,82	24	0,1928

vWF:Ag, concentração antigênica do fator de von Willebrand; t-PA, ativador do tipo tecidual de plasminogênio, PAI-1, inibidor do ativador do plasminogênio do tipo 1
Os valores de vWf:Ag, de t-PA e o logaritmo do dímero D estão representados em média e desvio padrão e os valores da trombomodulina, do PAI-1 e do dímero D, em mediana e limites

DISCRIMINAÇÃO ENTRE OS SUBGRUPOS DE PACIENTES COM APRESENTAÇÃO CLÍNICA DISTINTA

Nesta etapa do estudo, a preocupação foi verificar se subgrupos de pacientes preliminarmente distintos de acordo com o grau de limitação funcional se diferenciariam entre si em relação a outras variáveis medidas no início do estudo. A discriminação foi testada através da análise de variáveis clínicas e laboratoriais.

A análise univariada evidenciou que o subgrupo de pacientes mais limitado (B) diferenciou-se do subgrupo mais estável (A), por apresentar níveis de saturação periférica de oxigênio menores e níveis plasmáticos de vWF:Ag e dímero D mais elevados (Tabela 6). Ressalte-se que, no subgrupo B, os valores do dímero D foram superiores aos controles, tanto quando analisados em valor real, como após transformação logarítmica. Essa diferença não foi observada em relação ao subgrupo A. Não houve

diferenças entre os subgrupos quanto ao gênero, aos valores da pressão média de artéria pulmonar, ao hematócrito e aos níveis plasmáticos da trombomodulina e do t-PA.

Tabela 6 – Discriminação entre subgrupos de pacientes com diferentes graus de limitação funcional

Variável	Subgrupo A	Subgrupo B	Valor de p
Gênero M/F	11/9	3/7	0,4375
Idade (anos)	30,9 ± 13,4	35 ± 11,1	0,4121
PMAP (mmHg)	57 ± 16	55 ± 13	0,7236
SpO ₂ (%)	88 ± 6	77 ± 5	<0,0001
Ht (%)	57 ± 8	55 ± 8	0,4773
vWF:Ag (U/dl)	110 ± 25	135 ± 33	0,0455
Trombomodulina (ng/ml)	13,7 (1,4 a 34,1)	15,4 (8,2 a 54,3)	0,4976
t-PA (ng/ml)	13,3 ± 6,6	15,1 ± 11,7	0,6457
Dímero D (ng/ml)	120 (22 a 678)	441 (92 a 668)	0,0204
Log [dímero D]	4,85 ± 0,69	5,82 ± 0,73	0,0053

Ht, hematócrito; F, feminino; M, masculino; PMAP, pressão média de artéria pulmonar; SpO₂, saturação periférica de oxigênio; t-PA, ativador do tipo tecidual do plasminogênio; vWF:Ag, concentração antigênica do fator de von Willebrand

Os valores representados correspondem a medidas efetivadas no início do período do estudo
Os valores do dímero D e da trombomodulina estão representados em mediana e limites

A diferenciação entre os subgrupos clínicos foi igualmente testada por análise multivariada (discriminante). Assim, as variáveis que contribuíram independentemente de maneira significativa para a diferenciação entre os subgrupos foram a idade, a saturação periférica de oxigênio e o nível plasmático do dímero D (p=0,002). Embora a idade não tenha aparecido como variável importante na análise univariada, sua exclusão do modelo multivariado fez com que a porcentagem de casos corretamente classificados diminuísse de 95% para 86%. A contribuição relativa de cada

variável no modelo explicativo encontra-se representada através dos respectivos coeficientes normalizados na Tabela 7.

A saturação de oxigênio e o nível plasmático do dímero D foram as variáveis que discriminaram os subgrupos de pacientes, tanto na análise univariada como na multivariada.

Tabela 7 – Contribuição de diferentes variáveis para a discriminação entre subgrupos de pacientes (análise multivariada)

Variável	Contribuição Relativa (coeficientes normalizados)
Idade	-1.266068
SpO2	3.918421
Dímero D	-1.780787

EVOLUÇÃO DAS VARIÁVEIS BIOQUÍMICAS: COMPORTAMENTO DOS SUBGRUPOS DE PACIENTES

Com o objetivo de estudar o comportamento diferencial dos marcadores de disfunção endotelial e de coagulação intravascular ao longo do tempo, analisou-se a evolução dos níveis plasmáticos do vWF:Ag, da trombomodulina, do t-PA e do dímero D. Semelhantemente à análise feita no início do acompanhamento, aqui também as variáveis foram estudadas nos pacientes como um todo e comparativamente nos subgrupos de pacientes com diferentes graus de limitação funcional. Os dados foram computados dos pacientes que completaram 24 meses de seguimento, sendo as medidas feitas semestralmente. Em acréscimo, são apresentados os

resultados evolutivos correspondentes a um grupo numericamente mais expressivo, porém com tempo de seguimento inferior (18 meses). A análise evolutiva do PAI-1 (em 24 meses) foi realizada em um grupo menor de pacientes, não tendo sido possível realizar o estudo comparativo entre os subgrupos.

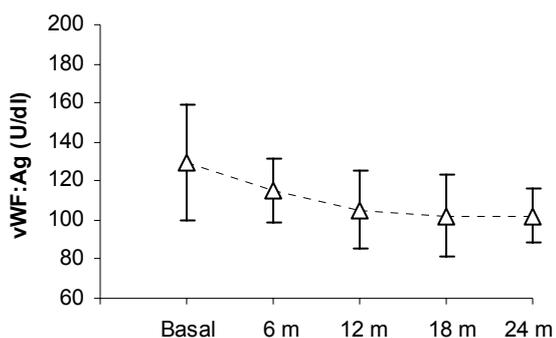
Análise evolutiva do vWF:Ag

O comportamento do vWF:Ag plasmático ao longo do seguimento encontra-se representado nos Gráficos 1 a 4. No seguimento de 24 meses, houve decréscimo importante deste marcador ($p < 0,0001$), com diferenças expressivas do 12º ao 24º mês em relação ao basal ($p < 0,01$). Com relação aos subgrupos A e B, seguidos durante 24 meses, observaram-se diferenças significantes, tanto entre os mesmos ($p = 0,0063$), como em cada um deles ao longo do tempo ($p < 0,0001$). As diferenças mais expressivas foram observadas entre os subgrupos na condição basal ($p < 0,01$), no subgrupo A aos 18 e 24 meses em relação ao basal ($p < 0,05$) e no subgrupo B em todas as medidas em relação ao basal ($p < 0,05$). O comportamento do vWF:Ag no seguimento de 18 meses foi semelhante.

Gráficos 1 a 4 – Comportamento diferencial do antígeno do fator de von Willebrand (vWF:Ag) ao longo de 24 meses (n=12) e 18 meses (n=17) de seguimento

24 meses

Gráfico 1



18 meses

Gráfico 2

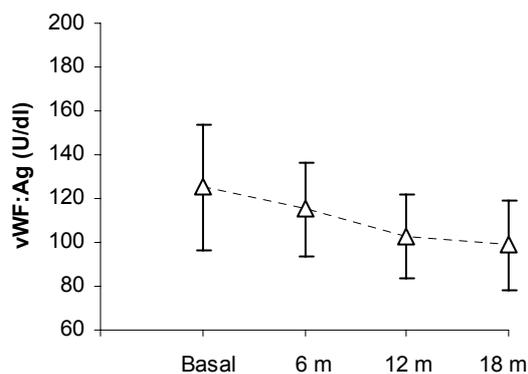


Gráfico 3

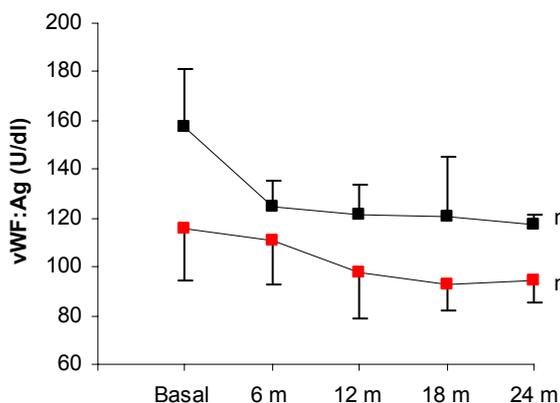
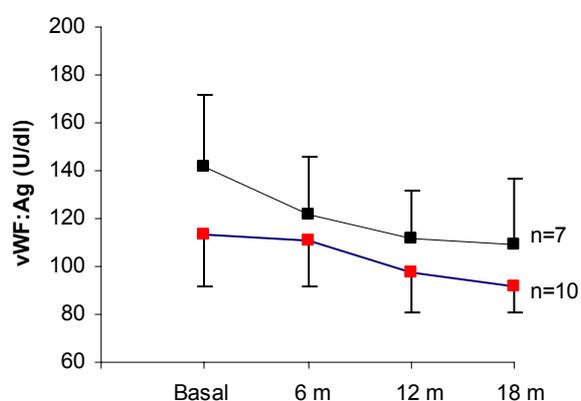


Gráfico 4



Nos Gráficos 1 e 2, encontra-se representado o grupo de pacientes como um todo. Nos Gráficos 3 e 4, estão representados diferencialmente os subgrupos A e B com perfil clínico distinto (quadrados em vermelho e em preto respectivamente). Os resultados são ilustrados em 24 e 18 meses (m) de evolução e encontram-se expressos em média e desvio padrão.

Análise evolutiva da trombomodulina

O comportamento dos níveis plasmáticos da trombomodulina ao longo do seguimento encontra-se representado nos Gráficos 5 a 8. Não houve variação significativa de seus valores no grupo como um todo, tanto no acompanhamento de 24 meses ($p=0,487$) como em 18 meses ($p=0,198$). Em relação aos subgrupos, não foram observadas diferenças significantes em nenhum deles ao longo do tempo e em nenhum momento entre os mesmos.

Gráficos 5 a 8 – Comportamento evolutivo da trombomodulina ao longo de 24 meses (n=10) e 18 meses (n=13) de seguimento

24 meses

Gráfico 5

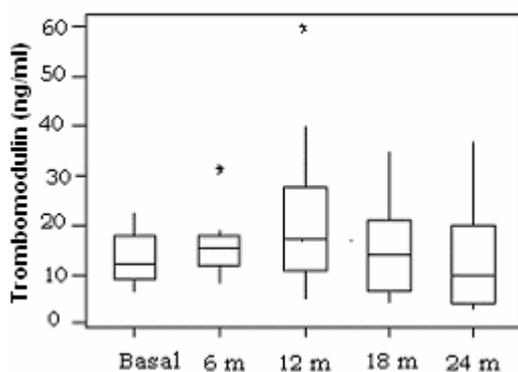
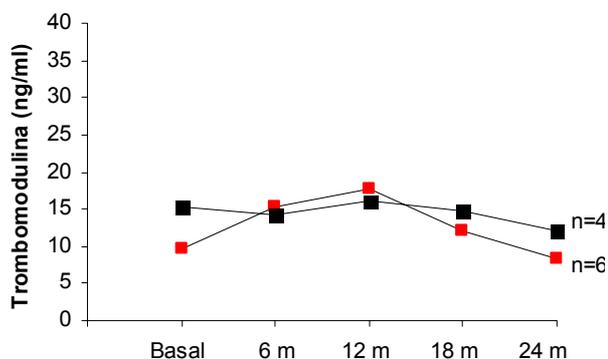


Gráfico 7



18 meses

Gráfico 6

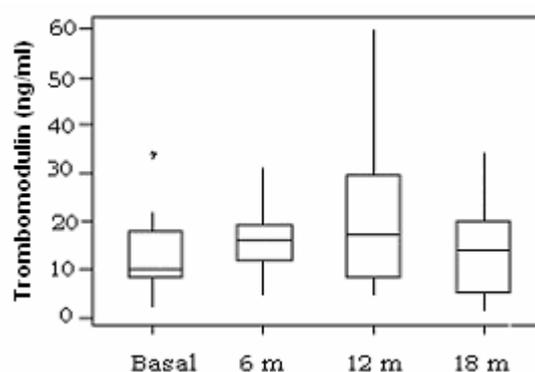
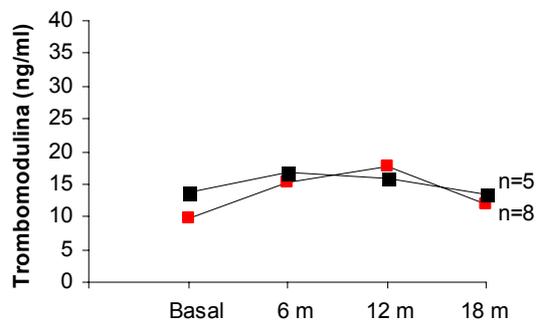


Gráfico 8



Nos Gráficos 5 e 6, encontra-se representado o grupo de pacientes como um todo. Nos Gráficos 7 e 8, estão representados diferencialmente os subgrupos A e B com perfil clínico distinto (quadrados em vermelho e em preto respectivamente). Os resultados referentes ao grupo como um todo estão representados em "Box-plots". A evolução da trombomodulina nos subgrupos está representada em valor mediano. Os resultados são ilustrados em 24 e 18 meses (m) de evolução.

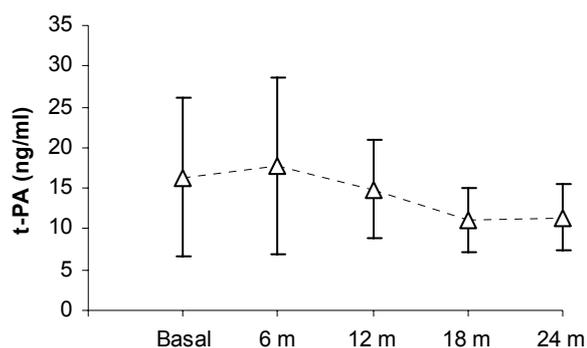
Análise evolutiva do t-PA

O comportamento evolutivo dos níveis plasmáticos do t-PA durante o período de estudo está representado nos Gráficos 9 a12. Na evolução do grupo como um todo, registrou-se diminuição significativa em 24 meses ($p=0,028$) e em 18 meses ($p=0,041$) de seguimento. Na análise dos subgrupos, observou-se queda discreta, porém significativa, ao longo de 24 meses ($p=0,030$) e 18 meses ($p=0,0485$). Entretanto, não houve diferença entre os subgrupos ($p=0,189$ e $p=0,412$, respectivamente 24 e 18 meses). Ressalte-se que, tanto na análise de todos os pacientes como nos subgrupos, a variabilidade dos valores do t-PA tendeu a ser menor no final do seguimento.

Gráficos 9 a 12 – Comportamento evolutivo do ativador tecidual do plasminogênio (t-PA) ao longo de 24 meses (n=12) e 18 meses (n=15) de seguimento

24 meses

Gráfico 9



18 meses

Gráfico 10

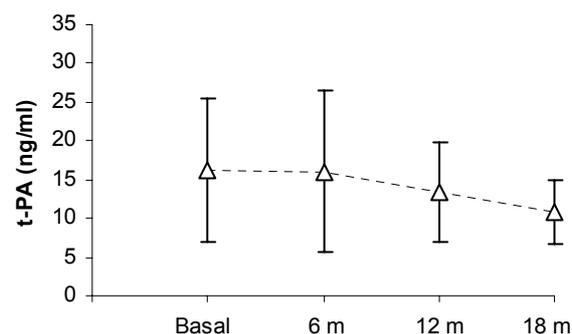


Gráfico 11

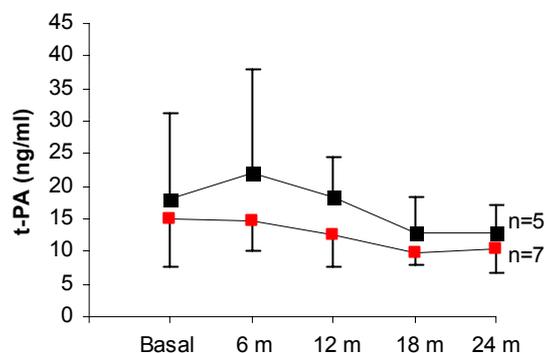
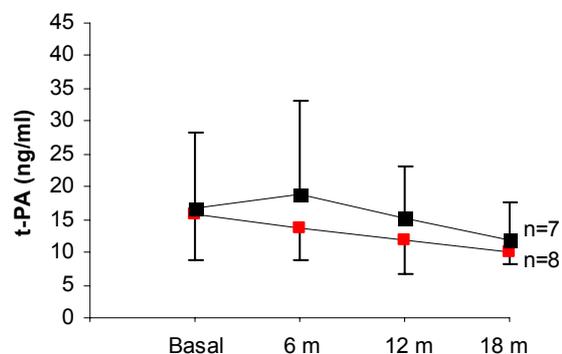


Gráfico 12



Nos Gráficos 9 e 10, encontra-se representado o grupo de pacientes como um todo. Nos Gráficos 11 e 12, estão representados diferencialmente os subgrupos A e B (quadrados em vermelho e em preto respectivamente). Os resultados estão ilustrados em 24 e 18 meses (m) de evolução e encontram-se expressos em média e desvio padrão.

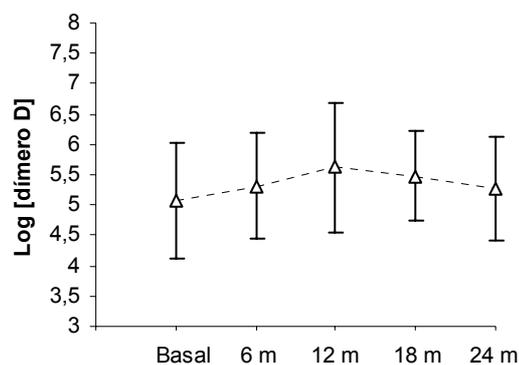
Análise evolutiva do dímero D

O comportamento evolutivo dos níveis plasmáticos do dímero D encontra-se ilustrado nos Gráficos 13 a 16. Os resultados são apresentados após transformação logarítmica. Não houve diferença significativa na evolução dos seus valores no grupo como um todo em 24 e 18 meses ($p=0,311$ e $p= 0,145$, respectivamente). Na análise intergrupos, evidenciou-se diferença significativa apenas na medida basal ($p<0,02$), sendo que, ao longo do seguimento, essa diferença tendeu a desaparecer. É importante ressaltar que, durante o período do estudo, foram observadas concentrações plasmáticas de dímero D acima de 400ng/ml, mesmo em pacientes adequadamente anticoagulados com warfarina.

Gráficos 13 a 16 – Comportamento evolutivo do dímero D ao longo de 24 meses (n=11) e 18 meses (n=15) de seguimento

24 meses

Gráfico 13



18 meses

Gráfico 14

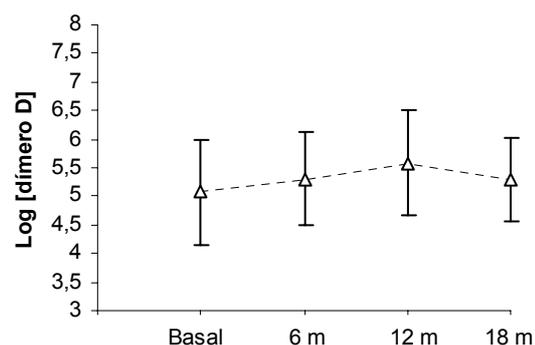


Gráfico 15

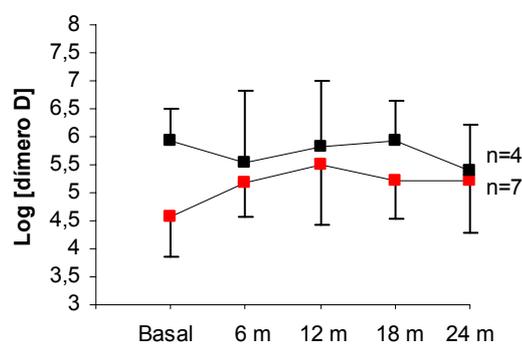
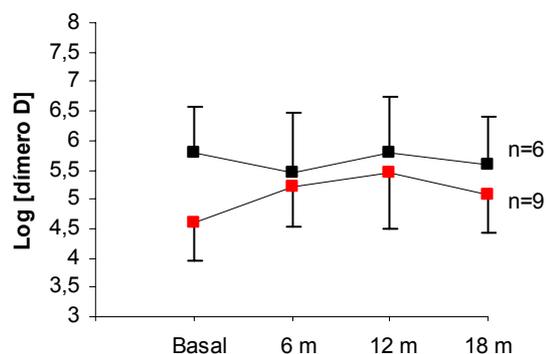


Gráfico 16

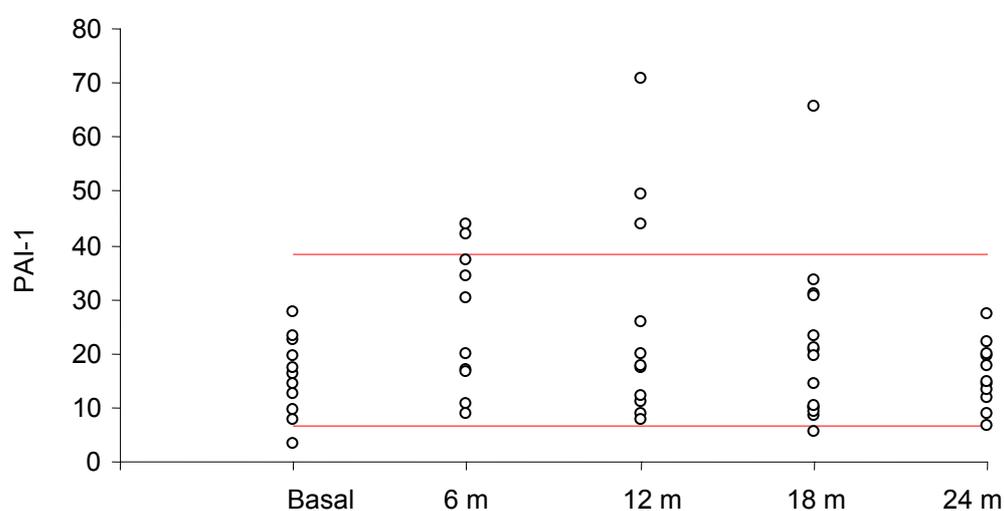


Nos Gráficos 13 e 14, encontra-se representado o grupo de pacientes como um todo. Nos Gráficos 15 e 16, estão representados os subgrupos A e B (quadrados em vermelho e em preto respectivamente). Os resultados estão ilustrados em 24 e 18 meses (m) de evolução e encontram-se expressos em média e desvio padrão, após transformação logarítmica.

Análise evolutiva do PAI-1

Foi possível a análise evolutiva dos níveis plasmáticos do PAI-1 em 11 pacientes. Embora não tenham sido detectadas diferenças significantes no período de avaliação de 24 meses, observam-se, pelo Gráfico 17, valores que ultrapassaram o limite superior do intervalo de tolerância para indivíduos normais.

Gráfico 17 – Comportamento evolutivo do PAI-1 ao longo de 24 meses (n=11)



As linhas horizontais representam o intervalo que contém 90% das observações em indivíduos normais, com uma probabilidade superior a 0,95. O limite superior deste intervalo corresponde a 38 ng/ml.

A Tabela 8 ilustra valores de t-PA, PAI-1 e dímero D, assim como valores da relação PAI-1/t-PA, nos três casos acima do limite de tolerância, representados aos 12 meses no Gráfico 17.

Tabela 8 – Valores de PAI-1, dímero D, t-PA e da relação PAI-1/t-PA, aos 12 meses de evolução, dos pacientes 7, 8 e 12 (Tabela 3)

	PAI-1 (ng/ml)	t-PA (ng/ml)	PAI-1/t-PA	dímero D (ng/ml)
Paciente 7*	70,6	23,8	2,97	210
Paciente 8*	44	17,7	2,48	56
Paciente 12*	49,5	22,2	2,22	92
Controles	18,4 (6,7 a 38,4)**	6,5 ± 2,7	2,99	144 (54 a 318)

*Pacientes de número 7, 8 e 12 da Tabela 3

** O limite superior do intervalo de tolerância para 90% das observações normais é de 38 ng/ml

t-PA, ativador tecidual de plasminogênio, PAI-1, inibidor do ativador do plasminogênio do tipo 1

Os valores de t-PA estão representados em médias e desvio padrão e os valores do PAI-1 e do dímero D em mediana e limites

ANÁLISE DE FATORES ASSOCIADOS À TROMBOSE ARTERIAL PULMONAR CENTRAL

A angiotomografia de tórax para pesquisa de TAPC foi realizada em 24 pacientes, tendo sido positiva em nove deles. Entretanto, a investigação de fatores potencialmente relacionados à presença de TAPC foi possível de ser efetuada em 23 indivíduos, oito dos quais apresentavam esta complicação (Figura 1).

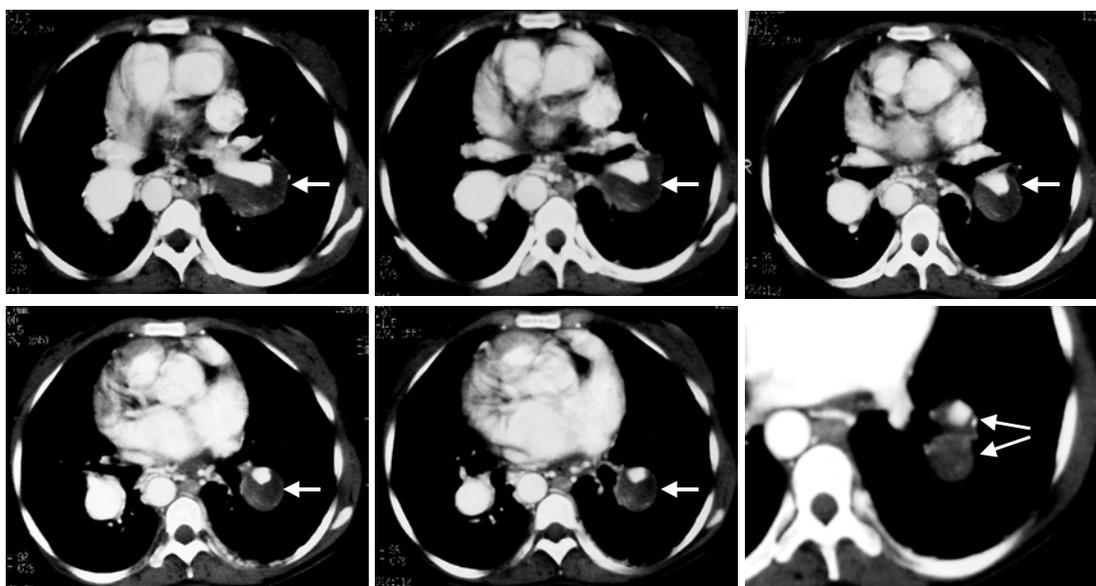


Figura 1. Exemplo representativo de imagem angiotomográfica positiva para trombose arterial pulmonar central (setas), em paciente de 31 anos portadora de síndrome de Eisenmenger (caso de nº 15 da Tabela 3)

Foram estudadas variáveis clínicas e bioquímicas que pudessem vir a auxiliar na discriminação dos pacientes com maior probabilidade de apresentar o fenômeno trombótico. As variáveis analisadas foram o gênero, a idade, o nível de gravidade clínica (subgrupos A e B), a saturação periférica de oxigênio, o hematócrito, a contagem de plaquetas e o nível plasmático do dímero D. As variáveis cujos resultados próximos à realização

da angiotomografia não estavam disponíveis não foram incluídas. Também não foram incluídos os resultados obtidos em situações de instabilidade clínica aguda.

Na análise univariada (Tabela 9), o grupo com presença de TAPC caracterizou-se por apresentar idade mais avançada ($p=0,004$), níveis inferiores de saturação periférica de oxigênio ($p=0,0127$) e níveis mais elevados de dímero D ($p=0,024$), quando comparado ao grupo sem TAPC.

Tabela 9 – Discriminação entre pacientes com e sem trombose arterial pulmonar central

Variável	Angiotomografia positiva	Angiotomografia negativa	Valor de p
Gênero (M/F)	4/4	8/7	1,000
Idade (anos)	44 ± 10,0	29,2 ± 10,7	0,004
Subgrupo A/B	3/5	12/3	0,071
SpO2 (%)	81 ± 8	89 ± 6	0,0127
Ht (%)	56 ± 5	56 ± 8	0,9267
Plaquetas ($\times 10^9/l$)	153 ± 72	142 ± 71	0,7278
Dímero D (ng/ml)	436 (124 a 1169)	141(53 a 1194)	0,024

Ht, hematócrito; F, feminino; M, masculino; SpO2, saturação periférica de oxigênio

Os valores representados correspondem a medidas efetivadas próximo à realização da angiotomografia de tórax
Os valores do dímero D estão representados em mediana e limites

Abaixo, na Tabela 10, encontram-se relacionados os valores preditivos de diferentes níveis plasmáticos do dímero D, em relação à trombose arterial pulmonar central.

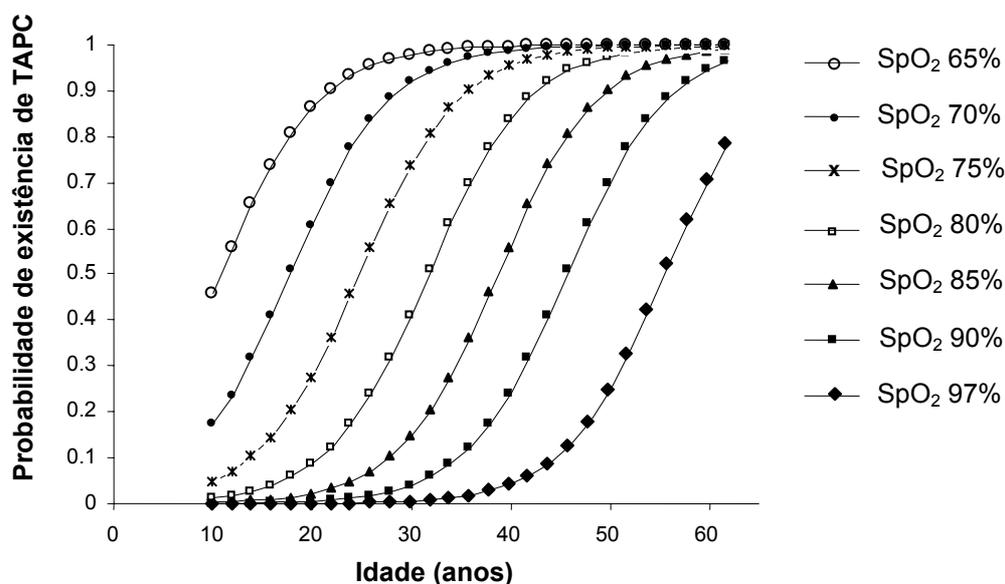
Tabela 10 – Valores preditivos do dímero D em relação à trombose arterial pulmonar

Dímero D (ng/ml)	Valor preditivo positivo	Valor preditivo negativo
>500	64%	67%
>400	67%	74%
>300	60%	77%

Quando se realizou a análise multivariada (regressão logística) incluindo a idade, a saturação periférica de oxigênio e o nível plasmático do dímero D, o último não apresentou efeito explicativo, mesmo após a transformação logarítmica. Desta forma, o modelo constituído por duas variáveis explicativas (idade e saturação), apresentou melhor ajustamento aos dados observados ($p=0,0004$), sendo expresso como segue:

$P[TAPC]=\frac{\text{EXP}(a+b*Idade+c*SpO_2)}{1+\text{EXP}(a+b*Idade+c*SpO_2)}$, onde P[TAPC] representa a probabilidade de existência de trombose arterial pulmonar central; SpO₂, saturação periférica de oxigênio; a=16,08; b=0,20 e c= -0,28. Com base neste modelo, construíram-se curvas de probabilidade de TAPC em função da idade, para diferentes níveis de saturação periférica de oxigênio (Gráfico18).

Gráfico 18 – Curvas de probabilidade de existência de trombose arterial pulmonar central em função da idade e da saturação periférica oxigênio (SpO₂)



INVESTIGAÇÃO DE SÍNDROME ANTIFOSFOLÍPIDE

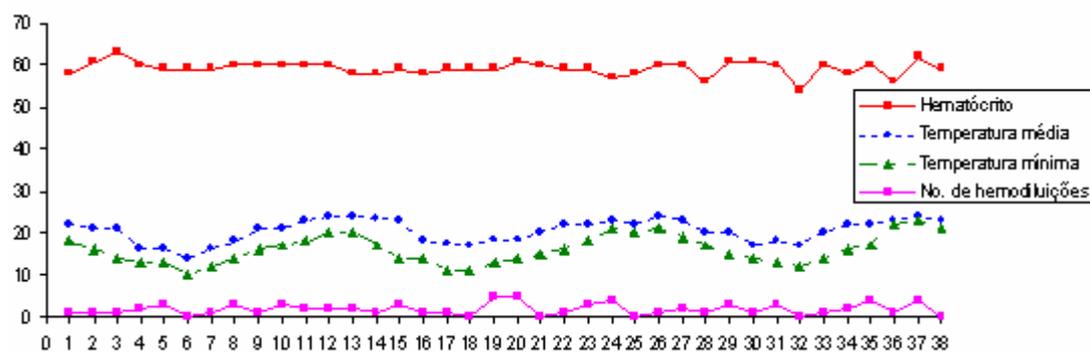
Obtivemos o resultado da pesquisa de anticorpos antifosfolípide pelo método ELISA num total de 14 pacientes. A identificação desses indivíduos (Tabela 3) é a seguinte: 2, 4, 5, 6, 8, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 22, 25, 29. Todos os resultados foram negativos, tanto para IgG como IgM, sendo que quatro destes pacientes tinham imagem angiotomográfica positiva para TAPC.

O PAPEL DA HEMODILUIÇÃO

No período de fevereiro de 2000 a março de 2003, 18 pacientes foram submetidos a hemodiluições terapêuticas, totalizando 58 procedimentos. O número por paciente variou de um a sete. As hemodiluições foram realizadas apenas quando havia sintomatologia relacionada à síndrome de hiperviscosidade sangüínea secundária a eritrocitose. Não ocorreu nenhuma complicação no transcurso do procedimento de hemodiluição, tendo sido considerado de risco mínimo. Após o término da intervenção, os pacientes referiram melhora dos sintomas, sendo que os efeitos relatados com maior frequência foram a melhora do cansaço, da cefaléia e da sensação de “peso” ou “opressão” na parte superior do tórax.

Em que pese a impressão subjetiva de que os pacientes com síndrome de Eisenmenger requerem maior número de hemodiluições para melhora dos sintomas em períodos mais frios do ano, observa-se, pelo Gráfico 19, que não houve oscilação sazonal no nível do hematócrito e no número de hemodiluições realizadas durante o período do estudo.

Gráfico 19 – Evolução da temperatura atmosférica na cidade de São Paulo, do hematócrito e do número de hemodiluições no período de fevereiro de 2000 a março de 2003



Ausência de correlação entre as temperaturas média e mínima mensais (°C) e o hematócrito médio (%), assim como com o número de hemodiluições, no período de fevereiro de 2000 a março de 2003 (1 a 38 no eixo horizontal). As informações sobre a temperatura atmosférica na cidade de São Paulo foram obtidas por meio da Internet.

Com o objetivo de se determinar o possível impacto da hemodiluição sobre as variáveis laboratoriais em curto prazo, os valores das mesmas foram obtidos antes e quatro dias após o procedimento. Em todas as variáveis analisadas, os valores para cada paciente, prévios e posteriores à hemodiluição, referem-se às médias observadas em todos os procedimentos realizados naquele indivíduo. Os resultados finais encontram-se dispostos na Tabela 11.

Observa-se, pela análise da tabela, que a hemodiluição resultou em redução significativa do hematócrito, associada a aumento do número de plaquetas circulantes. Entre as variáveis bioquímicas analisadas, observou-se modificação (aumento) significativa apenas no nível plasmático da trombomodulina. Embora não se tenham observado alterações quantitativas significativas no vWF:Ag plasmático, a hemodiluição resultou em melhora

das suas anormalidades qualitativas (estruturais) conforme será detalhado a seguir.

Tabela 11 – Efeito da hemodiluição terapêutica sobre as variáveis laboratoriais

Variável	Valor pré hemodiluição	Valor pós hemodiluição	Valor de p
Hematócrito (%)	61±3	56 ± 4	<0,0001
Plaquetas (x 10 ⁹ /l)	109 ±57	132 ±48	<0,0004
SpO2 (%)	83 ± 6	83 ± 8	0,6542
vWF:Ag (U/dl)	122 ± 22	115 ± 22	0,1123
Trombomodulina (ng/ml)	17,4 (4,3 a 35,2)	20,3 (7,3 a 39,5)	0,0465
t-PA (ng/ml)	15,3 ± 6,2	15,3 ± 6,2	0,9154
Dímero D (ng/ml)	201 (88 a 531)	191 (90 a 613)	0,2659
Log [dímero D]	5,40 ± 0,59	5,29 ± 0,56	0,383

Ht, hematócrito; SpO2, saturação periférica de oxigênio; t-PA, ativador tecidual de plasminogênio; vWF:Ag, concentração antigênica do fator de von Willebrand
Os valores do dímero D e da trombomodulina estão representados em mediana e limites

HIPÓXIA, PLAQUETAS, MULTÍMEROS DO FATOR DE VON WILLEBRAND E EFEITOS DA HEMODILUIÇÃO

Nesta etapa do estudo, procurou-se analisar alterações já conhecidas na estrutura multimérica do fator de von Willebrand em portadores de hipertensão pulmonar, sobretudo visando a identificar fatores que pudessem explicar tais anormalidades e verificar o possível impacto da hemodiluição terapêutica. Para tanto, foram analisados 10 pacientes, dentre aqueles que foram submetidos ao procedimento. Esses indivíduos foram selecionados com base na qualidade técnica dos “Western blots”. Um alto grau de definição entre as diversas frações multiméricas, após a identificação por quimioluminescência, foi considerado necessário para análise densitométrica

adequada de 14 picos. Os pacientes analisados, conforme identificação numérica na Tabela 3, foram os seguintes: 3, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 16, 20 e 22.

A Tabela 12 mostra os resultados das alterações multiméricas do fator de von Willebrand ao lado de fatores possivelmente relacionados, comparativamente entre pacientes e controles, assim como na condição pós hemodiluição em relação ao basal.

Tabela 12 – Variáveis com possível impacto sobre a composição multimérica do fator de von Willebrand, analisadas comparativamente antes e após a hemodiluição terapêutica

Dados	Hematócrito (%)	Plaquetas ($\times 10^9/l$)	SpO2 (%)	β -TG (U/ml)	vWF:Ag (U/dl)	Multímeros (BPM/total)
Controles	47 \pm 2	242 \pm 61	>95	135 \pm 14	93 \pm 18	0,32 \pm 0,08*
Pacientes (basal)	63 \pm 3	109 \pm 67	83 \pm 8	198 \pm 69	124 \pm 30	0,49 \pm 0,10
Pacientes (HD)	58 \pm 3	133 \pm 58	82 \pm 8	184 \pm 46	117 \pm 21	0,46 \pm 0,09
Valor de p (basal vs. controle)	<0,0001	<0,001	–	0,0444	0,0015	<0,0001
Valor de p (HD vs. basal)	<0,0001	0,0013	0,4615	0,4033	0,1753	0,0079

HD, após hemodiluição; β -TG, beta-tromboglobulina plasmática; BPM/total, densidade relativa dos multímeros de baixo peso molecular do fator de von Willebrand; SpO2, saturação periférica de oxigênio
* O intervalo de confiança (95%) para a média de observações normais foi de 0,27 a 0,36

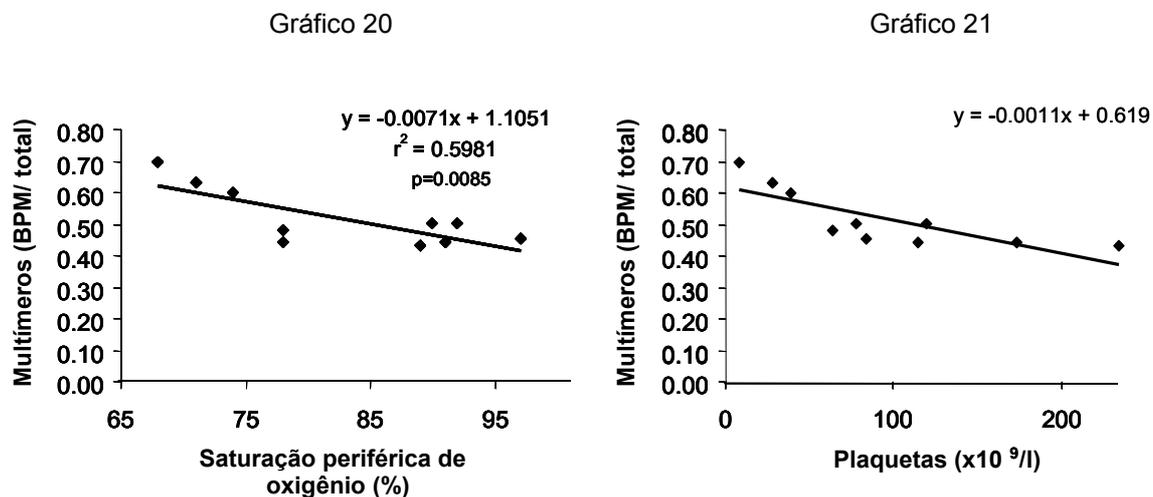
A condição basal foi caracterizada pela presença de alterações significantes na composição multimérica do fator de von Willebrand, com perda de formas de alto peso molecular e aumento na concentração de frações de baixo peso (BPM) em relação aos controles, resultando em aumento do índice BPM/total ($p < 0,0001$) (Tabela 12). Essas alterações estiveram associadas à diminuição da saturação periférica de oxigênio, ao aumento do hematócrito, à redução no número de plaquetas circulantes e ao aumento do nível plasmático de β -TG (Tabela 12). Entretanto, o índice

BPM/total foi influenciado significativamente apenas pela saturação periférica de oxigênio e pelo número de plaquetas (Gráficos 20 e 21). O modelo linear múltiplo que comprovou a associação entre a variável BPM/total e a saturação de oxigênio, assim como o número de plaquetas circulantes, sendo as duas últimas independentemente relacionadas, foi o seguinte:

BPM/total = 0,965 – 0,0046 [SpO₂] – 0,00072 [número de plaquetas],
 $r^2=0,81$, $p=0,0031$; BPM/total, concentração relativa de multímeros de baixo peso molecular do fator de von Willebrand; SpO₂, saturação periférica de oxigênio.

Assim, as alterações multiméricas mais acentuadas, ou seja os elevados índices BPM/total, foram observados nos indivíduos com maior grau de hipoxemia e menor número de plaquetas circulantes.

Gráficos 20 e 21 – Influência da saturação de oxigênio e do número de plaquetas circulantes sobre a composição multimérica do fator de von Willebrand



BPM/total, densidade relativa dos multímeros de baixo peso molecular do fator de von Willebrand

A hemodiluição foi seguida de melhora discreta, porém significativa da estrutura multimérica do fator de von Willebrand (Tabela 12 e Figura 2). Em especial, observou-se aumento das formas de alto peso molecular, não havendo, entretanto, recuperação completa do padrão normal. A melhora das alterações multiméricas ocorreu em associação ao aumento do número de plaquetas circulantes, sem que tenha havido modificação significativa na saturação periférica de oxigênio. Assim, as alterações residuais na composição multimérica do fator de von Willebrand após hemodiluição, associaram-se à persistência de hipoxemia, a um número ainda reduzido de plaquetas em relação ao normal e à concentração plasmática ainda elevada de β -TG (Tabela 12 e Figura 2).

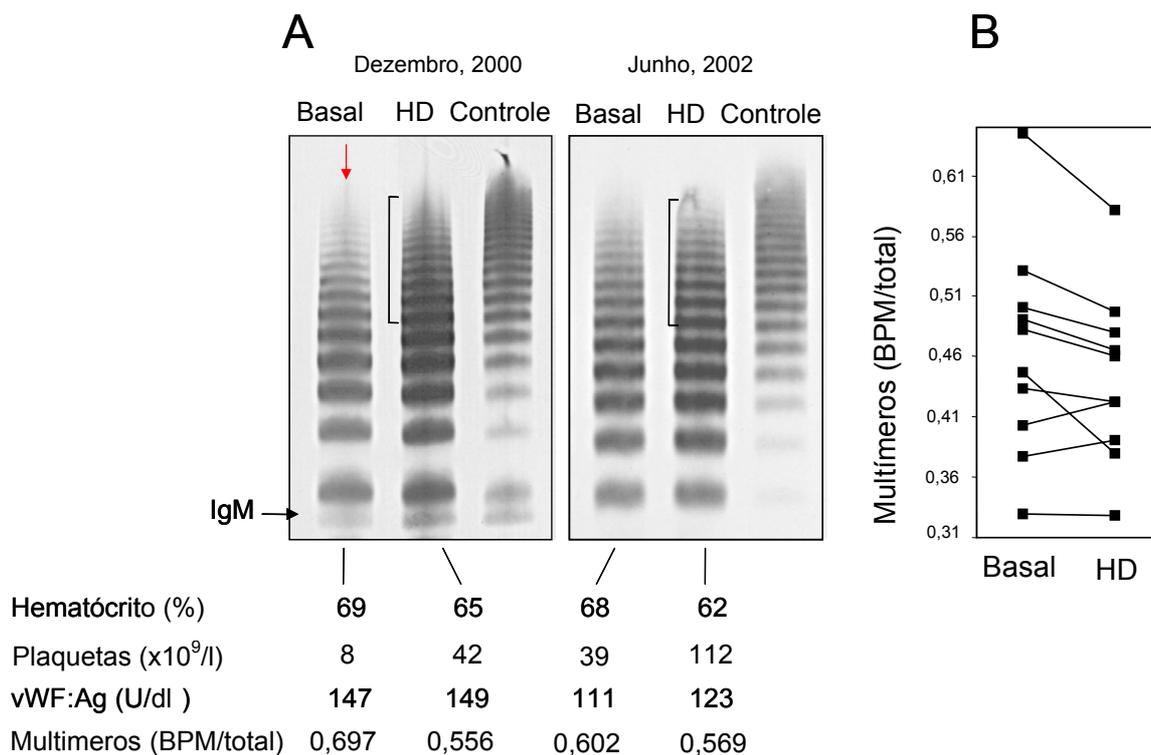


Figura 2. A: “Western immunoblot” representativo das alterações multiméricas do fator de von Willebrand analisadas em paciente com síndrome de Eisenmenger, submetida à hemodiluição terapêutica em duas ocasiões diferentes (caso de nº 11, Tabela 3). A IgM (950 kDa) foi utilizada como padrão de peso molecular. Na situação basal, em relação ao controle, observa-se redução na densidade das formas de alto peso molecular, correspondentes à região superior da membrana (seta vermelha). As frações de baixo peso molecular (cinco bandas acima da IgM) apresentam-se com densidade aumentada. Após a hemodiluição (HD), observa-se recuperação parcial dos multímeros intermediários e de alto peso (colchetes, representando a sexta banda acima da IgM e bandas superiores). A melhora é observada em associação ao aumento do número de plaquetas circulantes, sem alteração significativa na concentração plasmática da proteína (vWF:Ag).

B: Os valores individuais da concentração relativa de multímeros menores (BPM/total) estão representados antes e após a hemodiluição ($p=0,0079$).

Discussão

As observações mais importantes do presente estudo podem ser resumidas como segue. A disfunção endotelial foi caracterizada pelo encontro de níveis plasmáticos elevados de vWF:Ag, t-PA e diminuídos de trombosmodulina. A discriminação entre os subgrupos de pacientes com apresentação clínica diversa (A e B) fez-se por meio do encontro no subgrupo B (mais grave), de níveis menores de saturação periférica de oxigênio e níveis mais elevados de vWF:Ag e dímero D. Constatou-se que o comportamento evolutivo dos marcadores de disfunção endotelial e coagulação intravascular foi semelhante quando analisado durante os períodos de 18 e 24 meses. No grupo de pacientes como um todo e nos subgrupos, verificou-se diminuição ao longo do tempo apenas dos níveis plasmáticos do vWF:Ag e do t-PA. Por outro lado, entre os subgrupos, evidenciou-se diferença significativa apenas na análise do vWF:Ag, sendo que o subgrupo B apresentou concentrações maiores ao longo do seguimento. Os fatores que tiveram associação com a presença de TAPC foram a idade mais avançada, graus mais severos de hipoxemia e níveis mais elevados de dímero D.

A presença de hipoxemia crônica, nos pacientes com síndrome de Eisenmenger, constitui um importante fator de injúria endotelial e resulta em uma série de alterações fisiopatológicas encontradas nessa doença. A hipóxia leva a modificações do fenótipo das células endoteliais, ocasionando a perda da propriedade de barreira (formação de falhas de continuidade entre as células), perda das propriedades anticoagulantes, deficiência de mecanismos fibrinolíticos e aumento da adesão de leucócitos ⁷².

Dentre as ações da hipóxia sobre as células endoteliais, destaca-se a propriedade de estímulo à degranulação dos corpúsculos de Weibel Palade^{73,74,75}, com conseqüente aumento dos níveis plasmáticos do vWF:Ag, do t-PA e da selectina P⁶⁶. Além disso, a hipóxia estimula fatores de transcrição, como o HIF-1 (*hypoxia-inducible factor 1*), que por sua vez estimula fatores angiogênicos como o VEGF (*vascular endothelial growth factor*)^{72,76}. Este último, em associação ao FGF 2, é capaz de induzir a formação do RNA mensageiro do t-PA⁷⁵. No presente estudo evidenciou-se que a concentração plasmática do vWF:Ag foi maior no subgrupo B, mais hipoxêmico, comparativamente ao A, menos hipoxêmico. Por outro lado, não houve diferenças entre os subgrupos com relação ao t-PA. Outro achado importante foi que a redução ao longo do tempo na concentração plasmática desses marcadores ocorreu sem ter havido modificações significantes da saturação periférica de oxigênio. Esses resultados sugerem que a hipoxemia teve influência, pelo menos em parte, no comportamento dos dois marcadores, porém outros fatores parecem ter tido participação. Entre eles, o aumento das forças de cisalhamento (*shear stress*), fator presente nesses indivíduos devido à eritrocitose e hiperviscosidade, também constitui um importante estímulo à exocitose dos corpúsculos de Weibel-Palade⁷⁷.

Vários autores descreveram alterações multiméricas do fator de von Willebrand em pacientes com hipertensão pulmonar⁷⁸⁻⁸⁰. Um achado interessante deste estudo foi a relação entre hipoxemia, redução do número de plaquetas circulantes e alterações multiméricas do fator de von Willebrand. Observou-se relação direta entre o grau de hipoxemia e as

alterações multiméricas (desaparecimento das frações de alto peso molecular e aumento da densidade dos polímeros menores). Além disso, essas alterações estruturais estiveram diretamente relacionadas ao grau de trombocitopenia. Por fim, a melhora do padrão multimérico que se seguiu à hemodiluição terapêutica associou-se à elevação no número de plaquetas circulantes. Analisadas em conjunto, essas observações sugerem uma relação direta entre ativação plaquetária endógena e desaparecimento de grandes multímeros do fator de von Willebrand, em portadores de síndrome de Eisenmenger. Com efeito, evidências de ativação plaquetária crônica *in vivo* têm sido encontradas em pacientes com hipertensão arterial pulmonar avançada, incluindo observações em nosso laboratório^{65,81}. Neste estudo, a ativação plaquetária endógena foi sugerida pela presença de níveis plasmáticos elevados de β - tromboglobulina. O aumento da afinidade de multímeros de alto peso molecular pela glicoproteína Ib da membrana plaquetária tem sido demonstrado em condições hereditárias como a doença de von Willebrand do tipo 2B e tem sido sugerido em doenças não hereditárias, em condições particulares de fluxo, como na estenose valvar aórtica⁸².

A trombomodulina é um proteoglicano de membrana endotelial que ao ligar-se à trombina ativa a proteína C, desempenhando importante papel como fator anticoagulante. As frações medidas no plasma representam fragmentos proteolíticos deste proteoglicano e assume-se que estariam refletindo o grau de síntese pela célula endotelial. Estudos têm demonstrado que células endoteliais de bovinos expostas à hipóxia apresentam

diminuição da concentração e da atividade da trombosmodulina em superfície, assim como supressão do seu RNA mensageiro⁸³⁻⁸⁶. Cacoub *et al.*⁶¹ relataram haver diminuição da concentração plasmática deste proteoglicano em pacientes com hipertensão pulmonar. Em nosso estudo, o encontro de baixas concentrações plasmáticas de trombosmodulina em ambos os subgrupos (A e B) sugere que graus discretos a moderados de hipoxemia podem ser suficientes para inibir sua síntese. Ao contrário do vWF:Ag e do t-PA, a trombosmodulina não apresentou modificações durante a evolução, tendo permanecido em baixas concentrações. Esta observação pode refletir uma maior sensibilidade da trombosmodulina às tensões baixas de oxigênio, comparativamente aos dois outros marcadores.

Outras ações descritas da hipóxia sobre o endotélio são a de induzir a expressão de um ativador direto do fator X da coagulação^{83,85} e a de estimular, via Egr-1 (*early growth response gene 1*), o aumento da expressão do fator tissular^{75, 87}, cujo papel é crítico na via extrínseca da coagulação.

Estudos envolvendo pacientes com hipertensão pulmonar demonstraram concentrações elevadas de PAI-1, sem alteração de sua atividade na situação basal^{56,60}. Apesar de ter sido demonstrado que a hipóxia induz a transcrição do gene do PAI-1⁸⁸, não se evidenciaram, neste estudo, diferenças entre o grupo de pacientes e o grupo controle em situação basal. Uma das limitações do estudo foi a de não ter analisado a atividade do PAI-1 e do t-PA. Na evolução, entretanto, três pacientes apresentaram níveis antigênicos elevados de PAI-1 em presença de

concentração plasmática do dímero D dentro da normalidade. Tal resultado poderia estar associado a alterações do sistema fibrinolítico e não necessariamente a ausência de fenômeno de coagulação intravascular.

A eritropoetina, um hormônio essencial para a eritropoese, tem sua síntese induzida pela hipóxia, através do HIF-1⁸⁹. Em células endoteliais, a eritropoetina induz a produção de ET-1⁹⁰ e PAI-1⁹¹. Através destes mecanismos, este hormônio parece ter importante papel no quadro de disfunção endotelial, presente na síndrome de Eisenmenger.

Partindo-se do pressuposto que a hipóxia e a eritrocitose são dois fatores de injúria endotelial e estão presentes tanto na circulação pulmonar como sistêmica desses pacientes, sugere-se que a disfunção endotelial também ocorra em ambos os territórios. Assim, as alterações sistêmicas descritas na síndrome de Eisenmenger (rins, sistema nervoso central, sistema hematológico)⁶⁷⁻⁶⁹ podem ser, em parte, reflexo do quadro de disfunção endotelial. Em estudo recente em pacientes portadores de síndrome de Eisenmenger⁹², demonstrou-se resposta vasodilatadora defectiva ao nível de antebraço, frente ao estímulo com acetilcolina e com nitroprussiato de sódio, sugerindo a presença de disfunção endotelial em território sistêmico.

Os resultados do presente estudo sugerem que, frente ao tratamento convencional, é possível esperar-se alguma mudança no comportamento dos marcadores bioquímicos ao longo da evolução. Estudos anteriores não realizaram a análise temporal desses índices. Neste trabalho, demonstrou-se melhora significativa de parte dos marcadores (diminuição dos níveis de

vWF:Ag e t-PA), porém os mesmos não chegaram a atingir os valores de normalidade. A não normalização poderia ser explicada, por exemplo, pelo momento do início da terapêutica muitas vezes tardio, pela duração do tratamento e pela não utilização de drogas mais específicas, como a prostaciclina ⁹³⁻⁹⁵. Observou-se que, apesar do uso da terapêutica anticoagulante, houve a persistência de níveis plasmáticos baixos de trombosmodulina, o que pode estar associado ao risco trombótico persistentemente elevado nestes pacientes. Essas verificações sugerem que o tratamento deve ser instituído precocemente e novas opções medicamentosas, que possam ser mais eficazes do que a warfarina, merecem ser investigadas em futuro próximo. Outro achado que merece destaque foi que pacientes com gravidade clínica e saturação periférica de oxigênio diversas, evoluem bioquimicamente de maneira distinta. O nível plasmático vWF:Ag permaneceu mais elevado nos pacientes de maior gravidade. Este fato pode ter implicações prognósticas ⁷⁹ e de conduta terapêutica.

A importância dos fenômenos trombóticos, sobretudo na circulação pulmonar, tem sido ressaltada em pacientes portadores de hipertensão pulmonar idiopática ⁵². Em pacientes com síndrome de Eisenmenger, estudos têm demonstrado alta incidência de trombose arterial pulmonar ^{67,96-99}. Entretanto, esses trabalhos não fornecem informações sobre possíveis fatores que estariam associados a esta complicação, sejam eles clínicos ou bioquímicos. O conhecimento destes fatores poderia ser útil na identificação de pacientes com alto risco para trombose arterial pulmonar, permitindo o

estabelecimento precoce de medidas preventivas. Em nosso estudo, entre os 24 pacientes submetidos a angiotomografia de tórax, evidenciou-se imagem compatível com trombose arterial pulmonar em 9 casos (37,5%). Aventa-se a hipótese de que este número seja ainda maior, pois a angiotomografia de tórax convencional tem boa resolução de imagem apenas para as artérias pulmonares principais, lobares e segmentares, não sendo capaz de fornecer de maneira precisa informações sobre as artérias mais distais. Neste estudo, os pacientes com TAPC mostraram-se mais hipoxêmicos, com maior idade e níveis mais elevados de dímero D. Com base nos resultados obtidos, pode-se aceitar como verdadeira a afirmação de que pacientes com síndrome de Eisenmenger e saturação periférica de oxigênio em torno de 85% (média dos pacientes observados) têm probabilidade exponencialmente crescente de desenvolver TAPC a partir dos trinta anos de idade (Gráfico18). Além disso, níveis plasmáticos de dímero D acima de 400 ng/ml estão associados a complicação trombótica pulmonar com valor preditivo positivo de 67% e negativo de 74%. Neste sentido, medidas profiláticas deveriam ser instituídas, com certeza, antes dos trinta anos de idade, com precocidade determinada pela saturação de oxigênio e por determinações sucessivas do dímero D plasmático.

Outra questão a ser discutida é se o quadro de trombose pulmonar seria, na verdade, classificado como fenômeno tromboembólico. Neste estudo, temos razões para acreditar que isto não seja verdade. Em primeiro lugar, todos os pacientes apresentavam doença hipertensiva pulmonar avançada, distúrbios do fluxo sangüíneo, hipoxemia, hiperviscosidade e

disfunção endotelial, conforme demonstrado. Em segundo lugar, não havia evidências de eventos embólicos prévios pessoais ou familiares, assim como de trombofilia. Por último, o diagnóstico de TAPC realizado em dois pacientes, sem história de dor torácica, escarro hemoptóico ou acentuação da dispnéia, parece indicar que a instalação deste processo ocorra de forma insidiosa.

A oxigenioterapia domiciliar crônica (24 horas por dia), em indivíduos portadores de doença pulmonar obstrutiva crônica e hipoxemia importante, tem se mostrado eficaz em diminuir a mortalidade ^{100,101}. Com relação à síndrome de Eisenmenger, há relato de melhora da sobrevida em um grupo pequeno e não randomizado de crianças, com o uso de oxigênio por pelo menos 12 horas diárias ¹⁰². Entretanto, *Sandoval et al* ¹⁰³, ao acompanharem por dois anos um grupo de pacientes com síndrome de Eisenmenger em faixa etária adulta, sob oxigenioterapia noturna, não evidenciaram diferenças evolutivas, comparativamente ao grupo controle. Especulamos, com base em observações clínicas, que pacientes com quadro de hipoxemia importante podem ter algum benefício com o uso crônico desta medida terapêutica, já que a hipóxia desencadeia uma série de mecanismos já comentados anteriormente. O tema merece, entretanto, futuras verificações.

No presente estudo, a hemodiluição foi realizada nos pacientes que preencheram os critérios clínicos (sintomas) e laboratoriais de indicação ¹⁰⁴. Procurou-se, dessa forma, evitar a espoliação de ferro que leva à piora do transporte de oxigênio, assim como à microcitose, ao aumento da rigidez da membrana das hemácias e da viscosidade sangüínea. Os efeitos em curto

prazo da hemodiluição foram a redução do hematócrito, a elevação do número de plaquetas circulantes e dos níveis plasmáticos de trombomodulina. O relato de melhora da sintomatologia pelos pacientes após a realização da mesma pode ser explicado, em parte, pela melhora do débito cardíaco e do transporte do oxigênio ^{105,106}.

O aumento do número de plaquetas após a hemodiluição pode estar associado, entre outros fatores, à maior oferta de oxigênio à medula óssea ¹⁰⁶ e à otimização das condições reológicas, com conseqüente diminuição da interação das plaquetas com a superfície endotelial alterada. Considerando-se que após a hemodiluição não houve mudança da saturação periférica de oxigênio, sugere-se que outros mecanismos além da hipoxemia devam ter influenciado o número de plaquetas circulantes e a composição multimérica do vWF:Ag.

Episódios documentados na literatura de hemoptise importante em pacientes com síndrome de Eisenmenger ^{67,69} tornam a indicação do uso de anticoagulantes nesse grupo de indivíduos um assunto ainda controverso. Por outro lado, as evidências de alterações do sistema de coagulação, fibrinolítico e de alta incidência de trombose arterial pulmonar, são achados que comprovam o alto risco trombótico nesses pacientes e trazem suporte à indicação dos anticoagulantes. Em nosso estudo, o uso de warfarina com controle rigoroso do INR (para manter valores entre 2,0 e 3,0) não resultou em complicações hemorrágicas importantes, em concordância com outros centros que acompanham pacientes adultos com síndrome de Eisenmenger sob uso de anticoagulante oral ¹⁰⁷. Em estudo realizado com cultura de

células endoteliais submetidas à hipóxia, a adição de warfarina não inibiu a geração do fator X ativado⁸³. Tal achado sugere que, em situações onde há baixa saturação de oxigênio, o uso isolado da warfarina pode não resultar em anticoagulação eficaz. Em adição, as observações de ativação plaquetária endógena crônica nestes pacientes trazem em pauta a discussão do uso de antiagregantes plaquetários nesse cenário. Assim, embora a anticoagulação possa ter papel preventivo, não há evidências de que ela consiga estacionar o processo de TAPC em evolução.

No presente estudo, a oportunidade de se ter analisado variáveis não só clínicas como também laboratoriais ao longo do tempo trouxe novas informações sobre o comportamento evolutivo de pacientes com síndrome de Eisenmenger. A disfunção endotelial, presente nesses indivíduos, correlacionou-se com a gravidade clínica e com a presença de complicações como a trombose arterial pulmonar. Observou-se também que, evolutivamente, houve melhora parcial de marcadores bioquímicos frente às medidas terapêuticas instituídas. Entretanto, a não normalização destes índices indica a permanência da suscetibilidade a fenômenos trombóticos. A síndrome de Eisenmenger permanece como uma entidade onde o paciente, embora com evolução mais protraída em comparação à hipertensão pulmonar idiopática, fica sujeito a uma série de complicações, notadamente trombóticas. Além das medidas terapêuticas convencionalmente aplicadas, cujo controle é imperativo, aguarda-se pelo desenvolvimento de novas drogas que possam oferecer maior nível de proteção a esses indivíduos.

Limitações do estudo

- A inclusão dos pacientes no estudo foi feita de maneira consecutiva, sendo que o tempo mínimo de observação previsto foi de 18 meses. Em decorrência desses requisitos, foi possível realizar a análise evolutiva dos marcadores bioquímicos em um número reduzido de pacientes.
- As medidas da pressão de artéria pulmonar não foram obtidas simultaneamente às outras medidas laboratoriais. Esta limitação não permitiu a análise da associação entre dados hemodinâmicos e disfunção endotelial nestes pacientes.
- Não foi possível efetuar a análise do PAI-1 por meio de coletas semestrais, como realizado com os outros marcadores. Este fato decorreu de dificuldades na obtenção dos *kits* para a sua análise e trouxe prejuízo para o estudo do comportamento evolutivo desta variável.
- No decorrer do estudo, houve mudanças nas medidas terapêuticas utilizadas, com base nos resultados que foram sendo obtidos. A principal delas foi a adoção de uma postura mais rígida em favor da anticoagulação. Por um lado, essas mudanças representaram um progresso em termos de normatização. Por outro, não se pode afirmar que o tratamento foi homogêneo, desde o início, em todos os casos.

Conclusões

1. A disfunção endotelial está presente na síndrome de Eisenmenger e é caracterizada, entre outras alterações, por aumento do vWF:Ag, do t-PA e diminuição da trombosmodulina .
2. Embora com idades semelhantes, pacientes com gravidade clínica diversa apresentam diferenças laboratoriais. Os pacientes mais graves são mais hipoxêmicos e possuem níveis mais elevados de vWF:Ag e dímero D.
3. Frente às medidas terapêuticas convencionais, isto é, que não incluem vasodilatadores, algumas anormalidades bioquímicas são passíveis de melhora ao longo do tempo sem, entretanto, haver normalização. Esses achados ressaltam a necessidade do início do tratamento precocemente e do desenvolvimento de medidas terapêuticas mais específicas e eficazes.
4. O diagnóstico de TAPC em 34,7% dos pacientes submetidos à angiotomografia de tórax evidencia a alta probabilidade de ocorrência dessa complicação na síndrome de Eisenmenger. Sua presença deve ser suspeitada em pacientes com hipoxemia mais acentuada, sobretudo acima dos 30 anos de idade, em presença de dímero D persistentemente elevado.
5. A hemodiluição terapêutica resulta em melhora dos sintomas clínicos, além de aumento dos níveis de trombosmodulina, do número de plaquetas circulantes e melhora da composição multimérica do fator de von Willebrand. Tais verificações justificam a sua indicação criteriosa em pacientes com síndrome de Eisenmenger.

6. As modificações encontradas na composição multimérica do fator de von Willebrand e sua relação com as alterações plaquetárias sugerem anormalidades pró-trombóticas na síndrome de Eisenmenger. Esses achados indicam a necessidade da proteção antitrombótica, além das medidas anticoagulantes convencionalmente utilizadas.

Conclusões

7. A disfunção endotelial está presente na síndrome de Eisenmenger e é caracterizada, entre outras alterações, por aumento do vWF:Ag, do t-PA e diminuição da trombosmodulina .
8. Embora com idades semelhantes, pacientes com gravidade clínica diversa apresentam diferenças laboratoriais. Os pacientes mais graves são mais hipoxêmicos e possuem níveis mais elevados de vWF:Ag e dímero D.
9. Frente às medidas terapêuticas convencionais, isto é, que não incluem vasodilatadores, algumas anormalidades bioquímicas são passíveis de melhora ao longo do tempo sem, entretanto, haver normalização. Esses achados ressaltam a necessidade do início do tratamento precocemente e do desenvolvimento de medidas terapêuticas mais específicas e eficazes.
10. O diagnóstico de TAPC em 34,7% dos pacientes submetidos à angiotomografia de tórax evidencia a alta probabilidade de ocorrência dessa complicação na síndrome de Eisenmenger. Sua presença deve ser suspeitada em pacientes com hipoxemia mais acentuada, sobretudo acima dos 30 anos de idade, em presença de dímero D persistentemente elevado.
11. A hemodiluição terapêutica resulta em melhora dos sintomas clínicos, além de aumento dos níveis de trombosmodulina, do número de plaquetas circulantes e melhora da composição multimérica do fator de von Willebrand. Tais verificações justificam a sua indicação criteriosa em pacientes com síndrome de Eisenmenger.
12. As modificações encontradas na composição multimérica do fator de von Willebrand e sua relação com as alterações plaquetárias sugerem anormalidades pró-trombóticas na síndrome de Eisenmenger. Esses achados indicam a necessidade da proteção antitrombótica, além das medidas anticoagulantes convencionalmente utilizadas.

Referências bibliográficas

- 1 Rich S. Pulmonary hypertension. In: Braunwald E, Zipes DP, Libby P. *Heart disease: a textbook of cardiovascular medicine*. 6a ed. Philadelphia:Saunders Company; 2001. p.1908-54.
- 2 Fisher LG, Aken HV, Bürkle H. Management of pulmonary hypertension: physiological and pharmacological considerations for anesthesiologists. *Anesth Analg*. 2003;96:1603-16.
- 3 Stenmark RK, Mecham RP. Cellular and molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling. *Annu Rev Physiol*. 1997;59:89-144.
- 4 *Dresdale, Michtom (1951) apud Boyce PD, Waxman AB. Pulmonary hypertension: work in progress. *J Nucl Cardiol*. 2003;10:413-23.
- 5 The international primary pulmonary hypertension study (IPPSHS). *Chest*. 1994;105(2):37S-41S.
- 6 Rich S, Rubin LJ, Abenhail L, Barst RJ, Brundage BH, Fishman AP, Higenbottam T, Langleben D, MacGoon MD, Erasme RN, Newman JH, Rabinovitch M, Sandoval J, Simonneau G, Voelkel NF. Executive summary from world symposium on primary pulmonary hypertension. *Evian*; 1998. The World Health Organization [Internet]. 1998 [cited 2004 Jun 20]. Available from: <http://www.who.int/ncd/cvd/pph.html>.
- 7 Simonneau S, Nazzareno G, Rubin LJ, Langlebeden D, Seeger W, Domenighetti G, Guibbs S, Lebrec D, Speich R, Beghetti M, Rich

* Dresdale DT, Shults M, Michtom RJ. Primary Pulmonary Hypertension. *Am J Med* 1951:686-705

- S, Fishman A. Clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 2004;43:5S-12S.
- 8 Eisenmenger V. Die Angeborenen Defecte der Kammerscheidewand des Herzen. *Z Klin Med.* 1897;32:1-28 apud Rozenzweig EB, Barst RJ⁹⁶.
- 9 Wood P. The Eisenmenger syndrome or pulmonary hypertension with reverses central shunt. *Br Med J.* 1958;2:701-9 apud Rozenzweig EB, Barst RJ⁹⁶.
- 10 Jeffery TK, Morrel NW. Molecular and celular basis of pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension. *Progr Cardiovasc Dis.* 2002;45:173-202.
- 11 Haworth SG. Pathobiology of pulmonary hypertension in infants and children. *Progr Pediat Cardiol.* 2001;12:249-69.
- 12 Rabinovitch M. Pathology of pulmonary hypertension. *Progr Pediat Cardiol.* 2001;12:223-47.
- 13 Rabinovitch M. Pulmonary hypertension: updating a mysterious disease. *Cardiovasc Res.* 1997;34:268-72.
- 14 Okada K, Tanaka Y, Bernstein M. Pulmonary hemodynamics modify the rat pulmonary artery response to injury. a neointimal model of pulmonary hypertension. *Am J Pathol.* 1997;151:1019-25.
- 15 Botney MD. Role of hemodynamics in pulmonary vascular remodeling. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;159:361-4.
-

- 16 Heath E, Edwards JE. The pathology of hypertensive pulmonary vascular disease. *Circulation*. 1958;18:533-44 apud Granton JT, Rabinovitch M²⁴.
- 17 Gross PL, Aird WC. The endothelium and thrombosis. *Semin Thromb Hemost*. 2000;26:463-78.
- 18 Henderson AH. Endothelium in control. *Br Heart J*. 1991;65:116-25.
- 19 Veyssier-Belot C, Cacoub P. Role of endothelial and smooth muscle cells in the physiopathology and treatment management of pulmonary hypertension. *Cardiovasc Res*. 1999;44:274-82.
- 20 Haworth SG. Pulmonary hypertension in the young. *Heart*. 2000;88:658-64.
- 21 Archer S, Rich S. Primary pulmonary hypertension: a vascular biology and translational research "work in progress". *Circulation*. 2000;102:2781-91.
- 22 Sperling RT, Creager MA. Nitric oxide and pulmonary hypertension. *Coron Artery Dis*. 1999;10:287-94.
- 23 Rosenzweig EB, Gersony WM, Barst RJ. Eisenmenger syndrome in ventricular septal defect patients. *Progr Pediat Cardiol*. 2001;14:175-80.
- 24 Granton JT, Rabinovitch M. Pulmonary arterial hypertension in congenital heart disease. *Cardiol Clin*. 2002;20:441-57.
- 25 Smith KJ, Bleyer AJ, Little WC, Sane DC. The cardiovascular effects of erythropoietin. *Cardiovascr Res*. 2003;59:538-48.

- 26 Stamler JS, Loh E, Roddy MA, Currie KE, Creager MA. Nitric oxide regulates basal systemic and pulmonary vascular resistance in healthy humans. *Circulation*. 1994;89:2035-40.
- 27 Celermajer DS, Dollery C, Burch M, Deanfield JE. Role of endothelium in the maintenance of low pulmonary vascular tone in normal children. *Circulation*. 1994;89:2041-4.
- 28 Kharbanda RK, Deanfield JE. Functions of the healthy endothelium. *Coron Artery Dis*. 2001;12:485-91.
- 29 Giaid A, Saleh D. Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med*. 1995;333:214-21.
- 30 Steudel W, Ichinose F, Huang PL. Pulmonary vasoconstriction and hypertension in mice with targeted disruption of the endothelial nitric oxide synthase (NOS 3) gene. *Circ Res*. 1997;81:34-41.
- 31 Christman BW, McPherson CD, Newman JH, King GA, Bernard GR, Groves BM, Loyd JE. An imbalance between excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *N Engl J Med*. 1992;327:70-5.
- 32 Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*. 1988;332:411-5.
- 33 Dubin D, Pratt RE, Kooke JP, Dzau VJ. Endothelin, a potent vasoconstrictor, is a vascular smooth muscle mitogen. *J Vasc Biol Med*. 1989;1:150-4.

- 34 Yoshibayashi M, Nishioka K, Nakao K, Saito Y, Matsumura M, Ueda T, Temma S, Shirakami G, Imura H, Mikawa H. Plasma endothelin concentrations in patients with pulmonary hypertension associated with congenital heart defects: evidence for increased production of endothelin in pulmonary circulation. *Circulation*. 1991;84:2280-5.
- 35 Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, Michel RP, Levy R, Shennib H, Kimura S, Masaki T, Duguid WP, Stewart DJ. Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Eng J Med*. 1993;328:1732-9.
- 36 Cacoub P, Dorent R, Nataf P, Carayon A, Riquet M, Noe E, Piette JC, Godeau P, Gandjbakhch I. Endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *Cardiovasc Res*. 1997;33:196-200.
- 37 Cacoub P, Dorent R, Maistre G, Nataf P, Carayon A, Piette JC, Godeau P, Cabrol C, Gandjbakhch I. Endothelin-1 in primary pulmonary hypertension and the Eisenmenger syndrome. *Am J Cardiol*. 1993;71:448-50.
- 38 Stewart DJ. Endothelin in cardiopulmonary disease: factor paracrine vs neurohumoral. *Europ Heart J*. 1993;14(1):48-54.
- 39 Rubens C, Ewert R, Halank M, Wensel R, Orzechowski HD, Schultheiss HP, Hoeffken G. Big endothelin-1 and endothelin-1 plasma levels are correlated with the severity of primary pulmonary hypertension. *Chest*. 2001;120:1562-9.

- 40 Giaid A. Nitric oxide and endothelin-1 in pulmonary hypertension. *Chest*. 1998;114:208S-212S.
- 41 Fibbe WE, Daha MR, Hiemstra PS. Interleukin 1 and poly(rI).poly(rC) induce production of granulocyte CSF, macrophage CSF, and granulocyte-macrophage CSF by human endothelial cells. *Exp Hematol*. 1989;17:229-34.
- 42 Boes M, Dake BL, Bar RS. Interactions of cultures endothelial cells with TGF-beta, bFGF, PDGF and IGF-1. *Life Sci*. 1991;48:811-21.
- 43 Lopes AAB, Aiello VD, Maeda NY, Ebaid M. Remodelagem vascular pulmonar. Considerações sobre a possível participação de fatores peptídicos de crescimento e substâncias relacionadas. *Arq Bras Cardiol*. 1993;60:107-14.
- 44 Laiho M, Keski-Oja J. Growth factors in the regulation of pericellular proteolysis: a review. *Cancer Res*. 1989;49:2433-533.
- 45 Saksela O, Rifkin DB. Release of basic fibroblast growth factor-heparan sulfate complexes from endothelial cells by plasminogen activator-mediated proteolytic activity. *J Cell Biol*. 1990;110:767-75.
- 46 Rabinovitch M. Elastase and the pathobiology of unexplained pulmonary hypertension. *Chest*. 1998;114:213S-24S.
- 47 Rabinovitch M. EVE and beyond, retro and prospective insights. *Am J Physiol*. 1999;277:L5-L12.
- 48 Cowan KN, Jones PL, Rabinovitch M. Elastase and matrix metalloproteinase inhibitors induce regression, and tenascin-C

- antisense prevents progression, of vascular disease. *J Clin Invest.* 2000;105:21-34.
- 49 Edelberg JM, Christie PD, Rosenberg RD. Regulation of vascular bed-specific prothrombotic potential. *Circ Res.* 2001;89:117-24.
- 50 Hinsbergh VWM. The endothelium: vascular control of haemostasis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2001;95:198-201.
- 51 Dahlbäck B. Blood coagulation. *Lancet.* 2000;355:1627-32.
- 52 Fuster V, Steele PM, Edwards WD, Gersh BJ, McGoon MD, Frye RL. Primary pulmonary hypertension: natural history and the importance of thrombosis. *Circulation.* 1984;70:580-7.
- 53 Chaouat A, Weitzenblum E, Higenbottanm T. The role of thrombosis in severe pulmonary hypertension. *Eur Respir J.* 1996;9:356-63.
- 54 Eisenberg PR, Lucore C, Kaufman L, Sobel BE, Jaffe AS, Rich S. Fibrinopeptide A levels indicative of pulmonary vascular thrombosis in patients with primary pulmonary hypertension. *Circulation.* 1990;82:841-7.
- 55 Welsh CH, Hassell KL, Badesch DB, Kressin DC, Marlar RA. Coagulation and fibrinolytic profiles in patients with severe pulmonary hypertension. *Chest.* 1996;110:710-7.
- 56 Altman R, Scazziota A, Rouvier J, Gurfinkel E, Favaloro R, Perrone S, Fareed J. Coagulation and fibrinolytic parameters in patients with pulmonary hypertension. *Clin Cardiol.* 1996;19:549-54.

- 57 Hassell KL. Altered hemostasis in pulmonary hypertension. *Haemost Thromb.* 1998;9:107-17.
- 58 Martin I, Humbert M, Marfaing-Koka A, Capron F, Wolf M, Meyer D, Simonneau G, Anglés-Cano E. Plasminogen activation by blood monocytes and alveolar macrophages in primary pulmonary hypertension. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2002;13:417-22.
- 59 Hoepfer MM, Sosada M, Fabel H. Plasma coagulation profiles in patients with severe primary pulmonary hypertension. *Eur Respir J.* 1998;12:1446-9.
- 60 Huber K, Beckmann R, Frank H, Kneussl M, Mlczoch J, Binder BR. Fibrinogen, t-PA, and PAI-1 plasma levels in patients with pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994;150:929-33.
- 61 Cacoub P, Karmochkine M, Dorent R, Nataf P, Piette JC, Godeau P, Gandjbakhch I, Boffa MC. Plasma levels of thrombomodulin in pulmonary hypertension. *Am J Med.* 1996;101:160-4.
- 62 Healy AM, Hancock WW, Christie PD, Rayburn HB, Rosenberg RD. Intravascular coagulation activation in a murine model of thrombomodulin deficiency: effects of lesion size, age, and hypoxia on fibrin deposition. *Blood.* 1998;92:4188-97.
- 63 Lopes AAB, Maeda NY, Ebaid M, Chamone DF, Pileggi F. Effect of intentional hemodilution on platelet survival in secondary pulmonary hypertension. *Chest.* 1989;95:1207-10.

- 64 Caramurú LH, Soares RPS, Maeda NY, Lopes AA. Hypoxia and altered platelet behavior influence von Willebrand factor multimeric composition in secondary pulmonary hypertension. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2003;9:251-8.
- 65 Maeda NY, Bydlowsky SP, Lopes AAB. Platelet GP IIb/IIIa non-receptor tyrosine kinases pp60 c-src and pp 125FAK in patients with advanced pulmonary hypertension. *Eur Heart J.* 2002;23:113.
- 66 Denis C V. Molecular and cellular biology of von Willebrand factor. *Int J Hematol.* 2002;75:3-8.
- 67 Daliento L, Somerville J, Presbiterot P, Menti L, Brach-Prevert S; Rizzoli G, Stone S. Eisenmenger syndrome: factors relating to deterioration and death. *Eur Heart J.* 1998;19:1845-55.
- 68 Dunbar I. Diagnosis and treatment of severe pediatric pulmonary hypertension. *Cardiol Rev* 2001;9:227-37.
- 69 Niwa K, Perloff JK, Kaplan S, Child JS, Miner PD. Eisenmenger syndrome in adults: ventricular septal defect, truncus arteriosus, univentricular heart. *J Am Coll Cardiol.* 1999;34:223-32.
- 70 Gonçalves RC, Buschpigell CA, Lopes AA. Circulating blood volumes in pulmonary hypertension associated with erythrocytosis - the effects of therapeutic hemodilution. *Cardiol Young.* 2003;13:544-51.
- 71 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.
- 72 Ten VS, Pinsky DJ. Endothelial response to hypoxia: physiologic adaptation and pathologic dysfunction. *Curr Opin Crit Care*. 2002;8:242-50.
- 73 Pinsky DJ, Naka Y, Liao H, Oz MC, Wagner DD, Mayadas TN, Johnson RC, Hynes RO, Heath M, Lawson CA, Stern DM. Hypoxia-induced exocytosis of endothelial cell Weibel-Palade bodies: a mechanism for rapid neutrophil recruitment after cardiac preservation. *J Clin Invest*. 1996;97:493-500.
- 74 Michiels C, Arnould T, Remacle J. Endothelial cell responses to hypoxia: initiation of a cascade of cellular interactions. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1497:1-10.
- 75 Huber D, Cramer EM, Kaufmann JE, Meda P, Massé JM, Kruithof EKO, Vischer UM. Tissue type plasminogen activator (t-PA) is stored in Weibel-Palade bodies in human endothelial cells both in vitro and in vivo. *Blood*. 2002;99:3637-45.
- 76 Yu AY, Shimoda LA, Iyer NV, Huso DL, Sun X, McWilliams R, Beaty T, Sham JSK, Wiener CM, Sylvester JT, Semenza GL. Impaired physiological responses to chronic hypoxia in mice partially deficient for hypoxia-inducible factor 1 α . *J Clin Invest*. 1999;103:691-6.
- 77 Galbusera M, Zoja C, Donadelli R, Paris S, Morigi M, Benigni A, Figliuzzi M, Remuzzi G, Remuzzi A. Fluid shear stress modulates

- von Willebrand factor release from human vascular endothelium. *Blood*. 1997;90:1558-64.
- 78 Rabinovitch M, Andrew M, Thom H, Trusler GA, Williams WG, Rowe RD, Olley PM. Abnormal endothelial factor VIII associated with pulmonary hypertension and congenital heart defects. *Circulation*. 1987;76:1043-52.
- 79 Lopes AA, Maeda NY, Bydlowsky SP. Abnormalities in circulating von Willebrand factor and survival in pulmonary hypertension. *Am J Med*. 1998;105:21-6.
- 80 Veyradier A, Nishikubo T, Humbert M, Wolf M, Sitbon O, Simonneau G, Girma JP, Meyer D. Improvement of von Willebrand factor proteolysis after prostacyclin infusion in severe pulmonary arterial hypertension. *Circulation*. 2000;102:2460-2.
- 81 Maeda N, Bydlowsky S, Lopes A. Enhanced tyrosine-phosphorylation of platelet substrates including PP60C-SRC and PP125FAK is indicative of endogenous platelet activation in pulmonary vaso-occlusive disease. *Cardiovasc Pathol*. 2004;13:S122.
- 82 Pareti FI, Lattuada A, Bressi C, Zanobini M, Sala A, Steffan A, Ruggeri ZM. Proteolysis of von Willbrand factor and shear stress-induced platelet aggregation in patients with aortic valve stenosis. *Circulation*. 2000;102:1290-5.
- 83 Ogawa S, Gerlach H, Esposito C. Hypoxia modulates the barrier and coagulant function of cultured bovine endothelium: increased

- monlayer permeability and induction of procoagulant properties. *J Clin Invest.* 1990;85:1090-8.
- 84 Shreeniwas R, Ogawa S, Cozzolino F. Macrovascular and microvascular endothelium during long-term hypoxia: alterations in cell growth, mono-layer permeability, and cell surface coagulant properties. *J Cell Physiol.* 1991;146:8-17.
- 85 Ogawa S, Clauss M, Kuwabara K, Shreeniwas R, Butura C, Koga S, Stern D. Hypoxia induces endothelial cell synthesis of membrane-associated proteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991;88:9897-901.
- 86 Ogawa S, Shreeniwas R, Brett J, Class M, Furie M, Stern D. The effect of hypoxia on capillary endothelial cell function: modulation of barrier and coagulant function. *Br J Haematol.* 1990;75:517-24.
- 87 Yan SF, Zou YS, Gao Y, Zhai C, Mackman N, Lee SL, Miltrandt J, Pinsky D, Kisiel W, Stern D. Tissue factor transcription driven by Egr-1 is a critical mechanism of murine pulmonary fibrin deposition in hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95:8298-303.
- 88 Uchiyama T, Kurabayashi M, Ohyama Y, Utsugi T, Nobuhiro A, Sato M, Tomono S, Kawazu S, Nagai R. Hypoxia induces transcription of the plasminogen activator inhibitor-1 gene through genistein-sensitive tyrosion kinase pathways in vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:1155-61.
- 89 Smith KJ, Bleyer AJ, Little WC, Sane DC. The cardiovascular effects of erythropoietin. *Cardiovasc Res* 2003;59:538-48.

- 90 Carlini RG, Dusso AS, Obialo CI, Alvarez UM, Rothstein M. Recombinant human erythropoietin (rHuEPO) increases endothelin-1 release by endothelial cells. *Kidney Int.* 1993;43:1010-4.
- 91 Nagai T, Akizawa T, Kohjiro S. rHuEPO enhances the production of plasminogen activator inhibitor-1 in cultured endothelial cells. *Kidney Int.* 1996;50:102-7.
- 92 Nakamura M, Yoshida H, Naganuma Y, Kon H, Sugawara S, Hiramori K. Peripheral vasodilatory dysfunction in adult patients with congenital heart disease and severely elevated pulmonary vascular resistance. *Angiology.* 2002;53:715-20.
- 93 Friedman R, Mears G, Barst RJ. Continuous infusion of prostacyclin normalizes plasma markers of endothelial cell injury and platelet aggregation in primary pulmonary hypertension. *Circulation.* 1997;96:2782-4.
- 94 Sakamaki F, Shingo K, Noritoshi N, Nagato S, Hideo O, Toru S. Norifumi N. Increased plasma P-selectin and decreased thrombomodulin in pulmonary arterial hypertension were improved by continuous prostacyclin therapy. *Circulation.* 2000;102:2720-5.
- 95 Rosenzweig EB, Kerstein D, Barst RJ. Long-term prostacyclin for pulmonary hypertension with associated congenital heart defects. *Circulation.* 1999;99:1858-65.
- 96 Rosenzweig EB, Barst RJ. Eisenmenger's syndrome: current management. *Progr Cardiovascr Dis.* 2002;45:129-38.

- 97 Daliento L, Rebellato L, Angelini A, Frescura C, Mazzotti E, Rotundo M, Thiene G. Fatal outcome in Eisenmenger syndrome. *Cardiovasc Pathol*. 2002;11:221-8.
- 98 Silversides CK, Granton JT, Konen E, Hart MA, Webb GD, Therrien J. Pulmonary thrombosis in adults with Eisenmenger syndrome. *J Am Coll Cardiol*. 2003;42:1982-7.
- 99 Perloff JK, Hart EM, Greaves SM, Miner PD, Child JS. Proximal pulmonary arterial and intrapulmonary radiologic features of Eisenmenger syndrome and primary pulmonary hypertension. *Am J Cardiol*. 2003;92:182-7.
- 100 Continuous or nocturnal oxygen therapy in hypoxemic chronic obstructive lung disease: a clinical trial. Nocturnal oxygen therapy trial group. *Ann Intern Med*. 1980;93:391-8.
- 101 Crockett AJ, Cranston JM, Moss JR, Alpers JH. A review of long-term oxygen therapy for chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med*. 2001;95:437-43.
- 102 Bowyer JJ, Busst CM, Denison DM, Shinebourne EA. Effect of long term oxygen treatment at home in children with pulmonary vascular disease. *Br Heart J*. 1986;55:385-90.
- 103 Sandoval J, Aguirre JS, Pulido T, Martinez-Guerra ML, Santos E, Alvarado P, Rosas M, Bautista E. Nocturnal oxygen therapy in patients with the Eisenmenger syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164: 1682-7.

- 104 Thorne SA. Management of polycythaemia in adults with cyanotic congenital heart disease. *Heart*. 1998;79:315-6.
- 105 Oldershaw PJ, Sutton MG. Haemodynamic effects of haematocrit reduction in patients with polycythaemia secondary to cyanotic congenital heart disease. *Br Heart J*. 1980;44:584-8.
- 106 Vongpatanasin W, Brickner ME, Hillis LD, Lange RA. The Eisenmenger syndrome in adults [Review]. *Ann Intern Med*. 1998;128: 745-55.
- 107 Benisty JI, Landzberg MJ. Eisenmenger's syndrome. *Curr Treat Options Cardiovasc Med*. 1999;1:355-62.