

ALESSANDRA COSTA BARRETO

Estudo de marcadores de disfunção endotelial e de  
inflamação em portadores de hipertensão arterial  
pulmonar: implicações terapêuticas e prognósticas

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

Programa de Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. Antonio Augusto Barbosa Lopes

São Paulo

2011

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

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

©reprodução autorizada pelo autor

Barreto, Alessandra Costa

Estudo de marcadores de disfunção endotelial e de inflamação em portadores de hipertensão arterial pulmonar : implicações terapêuticas e prognósticas / Alessandra Costa Barreto. -- São Paulo, 2011.

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

Programa de Cardiologia.

Orientador: Antonio Augusto Barbosa Lopes.

Descritores: 1.Hipertensão pulmonar 2.Cardiopatias congênitas  
3.Disfunção microvascular 4.Inibidores de hidroximetilglutaril-CoA redutases  
5.Fator de von Willebrand 6.Selectina-P

USP/FM/DBD-309/11

*Aos meus três amores:*

Fábio, amor da minha vida, obrigada pela paciência e apoio incondicional. Eu te adoro;

Ana Clara, obrigada por me fazer sentir a plenitude do maior sentimento de todos; o amor de uma mãe pelo filho;

Mariana, obrigada por me mostrar que esse sentimento pode ser multiplicado.

*À minha família:*

À minha mãezinha Marly, cujo pedido a Deus de ter a filha médica no InCor foi por duas vezes registrado no Muro das Lamentações, em Israel. Saudades de teu abraço, saudades de tua voz. Eu te amarei para sempre, Mainha;

Ao meu paizão Barreto, de quem herdei o perfeccionismo e a admiração pela língua portuguesa. Exemplo de honestidade, dedicação e esforço. Intelectual por natureza. Professor por vocação. Eu te amo, Painho;

À minha irmã Didida, cuja força de vontade a faz dar reviravoltas na vida. Eu te amo, irmãzinha;

Ao meu irmão Júnior, cujo bom humor contagia todos ao seu redor. Eu te amo, irmãozinho;

Ao meu sobrinho Dudado, que anos atrás fez aflorar em mim a sensibilidade que todo pediatra necessita para cuidar de seres tão vulneráveis como as crianças, mesmo sem filhos. Titia te ama, querido sobrinho.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof Dr Antônio Augusto B. Lopes, meu mestre e orientador, pesquisador incansável, dedicado à hipertensão pulmonar há cerca de 30 anos. Sua perseverança mudou o curso de muitas vidas para melhor. Com carinho e admiração, obrigada;

Aos amigos que tiveram envolvimento direto no estudo: Dra Nair Maeda, Dra Rosângela Soares, Enf<sup>ª</sup> Cristina Cícero e Sra Roseli Polo. Sua ajuda foi inestimável ao longo dessa jornada de seis anos;

A todos os amigos da Cardiologia Pediátrica. Nos momentos em que tive que me ausentar, recebi apoio incondicional de todos, em especial dos colegas do ambulatório: Dr Luís Bustamante, Dra Maria Angélica Binotto e Dra Rilvani Cavalcante. Dra Ana Maria Thomaz, amiga de todas as horas, além de excelente médica, cuidou com carinho de todos os meus queridos pacientes na hora mais difícil. Obrigada a todos;

Ao Prof Dr Edmar Atik, também mestre e exemplo de serenidade, me ensinou a Cardiologia Pediátrica. Obrigada;

A Sra Rute Sotero, por estar sempre disposta a ajudar em qualquer âmbito, em qualquer momento;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa;

À Astra-Zeneca, pelo apoio no fornecimento da medicação do estudo.

## NORMALIZAÇÃO ADOTADA

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

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

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

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

## SUMÁRIO

### LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

### LISTA DE SÍMBOLOS

### RESUMO

### ABSTRACT

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1.	Hipertensão pulmonar: conceito.....	2
1.2.	Classificação.....	2
1.3.	Disfunção microvascular.....	5
1.4.	Hipertensão arterial pulmonar.....	6
1.4.1.	Aspectos epidemiológicos.....	8
1.4.2.	Mecanismos envolvidos.....	9
1.4.2.1.	Desequilíbrio entre vasodilatadores e vasoconstritores..	10
1.4.2.2.	Disfunção dos canais iônicos.....	12
1.4.2.3.	Alterações em receptores da família TGF- $\beta$ , favorecendo proliferação celular.....	13
1.4.2.4.	Plaquetas e serotonina.....	13
1.4.2.5.	Trombose.....	15
1.4.2.6.	Inflamação.....	16
1.4.3.	Hipertensão arterial pulmonar idiopática, hereditária e associada a cardiopatias congênitas.....	17
1.5.	Desenvolvimento de novos recursos terapêuticos.....	19
1.5.1.	Prostanóides.....	20
1.5.2.	Antagonistas de receptores de endotelina.....	21
1.5.3.	Inibidores da enzima fosfodiesterase-5.....	21
1.5.4.	Novas perspectivas de tratamento medicamentoso.....	22

1.6.	Marcadores de disfunção microvascular em HAP.....	24
1.7.	Prognóstico em HAP.....	25
1.7.1.	Marcadores funcionais.....	26
1.7.2.	Marcadores biológicos.....	27
1.8.	Resumindo algumas questões não resolvidas.....	30
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>31</b>
2.1.	Objetivo geral.....	32
2.1.1.	Objetivos específicos .....	32
<b>3.</b>	<b>MÉTODOS.....</b>	<b>34</b>
3.1.	Casuística.....	35
3.1.1.	Grupos de pacientes considerados no estudo.....	36
3.1.2.	Critérios de exclusão.....	37
3.1.3.	Aspectos éticos e aprovação por comitês científicos.....	38
3.1.4.	Tamanho amostral.....	39
3.2.	Desenho geral das investigações.....	39
3.2.1.	Caracterização geral dos marcadores bioquímicos.....	39
3.2.2.	Efeito de estatinas sobre marcadores de disfunção microvascular.....	40
3.2.3.	Análise de sobrevida.....	41
3.3.	Especificações sobre o estudo do possível efeito de estatina.....	41
3.4.	Procedimentos de diagnóstico funcional e laboratorial geral.....	44
3.4.1.	Determinações de segurança.....	45
3.5.	Procedimentos laboratoriais específicos – marcadores bioquímicos.....	46
3.5.1.	Coleta de sangue venoso periférico.....	46

3.5.2.	Separação e estocagem do plasma.....	46
3.5.3.	Processamento das amostras.....	47
3.5.4.	Correção levando-se em conta o hematócrito.....	47
3.5.5.	Controles.....	48
3.5.6.	Especificações sobre os 'kits' para as determinações bioquímicas.....	49
3.5.7.	Cronograma das coletas.....	49
3.6.	Procedimentos de quantificação.....	50
3.6.1.	Forma de apresentação dos dados.....	50
3.6.2.	Procedimentos realizados na situação de entrada no estudo.....	50
3.6.2.1.	Estudo crônico comparativo do efeito estatina em relação ao placebo.....	51
3.6.3.	Sobrevida e fatores modificadores.....	52
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>54</b>
4.1.	Resumo das alterações encontradas.....	55
4.2.	Análise descritiva.....	57
4.2.1.	Caracterização geral da população estudada.....	57
4.2.2.	Acompanhamento ambulatorial e tratamento.....	61
4.3.	Análise inferencial - Parte 1.....	62
4.3.1.	Caracterização bioquímica da disfunção microvascular.	62
4.3.1.1.	Determinação do nível plasmático do antígeno do fator de von Willebrand.....	63
4.3.1.2.	Determinação do nível plasmático do ativador tecidual do plasminogênio.....	66
4.3.1.3.	Determinação do nível plasmático do inibidor do ativador do plasminogênio.....	68
4.3.1.4.	Determinação do nível plasmático da selectina-P.....	70
4.3.1.5.	Determinação do nível plasmático do fator de necrose tumoral.....	72



4.3.1.6.	Determinação do nível plasmático da proteína C reativa	74
4.3.1.7.	Determinação do nível plasmático da interleucina-6.....	75
4.3.1.8.	Determinação do nível plasmático da interleucina-10....	78
4.3.2.	Correlação dos marcadores de disfunção microvascular com variáveis clínicas de gravidade e prognóstico.....	80
4.4.	Análise inferencial – Parte 2.....	81
4.4.1.	Efeitos da intervenção terapêutica sobre a disfunção microvascular e variáveis clínicas.....	81
4.4.1.1.	Efeito do tratamento sobre as variáveis clínicas.....	83
4.4.1.2.	Efeito do tratamento sobre os marcadores de disfunção microvascular.....	85
4.4.1.2.1.	Efeito do tratamento sobre o nível plasmático do antígeno do fator de von Willebrand.....	85
4.4.1.2.2.	Efeito do tratamento sobre o nível plasmático do ativador tecidual do plasminogênio.....	87
4.4.1.2.3.	Efeito do tratamento sobre o nível plasmático do inibidor do ativador do plasminogênio.....	88
4.4.1.2.4.	Efeito do tratamento sobre o nível plasmático da selectina-P.....	89
4.4.1.2.5.	Efeito do tratamento sobre o nível plasmático do fator de necrose tumoral.....	90
4.4.1.2.6.	Efeito do tratamento sobre o nível plasmático da proteína C reativa.....	91
4.4.1.2.7.	Efeito do tratamento sobre o nível plasmático da interleucina-6.....	92
4.4.1.2.8.	Efeito do tratamento sobre o nível plasmático da interleucina-10.....	93
4.5.	Análise inferencial – Parte 3.....	94
4.5.1.	Período de acompanhamento ambulatorial.....	94
4.5.1.1.	Pacientes com HAP idiopática, hereditária ou associada à cardiopatia congênita corrigida.....	95
4.5.1.2.	Pacientes com HAP associada à cardiopatia congênita.	96
4.5.1.2.1.	Aspectos descritivos do seguimento e sobrevida.....	96

4.5.1.2.2.	Variáveis com possível impacto na sobrevida.....	99
4.6.	Análise sobre a vida (sem ferramentas estatísticas).....	105
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>115</b>
5.1.	Considerações gerais sobre os dados observados.....	116
5.2.	A disfunção microvascular na HAP e possibilidades de modificação através de intervenções terapêuticas.....	119
5.3.	Índices de prognóstico na hipertensão arterial pulmonar	125
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</b> .....	<b>130</b>
<b>7.</b>	<b>ANEXOS</b> .....	<b>135</b>
<b>8.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>152</b>

#### **Apêndice**

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALK-1	Quinase receptor da ativina-símile ( <i>activin receptor-like kinase</i> )
ALT	Alanina aminotransferase
ANP	Peptídeo atrial natriurético
AST	Aspartato aminotransferase
BMP	Proteína morfogenética óssea
BMPR2	Receptor do tipo 2 da proteína morfogenética óssea
BNP	Peptídeo cerebral natriurético
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos e Pesquisa
CPK	Creatinofosfoquinase
DC6M	Distância caminhada em seis minutos
DP	Desvio padrão
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGF	Fator endothelial de crescimento
ELISA	Ensaio imunoabsorvente ligado à enzima ( <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> )
ET <sub>A</sub>	Receptor da endotelina do tipo A
ET <sub>B</sub>	Receptor da endotelina do tipo B
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
GMP	Guanidina monofosfato
HAP	Hipertensão arterial pulmonar
HAPCCg	Hipertensão arterial pulmonar associada a cardiopatias congênitas

HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IC	Intervalo de confiança
ICAM	Molécula de adesão intercelular
IL-6	Interleucina-6
IL-10	Interleucina-10
InCor	Instituto do Coração
MAP	Proteína quinase ativada por mitógenos
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos
NT-pró BNP	Fragmento N-terminal do peptídeo cerebral natriurético
PAF	Fator ativador de plaquetas
PAI-1	Inibidor do ativador do plasminogênio
PCR	Proteína C reativa
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaqueta
POEMS	Síndrome com presença de polineuropatia, organomegalia, endocrinopatia, gamopatia monoclonal e alterações cutâneas
RANTES	<i>Regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted</i>
RC	Razão das chances
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucléico mensageiro
SES-SP	Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo
SpO <sub>2</sub>	Saturação periférica de oxigênio
TAPSE	Excursão sistólica do plano do anel tricúspide

TC6M	Teste de caminhada de seis minutos
TGF- $\beta$	Fator transformador do crescimento beta
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
t-PA	Ativador tecidual do plasminogênio
vWF:Ag	Antígeno do fator de Von Willebrand
5-HT – 5	Hidroxitriptamina, ou serotonina
5-HTT	Transportador da 5-hidroxitriptamina
5-HTR	Receptor da 5-hidroxitriptamina
$\gamma$ GT	Gamaglutamil transferase

## LISTA DE SÍMBOLOS

mmHg	Milímetros de mercúrio
mL/min/Kg	Mililitros por minuto por metro quadrado
L/min/m <sup>2</sup>	Litros por minuto por metro quadrado
mL	Mililitros
m	Metros
mg	Miligramas
U/dL	Unidades por decilitro
ng/mL	Nanogramas por mililitro
pg/mL	Picogramas por mililitro
mcg/mL	Microgramas por mililitro
%	Porcento
≥	Maior ou igual a
≤	Menor ou igual a
<	Menor que
>	Maior que
=	Igual a
N	Número

## RESUMO

BARRETO, A. C. **Estudo de marcadores de disfunção endotelial e de inflamação em portadores de hipertensão arterial pulmonar: implicações terapêuticas e prognósticas.** 2011. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

A disfunção microvascular, envolvendo células endoteliais, plaquetas e leucócitos, está presente na hipertensão arterial pulmonar (HAP), associando-se a risco aumentado de trombose e menor sobrevida. Estudos sobre disfunção microvascular são escassos em outras formas da doença que não a idiopática. Os objetivos do estudo foram: caracterizar a disfunção microvascular em diferentes formas de HAP através da dosagem de marcadores bioquímicos, avaliando possíveis correlações com índices de gravidade; investigar os efeitos da administração de rosuvastatina em níveis circulantes de marcadores de disfunção microvascular nesses pacientes; e investigar possível associação entre o nível plasmático dos marcadores e prognóstico. Foram incluídos sessenta pacientes: 14 com HAP idiopática ou hereditária, e 46 com HAP associada a cardiopatia congênita (HAPCCg) sem hipoxemia (N=18) ou com hipoxemia (N=28), com idades entre 13 e 60 anos. Foram dosados os níveis plasmáticos circulantes do antígeno do fator de von Willebrand (vWF:Ag), ativador tecidual do plasminogênio (t-PA); inibidor do ativador do plasminogênio (PAI-1), fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), proteína C reativa (PCR), selectina-P; interleucina-6 (IL-6); e interleucina-10 (IL -10), na condição basal e após 30, 60 e 180 dias de tratamento, por método imunoenzimático. Após randomização, administrou-se placebo (N=30) ou dose única oral diária (10mg) de rosuvastatina (N=30), por seis meses. Dados demográficos e funcionais como idade, distância caminhada em seis minutos, saturação periférica de oxigênio em repouso e após esforço, bem como hematócrito, também foram registrados. Pacientes com HAPCCg foram acompanhados por um período de 0,7 a 4,0 anos (mediana de 3,6 anos). Na condição basal, excetuando-se TNF- $\alpha$  e PCR, todas as proteínas apresentaram-se significativamente elevadas em relação aos controles ( $p < 0,001$ ), havendo correlação com índices de gravidade clínica. No estudo com rosuvastatina, houve redução significativa nos níveis de selectina-P em relação ao placebo ( $p = 0,037$ ), ao longo do tratamento. Houve melhora na saturação periférica de oxigênio após seis minutos de caminhada, no grupo estatina, em pacientes com HAPCCg com hipoxemia, em relação ao placebo. Considerando-se o período de acompanhamento, em portadores de HAPCCg, níveis plasmáticos persistentemente elevados do vWF:Ag (média de quatro determinações), acima do nível correspondente ao percentil 95 dos controles (139 U/d/L) associaram-se maior risco de morte (razão de risco 6,56, IC 95% 1,46 a 29,4,  $p = 0,014$ ), sem alteração após ajustamento para variáveis demográficas, funcionais e de tratamento, à análise multivariada. Assim, a disfunção microvascular está presente em indivíduos com HAP idiopática, hereditária ou associada a cardiopatias congênitas. Na HAP, o uso crônico de rosuvastatina em dose baixa associa-se à redução do nível circulante de selectina-P, e propicia aumento na

saturação periférica de oxigênio ao final do exercício, em indivíduos com HAPCCg e hipoxemia. Em indivíduos portadores de HAPCCg, níveis plasmáticos persistentemente elevados do vWF:Ag são indicativo de pior prognóstico.

**PALAVRAS-CHAVE:** Hipertensão pulmonar, cardiopatias congênitas, disfunção microvascular, inibidores de hidroximetilglutaril-CoA redutases, fator de von Willebrand, selectina-P



## ABSTRACT

BARRETO, A. C. **Markers of endothelial dysfunction and inflammatory mediators in pulmonary arterial hypertension: therapeutic and prognostic implications.** 2011. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Microvascular dysfunction, involving endothelial cells, platelets and leukocytes, is present in pulmonary arterial hypertension (PAH), and is associated to higher risk to thrombotic complications and mortality. Most data about microvascular dysfunction in PAH do not include other forms of the disease beyond idiopathic PAH. The present study was planned to measure plasma levels microvascular dysfunction markers in two different forms of PAH, and investigate possible correlations with indices of severity of the disease; to investigate the effects of chronic rosuvastatin administration versus placebo on the circulating levels of these markers; and to investigate possible associations between levels of these parameters and prognosis. Sixty patients (aged 13 to 60 years) were included, 14 with idiopathic or hereditary PAH, and 46 with congenital heart disease-associated PAH (CHDPAH), in the absence (N=18) or presence (N=28) of hypoxemia. Plasma levels of von Willebrand factor antigen (vWF:Ag), tissue-plasminogen activator (t-PA), plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), reactive C protein (RCP), P-selectin, interleukin-6 (IL-6), and interleukin-10 (IL-10) were measured before treatment and 30, 90, and 180 days on treatment using high-sensitivity enzyme-linked immunosorbent assay kits. Patients were randomly assigned to placebo (N=30) or a single oral dose of rosuvastatin (N=30), 10mg/day, for six months. Demographic and functional data such as age, six-minute walk distance, peripheral oxygen saturation at rest and at the end of the six-minute walk, as well as the hematocrit, were recorded. Patients with CHDPAH were followed-up for 0.7 to 4.0 years (median 3.6 years). At baseline, levels of all proteins (except TNF- $\alpha$  and RCP) were significantly increased in patients versus controls ( $p < 0,001$ ), and correlated significantly with indices of severity of the disease. P-selectin level was lower in the rosuvastatin group compared with placebo throughout the treatment ( $p = 0.037$ ). In hypoxemic CHDPAH patients, the peripheral oxygen saturation, at the end of the six-minute walk, was higher in the rosuvastatin group, compared with placebo. During the follow-up of patients with CHDPAH, an average vWF:Ag (mean of four determinations) above the level corresponding to the 95th percentile of controls (139 U/dL) was associated with a high risk of death (hazard ratio 6.56, 95% CI 1.46 to 29.4,  $p=0.014$ ). This was not modified after adjustment for demographic, functional and treatment-related variables in multivariate analysis. In conclusion, microvascular dysfunction is present in individuals with idiopathic, hereditary and the congenital heart disease-associated PAH. The chronic use of low-dose rosuvastatin is associated to reduction of circulating levels of P-selectin. In patients with CHDPAH with hypoxemia, rosuvastatin also increases peripheral oxygen saturation during exercise. In

CHDPAH patients, a sustained increase in plasma vWF:Ag is indicative of poor prognosis.

KEYWORDS: pulmonary hypertension, congenital heart disease, microvascular dysfunction, hydroxymethyl glutaryl CoA reductase inhibitors, von Willebrand factor, P-selectin

## 1. INTRODUÇÃO

---

### 1.1. Hipertensão pulmonar: conceito

A hipertensão pulmonar é a consequência hemodinâmica de alterações vasculares, mais arteriais que venosas, levando à redução luminal progressiva, cujo resultado é a elevação da resistência vascular pulmonar, com sobrecarga crescente imposta ao ventrículo venoso. O diagnóstico é estabelecido diante da observação, ao cateterismo cardíaco, de pressão média arterial pulmonar, em repouso e durante exercício, respectivamente, acima de 25 e 30 mmHg<sup>1</sup>. Algumas situações, entretanto, cursam com elevação pressórica originalmente em leito venoso e capilar. Assim, para a caracterização da doença como **hipertensão arterial pulmonar (HAP)**, é necessário o registro de pressão de encunhamento não superior a 15 mmHg<sup>2</sup>.

### 1.2. Classificação

Sendo a hipertensão pulmonar consequência de múltiplas etiologias, a classificação atualmente proposta procura destacar as doenças a elas relacionadas, tornando obrigatório o seu diagnóstico. Esta classificação teve sua versão atualizada em 2008, no Quarto Congresso Mundial em Hipertensão Pulmonar, sediado na cidade de Dana Point, nos Estados

Unidos da América<sup>3</sup> (Quadro 1), e compreende as seguintes categorias: 1) HAP, na qual estão incluídas as formas mais estudadas da doença, do ponto de vista etiopatogênico, clínico e terapêutico (a maioria das subcategorias diagnósticas contidas nesse item possui características semelhantes como, por exemplo, os achados histopatológicos); 2) hipertensão pulmonar por doença do coração esquerdo, que engloba as formas de acometimento originalmente venocapilar (inclui-se nessa categoria a disfunção ventricular esquerda, tanto na sua forma sistólica como diastólica, e as lesões valvares); 3) hipertensão pulmonar por doenças pulmonares e/ou hipóxia, reunindo as enfermidades respiratórias crônicas que podem cursar com alterações hemodinâmicas; 4) hipertensão pulmonar crônica tromboembólica, essencialmente relacionada a episódios de tromboembolismo. Ressalte-se que, mesmo na primeira categoria (HAP), lesões trombóticas (trombose *in situ*) podem ser encontradas na circulação pulmonar; 5) hipertensão pulmonar com mecanismos multifatoriais não esclarecidos, estando incluídos nesse item distúrbios hematológicos, sistêmicos e metabólicos.

**Quadro 1. Classificação atual da hipertensão pulmonar****1. Hipertensão arterial pulmonar (HAP)**

- 1.1. HAP idiopática
- 1.2. Hereditária
  - 1.2.1. BMPR2
  - 1.2.2. ALK1, endogлина (com ou sem telangiectasia hemorrágica hereditária)
  - 1.2.3. Desconhecida
- 1.3. Induzida por drogas e toxinas
- 1.4. Associada a
  - 1.4.1. Doenças do tecido conectivo
  - 1.4.2. Infecção pelo HIV
  - 1.4.3. Hipertensão portal
  - 1.4.4. Cardiopatias congênitas
  - 1.4.5. Esquistossomose
  - 1.4.6. Anemia hemolítica crônica
- 1.5. Hipertensão pulmonar persistente do recém-nascido
- 1'. Doença veno-oclusiva pulmonar e/ou hemangiomatose capilar pulmonar

**2. Hipertensão pulmonar por doença do coração esquerdo**

- 2.1. Disfunção sistólica
- 2.2. Disfunção diastólica
- 2.3. Doença valvar

**3. Hipertensão pulmonar por doenças pulmonares e/ou hipóxia**

- 3.1. Doença pulmonar obstrutiva crônica
- 3.2. Doença pulmonar intersticial
- 3.3. Outras doenças pulmonares com padrão restritivo e obstrutivo misto
- 3.4. Distúrbios respiratórios do sono
- 3.5. Distúrbios com hipoventilação alveolar
- 3.6. Exposição crônica a altitudes elevadas
- 3.7. Anormalidades de desenvolvimento

**4. Hipertensão pulmonar crônica tromboembólica****5. Hipertensão pulmonar com mecanismos multifatoriais não esclarecidos**

- 5.1. Distúrbios hematológicos: distúrbios mieloproliferativos, esplenectomia
- 5.2. Distúrbios sistêmicos: sarcoidose, histiocitose pulmonar de células de Langerhans: linfangioleiomiomatose, neurofibromatose, vasculite
- 5.3. Distúrbios metabólicos: doença de depósito do glicogênio, doença de Gaucher, distúrbios da tireóide
- 5.4. Outros: obstrução tumoral, mediastinite fibrosante, insuficiência renal crônica em diálise

### 1.3. Disfunção microvascular

Substâncias produzidas pelo endotélio e em sua proximidade são responsáveis pela manutenção do equilíbrio do tônus vascular, e por eventos que inibem a proliferação celular e induzem a apoptose, favorecendo um estado de vasodilatação e inibição da trombose. A disfunção endotelial pode ser entendida como um conjunto de alterações nesses mecanismos reguladores, trazendo como consequência a tendência à vasoconstrição, proliferação celular, supressão da apoptose e trombose.

Disfunção microvascular é um conceito mais amplo em relação à disfunção endotelial, incluindo a participação patológica de outros elementos, como por exemplo, leucócitos, plaquetas e substâncias presentes na circulação. Assim, ao longo do texto, o termo *disfunção endotelial* estará relacionado a situações que envolvem o desequilíbrio funcional e bioquímico especificamente do endotélio, e *disfunção microvascular* àquelas com envolvimento de componentes além deste.

Há tendência no sentido de se dar preferência ao termo *disfunção microvascular* em relação a *disfunção endotelial*, talvez por sua maior abrangência.<sup>4,5</sup> Várias condições patológicas cursam com desequilíbrio na regulação da microcirculação. No diabetes do tipo 2, a hiperglicemia favorece o aumento do estresse oxidativo (reduzindo a biodisponibilidade de substâncias vasodilatadoras) e a liberação de mediadores inflamatórios e moléculas de adesão. De forma semelhante, na hipertensão arterial

sistêmica, estudos sugerem que haja produção exagerada de ânion superóxido e déficit na geração de substâncias vasodilatadoras, favorecendo um estado de vasoconstrição.<sup>6</sup> Na nefropatia crônica, a retenção de substâncias tóxicas e alterações metabólicas podem induzir a expressão de moléculas inflamatórias e de adesão, e o estresse oxidativo, sendo a doença considerada um “estado de inflamação sistêmica”.<sup>7</sup> Na aterosclerose, há evidências de que a disfunção microvascular ocorre precocemente, funcionando como ponte entre os fatores de risco cardiovascular e a aterogênese. Além do déficit na produção de vasodilatadores, há o envolvimento de mecanismos inflamatórios e imunológicos, com células T e macrófagos contribuindo para a formação da placa aterosclerótica, e lipoproteínas de baixa densidade reconhecidas como autoantígenos.<sup>8</sup>

Na HAP, a disfunção microvascular se caracteriza pela “perturbação” do equilíbrio do endotélio e conseqüente interação com elementos circulantes (celulares ou não),<sup>9-13</sup> não estando restrita, em absoluto, às alterações que ocorrem na região mais interna dos vasos.

#### **1.4. Hipertensão arterial pulmonar**

A primeira categoria da hipertensão pulmonar, como citado anteriormente, é a mais exaustivamente estudada. Define-se HAP pela presença de pressão média em artéria pulmonar com valores superiores a



25 mmHg, resistência vascular pulmonar acima de 3 unidades Wood, e pressão de encunhamento igual ou inferior a 15 mmHg.<sup>2</sup> Pacientes classificados nessa categoria podem pertencer a cinco subcategorias (Quadro 1), que incluem diagnósticos antes considerados próximos do ponto de vista fisiopatológico, e até mesmo histopatológico.<sup>14</sup> Entretanto, sabe-se atualmente que tais diagnósticos são distintos em vários aspectos. Assim, por exemplo, há a forma associada a cardiopatias congênitas, cuja evolução leva à hipoxemia progressiva, por inversão de fluxo sanguíneo pelo defeito cardíaco, das cavidades direitas para a esquerda. Por outro lado, há a HAP associada às doenças do tecido conectivo, enfatizando-se os portadores de esclerose sistêmica. Nestes, tanto os mecanismos proliferativos encontrados na HAP, como a fibrose em si, podem concorrer para o aumento da pressão intravascular.<sup>15</sup> Outra forma importante da doença, principalmente no Brasil, é a relacionada a doenças infecto-parasitárias, como a infecção pelo vírus HIV e a esquistossomose. Ambas têm apresentação clínica e achados histológicos semelhantes à forma idiopática<sup>16</sup>, tornando imperativa uma investigação clínica rigorosa. Além disso, a hipertensão portal, por si, pode cursar com HAP.

A HAP é considerada hereditária em pacientes com histórico familiar ou componente genético presente. Este se encontra bem estabelecido, com herança autossômica dominante, penetrância de 10 a 20% e antecipação genética.<sup>17</sup> O gene que codifica o BMPR2 (*bone morphogenetic protein receptor 2*) encontra-se com mutação em 70% dos pacientes com histórico familiar para HAP.<sup>18,19</sup> Este gene é um receptor da família TGF- $\beta$

(*transforming growth factor*), cujo funcionamento normal está relacionado a efeitos antiproliferativos e pró-apoptóticos. O mau funcionamento do receptor levaria à perda desses efeitos, com progressivo remodelamento dos vasos. A avaliação dos familiares de um portador da doença é enfaticamente recomendada, principalmente nos casos de pacientes pediátricos, em vista da 'antecipação genética'. Esta se caracteriza pelo início da doença em idades mais precoces nas sucessivas gerações, com caráter mais agressivo. Quando, após minuciosa avaliação diagnóstica, nenhuma doença ou fator desencadeante é encontrado, a HAP é considerada **idiopática**.

Quanto à doença veno-oclusiva e à hemangiomatose capilar pulmonar, ambas são formas histopatológicas de apresentação, não necessariamente se encontrando de maneira isolada. Assim, há pacientes portadores de doença veno-oclusiva com apresentação familiar. Por outro lado, a hemangiomatose capilar pode estar associada a outras doenças, como cardiopatias congênitas e a forma hereditária da HAP. Assim, a classificação diagnóstica (com destaque para a HAP) tem sido útil, até o presente, na orientação do tratamento.

#### **1.4.1. Aspectos epidemiológicos**

A HAP é uma doença rara, com incidência em elevação ao longo dos últimos anos como consequência da melhora em seu diagnóstico. Estima-se

que ocorra em torno de 15 casos por milhão de pessoas.<sup>20</sup> A forma idiopática afeta mais mulheres que homens, numa proporção de 1,7:1, sendo mais comum entre a terceira e quarta décadas da vida.<sup>20,21</sup> Atinge, anualmente, cerca de seis casos por milhão em todo o mundo.<sup>20</sup> Antes do advento das novas drogas disponíveis, a expectativa de vida para essa forma da doença era inferior a três anos, e menos de dez meses em crianças.<sup>21,22</sup> Dados sobre pacientes com hipertensão portal secundária à esquistossomose indicam que a prevalência de HAP nesses casos é em torno de 12%.<sup>23</sup> A prevalência da HAP em cardiopatias congênitas (HAPCCg), na Europa e América do Norte, varia entre 1,6 e 12,5 casos por milhão de adultos, 25 a 50% destes, portadores da síndrome de Eisenmenger.<sup>24</sup> Na América Latina e no Brasil, em áreas não endêmicas para esquistossomose, as formas idiopática e associada às cardiopatias congênitas aparecem, no total de casos de HAP, com porcentagens que variam entre 30% e 50%, sendo, portanto, as mais prevalentes. Em regiões endêmicas, porém, a forma associada à esquistossomose aproxima-se de 40% dos casos.<sup>25</sup>

#### **1.4.2. Mecanismos envolvidos**

O aumento do tônus vascular e o remodelamento da parede arterial e arteriolar pulmonar são o resultado da ação de mecanismos complexos, que

incluem fatores genéticos, celulares, moleculares, inflamatórios e trombóticos. O avanço no conhecimento desses mecanismos, principalmente com relação a alterações genéticas e ao equilíbrio entre vasoconstrição e vasodilatação, permitiu uma compreensão mais ampla do desenvolvimento da doença, assim como melhora no tratamento a ser oferecido. A seguir, são descritos os principais mecanismos envolvidos na gênese da doença.

#### **1.4.2.1. Desequilíbrio entre vasodilatadores e vasoconstritores**

Substâncias produzidas no endotélio são os principais reguladores do tônus vascular pulmonar, além de interferir em eventos que promovem proliferação celular e apoptose. A disfunção endotelial na HAP se caracteriza pela perda do equilíbrio na produção desses reguladores, resultando em constrição e obstrução progressiva dos vasos pulmonares. O óxido nítrico, produzido nas células endoteliais através da enzima óxido nítrico sintase endotelial, é um vasodilatador potente, e também exerce função antiproliferativa.<sup>26</sup> Sua sinalização é mediada principalmente via GMP cíclico (monofosfato de adenosina cíclico), cuja degradação ocorre por conta da enzima fosfodiesterase-5.<sup>27</sup> Pacientes com HAP têm biodisponibilidade de óxido nítrico diminuída, provavelmente devido expressão reduzida da enzima

óxido nítrico sintase endotelial<sup>28</sup> ou inibição de sua atividade enzimática.<sup>29,30</sup> Outra substância relevante é a prostaciclina, que além de vasodilatador, tem ação antiproliferativa nas células musculares lisas dos vasos pulmonares, e antiplaquetária.<sup>31</sup> Pacientes com HAP têm expressão reduzida da prostaciclina.<sup>32</sup>

Por outro lado, há o aumento de vasoconstritores como a serotonina<sup>33</sup> e o tromboxane A<sub>2</sub>,<sup>34</sup> citados mais adiante, e a endotelina-1. Esta é produzida predominantemente pela célula endotelial, com ação mitogênica e inflamatória sobre as células musculares lisas<sup>35-37</sup>. A ligação da endotelina-1 aos seus receptores aumenta os níveis de cálcio intracelular e outras moléculas sinalizadoras, resultando em vasoconstrição prolongada e proliferação.<sup>38</sup> Com efeito, antagonistas de receptores de endotelina têm sido utilizados como ferramenta terapêutica na HAP.

Algumas proteínas-quinase intracelulares foram identificadas como tendo papel no controle do tônus vascular em músculo liso. A via da RhoA/ rho-quinase exerce papel no processo de vasoconstrição por inibir a fosfatase de cadeia leve da miosina. Esta, em condições fisiológicas, promoveria vasodilatação. Além disso, a rho-quinase também participa da vasoconstrição provocada por vários agentes envolvidos na patogênese da HAP, como a serotonina, endotelina-1 e tromboxane A<sub>2</sub>.<sup>39</sup> Assim sendo, inibidores de rho-quinase têm sido propostos como droga no tratamento da HAP.

#### 1.4.2.2. Disfunção dos canais iônicos

Nas células musculares lisas arteriais pulmonares, o aumento do cálcio intracelular, com despolarização da membrana, resulta em vasoconstrição.<sup>40</sup> Alterações na expressão, ou função reduzida de canais iônicos, poderiam levar a aumento sustentado do cálcio intracelular. Verificou-se que células musculares lisas de pacientes com HAP idiopática apresentam expressão reduzida do RNAm correspondente às subunidades dos canais  $K_v$ .<sup>41</sup> Isto levaria a um decréscimo nas correntes de potássio, permitindo a entrada de cálcio na célula, com vasoconstrição pulmonar sustentada. Há também a hipótese da participação de mecanismos “redox” na célula muscular lisa, levando à vasoconstrição. Em condições normais, a geração de espécies reativas de oxigênio pelas mitocôndrias manteria um “estado oxidado” do citosol, com canais de potássio permanecendo abertos. Em modelos de hipertensão pulmonar induzida por hipóxia, o transporte de elétrons mitocondrial está diminuído, bem como a geração de espécies reativas de oxigênio, resultando em condição “reduzida” do citosol, fechamento dos canais de potássio e despolarização da membrana celular.<sup>42</sup> Outra linha de investigação sugere o envolvimento do citocromo P450 na vasoconstrição pulmonar, pois em modelos animais, sua inibição acarreta redução nas correntes de potássio.<sup>42</sup>

#### **1.4.2.3. Alterações em receptores da família TGF- $\beta$ , favorecendo proliferação celular**

A presença de mutação genética e/ou histórico familiar, caracteriza a forma hereditária da HAP. Nesses casos, como citado anteriormente, encontram-se mutações no gene que codifica o BMPR2<sup>40,43,44</sup>, membro da superfamília TGF- $\beta$ . Este receptor faz parte de um complexo heterodimérico na superfície celular, que se liga a citocinas como TGF- $\beta$ , BMP e ativina, propagando a sinalização para o interior.<sup>45</sup> Em condições fisiológicas, está envolvido no processo de diferenciação celular e apoptose<sup>46</sup>. A sinalização defectiva pode levar à perda da função normal, com susceptibilidade à proliferação celular e à supressão da apoptose em músculo liso vascular pulmonar.<sup>47</sup> Mais raramente, são encontradas mutações na quinase ativina-símile do tipo 1 (ALK-1), ou na endogлина, também membros da família TGF- $\beta$ , relacionados à HAP que se manifesta na telangiectasia hemorrágica hereditária.<sup>48</sup>

#### **1.4.2.4. Plaquetas e serotonina**

Sugere-se que pacientes com HAP apresentam ativação plaquetária endógena. Isto se deve à observação de redução no número de plaquetas

circulantes, e níveis elevados de  $\beta$ -tromboglobulina<sup>49</sup>, substância liberada na fase de secreção. Esta ativação favoreceria a formação de agregados celulares na circulação<sup>50</sup>, trombose, e também promoveria a liberação de agentes mitogênicos e vasoconstritores como o tromboxane A<sub>2</sub>.<sup>34</sup> Também são liberados fatores de crescimento como PDGF (*platelet derived growth factor*), EGF (*endothelial growth factor*) e TGF- $\beta$ , todos com potencial efeito mitogênico em células musculares lisas vasculares, fibroblastos e células endoteliais.<sup>51</sup>

A serotonina, ou 5-hidroxitriptamina (5-HT), componente dos grânulos densos das plaquetas, apresenta-se com níveis plasmáticos elevados em pacientes com HAP idiopática.<sup>33</sup> Nas células musculares lisas dos vasos pulmonares, a ligação da serotonina ao transportador 5-HTT inicia eventos envolvendo a formação de espécies reativas de oxigênio e a ativação da via das MAPP quinases, resultando na expressão de genes envolvidos em hipertrofia e proliferação celular.<sup>52</sup> A ligação ao seu receptor, 5-HTR, induz a liberação de cálcio intracelular, a partir do retículo endoplasmático, e consequente vasoconstrição.<sup>53</sup> As células endoteliais de pacientes com HAP geram mais serotonina. Além disso, em portadores de HAP idiopática, as células musculares lisas arteriais pulmonares têm expressão aumentada do 5-HTT, com proliferação mais rápida em resposta à serotonina.<sup>54</sup> Alguns indivíduos com HAP idiopática grave apresentam polimorfismo na região promotora do gene que codifica o 5-HTT, com aumento de sua expressão.<sup>55</sup> O achado de níveis plasmáticos elevados de serotonina em indivíduos com HAP idiopática, mesmo após transplante pulmonar,<sup>33</sup> sugere sua



participação como elemento causal no processo de remodelamento vascular pulmonar.

#### **1.4.2.5. Trombose**

O endotélio vascular pulmonar produz substâncias com funções antitrombóticas, antiaderentes e anticoagulantes. Na HAP, a perda progressiva dessas funções leva à predominância dos mecanismos que facilitam a coagulação e a adesão celular, e inibem a fibrinólise. A trombosmodulina, o ativador tecidual do plasminogênio (t-PA), seu inibidor (PAI-1), a selectina-P e o antígeno do fator de von Willebrand (vWF:Ag), são substâncias de origem endotelial que se encontram alteradas na HAP. Os níveis plasmáticos de trombosmodulina, um proteoglicano de superfície envolvido na inativação dos fatores V e VIII da coagulação sanguínea, estão reduzidos na HAP.<sup>56,57</sup> Pacientes com HAPCCg e hipoxemia, portadores da assim chamada síndrome de Eisenmenger (descrita mais adiante), apresentam caracteristicamente disfunção endotelial com acentuada tendência à trombose. A hipóxia promove a liberação de moléculas de adesão, como o fator de von Willebrand e a selectina-P, a partir dos corpúsculos de Weibel-Palade, nas células endoteliais.<sup>58</sup> A hipóxia também induz a expressão do RNAm e da proteína do PAI-1,<sup>59</sup> além de suprimir a expressão da trombosmodulina.<sup>60</sup> Há relato de ocorrência de trombose

arterial pulmonar em 35% dos pacientes com a síndrome de Eisenmenger.<sup>61</sup> Além disso, níveis plasmáticos aumentados do fator de von Willebrand parecem ter implicações prognósticas.<sup>62</sup>

#### 1.4.2.6. Inflamação

A HAP é uma complicação encontrada em várias doenças inflamatórias, como o *lupus eritematosus* sistêmico e a esclerodermia,<sup>63</sup> além de estar associada a enfermidades de caráter imune, como a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana<sup>63</sup> e a síndrome POEMS.<sup>64</sup> O achado de níveis plasmáticos elevados de citocinas inflamatórias, como a interleucina-1 e interleucina-6, em pacientes com HAP idiopática,<sup>65</sup> reforça o caráter inflamatório da doença. Além disso, há elevação de quimiocinas como a fractalcina,<sup>66</sup> MCP-1 (proteína quimiotática de monócitos)<sup>67</sup> e RANTES (*regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted*).<sup>68</sup> Esta, além de exercer função no recrutamento de leucócitos, induz a ativação da endotelina-1, aumentando sua atividade mitogênica e vasoconstritora.<sup>69</sup> Pacientes com a forma idiopática da doença também apresentam níveis elevados de anticorpos antinucleares,<sup>70</sup> e prevalência de alelos de antígeno de histocompatibilidade presentes em doenças autoimunes.<sup>71</sup>

### **1.4.3. Hipertensão arterial pulmonar idiopática, hereditária e associada a cardiopatias congênitas**

Há semelhanças e diferenças entre a HAP idiopática, hereditária e a forma associada a cardiopatias congênitas. Em pacientes com a forma hereditária, observa-se transmissão autossômica dominante, penetrância de 10 a 20% e antecipação genética, como citado anteriormente. Mutações podem ocorrer no gene que codifica o BMPR2, além de outros dois membros da família TGF- $\beta$  (ALK-1 e endoglin). Por outro lado, na HAPCCg, o envolvimento genético parece menos evidente até o momento.

Quanto à histopatologia, a HAP idiopática e a hereditária se assemelham à forma associada a cardiopatias congênitas. Em fases iniciais da doença observa-se hipertrofia das células da camada média das arteríolas pulmonares, com aumento de sua espessura, seguindo-se a proliferação intimal e oclusão da luz do vaso. Em situações mais avançadas, desenvolvem-se as lesões mais complexas, como as plexiformes e angiomatóides.<sup>72-75</sup> Além disso, pode ocorrer a formação local de trombos (trombose *in situ*). Além de acometerem artérias pulmonares periféricas, lesões trombóticas oclusivas também podem ocorrer nos grandes ramos hilares. Na forma idiopática, estudos comprovam a presença de componente inflamatório nas lesões vasculares.<sup>76</sup> Entretanto, o envolvimento deste na HAPCCg ainda não está bem esclarecido.<sup>77,78</sup>

Do ponto de vista clínico, tanto as formas idiopática e hereditária como a associada a cardiopatias congênitas, podem ter início em qualquer idade, sendo mais comum na terceira e quarta décadas de vida. A evolução natural da doença, porém, tem caráter distinto.<sup>79</sup> Pacientes com HAPCCg apresentam evolução mais insidiosa. Nestes, a progressão da doença cursa com elevação da resistência vascular pulmonar a níveis suprasistêmicos. Ocorre então, inversão do fluxo sanguíneo, pelo defeito cardíaco, das cavidades direitas para a esquerda. A partir daí, instala-se a hipoxemia crônica, provocando consequências como hiperviscosidade sanguínea e maior risco para sangramentos e trombose, incluindo eventos cerebrovasculares.<sup>80,81</sup> Apesar de poder ocorrer hipoxemia em idades mais precoces, geralmente a sintomatologia surge na idade adulta. Assim, muitos pacientes portadores de HAPCCg ainda não desenvolveram a síndrome de Eisenmenger. A HAPCCg, portanto, não pode ser entendida como sinônimo de síndrome de Eisenmenger. Em geral, e reconhecidamente com exceções, os pacientes com cardiopatia congênita têm sobrevida mais longa em relação a todas as outras formas de HAP, com relato de sobrevida de mais de 70% em 20 anos.<sup>82</sup> Nas formas idiopática e hereditária, a sintomatologia tem progressão rápida. Os pacientes evoluem para falência ventricular direita progressiva e sobrevida reduzida. Estudos em pacientes com HAP idiopática acompanhados em sua história natural relatam sobrevida de 77%, 69% e 35%, em um, dois e três anos, respectivamente.<sup>79</sup>

Na HAPCCg, os defeitos cardíacos promovem aumento crônico de fluxo e pressão nos vasos pulmonares, sendo estas, alterações

hemodinâmicas reconhecidamente desencadeadoras do processo de lesão vascular. A correção precoce do defeito cardíaco pode possibilitar a melhora das alterações até sua involução completa. Este fato confere à HAPCCg a característica única, dentro da categoria HAP, de possibilidade de restituição da completa normalidade mediante tratamento apropriado. Não há relatos, porém, de reversão das lesões vasculares em pacientes com as formas idiopática ou hereditária, mesmo após a instituição de tratamento específico.

### **1.5. Desenvolvimento de novos recursos terapêuticos**

O conhecimento dos mecanismos envolvidos na doença tem possibilitado o desenvolvimento de recursos terapêuticos mais específicos. São disponíveis atualmente medicamentos que pertencem a três classes farmacológicas distintas, com ação vasodilatadora e provavelmente antiproliferativa: os prostanóides, os antagonistas de receptor de endotelina e os inibidores da enzima fosfodiesterase-5. Pesquisas seguem em andamento, no sentido do desenvolvimento de novos recursos farmacológicos. Algumas moléculas encontram-se ainda em fase inicial de investigação, porém outras deverão ser muito brevemente disponibilizadas para uso.

### 1.5.1. Prostanóides

O epoprostenol é um análogo da prostaciclina, administrado na forma intravenosa e considerado o tratamento padrão-ouro para pacientes com HAP. Sua infusão contínua tem função antiplaquetária,<sup>83</sup> reduz a resistência vascular pulmonar e aumenta o débito cardíaco, melhorando assim, a capacidade física e a sobrevida.<sup>83</sup> Devido à breve estabilidade do epoprostenol, custo elevado e dificuldades na administração intravenosa contínua, prostanóides com outras formas de uso têm sido desenvolvidos. O treprostnil, aprovado para uso nos Estados Unidos e União Européia, é administrado de forma subcutânea com infusão contínua. Estudos clínicos comprovam sua eficácia em pacientes com HAP idiopática, associada a doenças do tecido conectivo e a cardiopatias congênitas, com melhora nos sintomas, capacidade física e índices hemodinâmicos.<sup>84</sup> A forma inalatória iloprostá, aprovada para uso nos Estados Unidos, Europa, Austrália e Brasil, mostrou-se eficaz em melhorar variáveis hemodinâmicas e capacidade física de pacientes portadores de HAP idiopática, hereditária, associada a doenças do tecido conectivo e a doença tromboembólica crônica.<sup>85</sup> A beraprostá, análogo de administração oral, é aprovada para uso apenas no Japão. Estudos relatam melhora na capacidade física de pacientes com as formas idiopática, associada a cardiopatias congênitas e associada a colagenoses. Sua eficácia, porém, se mantém apenas nos primeiros meses de tratamento.<sup>86</sup>

### **1.5.2. Antagonistas de receptores de endotelina**

A bosentana é o principal representante dessa classe de medicamentos. É antagonista de receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> de endotelina, o mais potente vasoconstritor endógeno que se conhece, com ação mitogênica comprovada.<sup>35-37</sup> Estudos clínicos realizados em pacientes com HAP idiopática, associada a doença do tecido conectivo,<sup>87</sup> e a cardiopatias congênitas,<sup>88</sup> demonstraram eficácia no tratamento, com melhora na capacidade física e nos índices hemodinâmicos. Além disso, estudo realizado em pacientes com a forma idiopática e associada à esclerodermia, em seguimento de 3 anos, relatou melhora na sobrevida.<sup>89</sup> A sitaxsentana e a ambrisentana são antagonistas seletivos de receptores ET<sub>A</sub> de endotelina, com estudos demonstrando efeitos benéficos na capacidade funcional e variáveis hemodinâmicas dos pacientes.<sup>90,91</sup>

### **1.5.3. Inibidores da enzima fosfodiesterase-5**

A base racional para a inibição da enzima fosfodiesterase-5, em células musculares lisas de vasos pulmonares, é a maior disponibilização do nucleotídeo monofosfato de adenosina cíclico (GMP cíclico), com ação miorelaxante, e efeitos antimitogênicos.<sup>92</sup> A sildenafil, representante mais

estudado desta categoria de drogas, teve eficácia demonstrada para uso em HAP idiopática, associada a doenças do tecido conectivo e a cardiopatias congênitas. Além de melhora na capacidade funcional e nos índices hemodinâmicos após 12 semanas,<sup>93</sup> há relatos de efeito benéfico mais sustentado. Estudos não controlados, realizados na Unidade Clínica de Cardiologia Pediátrica e Cardiopatias Congênitas do Adulto (InCor – HCFMUSP), sugerem que a resposta terapêutica pode ser mantida por períodos mais longos, como um a dois anos.<sup>94,95</sup> Semelhantemente, a tadalafila melhora a capacidade física e as alterações hemodinâmicas em cerca de 50% dos pacientes.<sup>96</sup>

#### **1.5.4. Novas perspectivas de tratamento medicamentoso**

Várias linhas de pesquisa clínica para tratamento da HAP estão atualmente em curso, bem como estudos com drogas utilizadas em modelos animais, com boas perspectivas de eficácia. Drogas antiproliferativas, já utilizadas no tratamento do câncer, como inibidores de tirosina-quinases, são potenciais medicamentos para o tratamento da HAP.<sup>97</sup> Entretanto, estão associadas a risco elevado de eventos adversos graves. Estudo recente com o imatinibe, inibidor da atividade tirosina-quinase ligada ao receptor do PDGF, mostrou reversão do remodelamento vascular pulmonar em modelo animal.<sup>98</sup> Em pacientes com HAP grave, já em uso de drogas aprovadas



para a doença, sua associação promoveu melhora na capacidade física e índices hemodinâmicos.<sup>99</sup> Semelhantemente, o uso do inibidor de rho-quinase fasudil foi seguido de discreta melhora hemodinâmica em pacientes.<sup>100</sup> Em fase final de desenvolvimento encontra-se o riociguat, droga de administração oral, que estimula diretamente a enzima guanilato-ciclase. Exerce seu efeito vasodilatador de forma independente e sinérgica ao óxido nítrico, com melhora nos parâmetros hemodinâmicos, em estudo preliminar.<sup>101</sup>

Encontram-se em investigação clínica os inibidores de recaptção da serotonina, como a fluoxetina, sugerindo-se redução no risco de morte.<sup>102</sup> O uso do imunossupressor micofenolato mofetil tem se demonstrado útil na prevenção da indução de hipertensão pulmonar, em modelo animal.<sup>103</sup> O dicloroacetato, um inibidor da piruvato desidrogenase quinase mitocondrial, foi capaz de restaurar o metabolismo oxidativo em células musculares lisas de vasos pulmonares, em modelos animais, demonstrando efeito antiproliferativo e pró-apoptótico.<sup>104</sup>

Outra classe de drogas, relacionada à modulação da função endotelial e angiogênese, é a das estatinas. Estudos em modelo animal demonstram efeitos antiproliferativos e pró-apoptóticos da sinvastatina, em lesões de vasos pulmonares.<sup>105-107</sup> Observações preliminares, com pequeno número de pacientes, sugeriram eficácia, com melhora na capacidade física e índices hemodinâmicos.<sup>108</sup> Entretanto, em estudo recente com pacientes portadores de várias formas de HAP, a associação de sinvastatina ao tratamento convencional foi seguida apenas de discreta e transitória redução

na massa ventricular direita e nos níveis plasmáticos do NT-pró BNP. Não se observou, porém, melhora na capacidade física, índices hemodinâmicos e parâmetros laboratoriais adicionais.<sup>109</sup>

### **1.6. Marcadores de disfunção microvascular em HAP**

Na HAP, a disfunção microvascular está demonstrada. Isto se comprova por alterações nos níveis circulantes de substâncias produzidas e liberadas pelo endotélio, quando ativado. Entre elas estão a trombosmodulina,<sup>57</sup> o ativador tecidual do plasminogênio (t-PA), seu inibidor (PAI-1), a selectina-P,<sup>57</sup> o fator de von Willebrand,<sup>62</sup> o óxido nítrico<sup>28</sup> e a prostaciclina.<sup>32</sup> Com relação às plaquetas, estudos realizados na Unidade Clínica de Cardiologia Pediátrica e Cardiopatias Congênitas do Adulto (InCor – HCFMUSP) têm sugerido a ocorrência de um estado de ativação endógena crônica.<sup>49,50</sup> Quanto aos elementos inflamatórios, há várias evidências de sua presença e participação na HAP.<sup>65-68,110</sup>

As três classes de drogas atualmente usadas no tratamento da HAP, ou seja, os análogos da prostaciclina, os antagonistas de receptores de endotelina e os inibidores da enzima fosfodiesterase-5, têm efeitos sobre a disfunção microvascular (endotelial). Algumas das drogas mencionadas anteriormente como ‘em desenvolvimento’, também possuem esta propriedade. Sendo a disfunção microvascular um evento importante na

vasoconstrição e no processo de remodelamento vascular pulmonar, é justo propor que esteja relacionada também ao prognóstico. Neste sentido, passaria a ser alvo de intervenções terapêuticas.

### **1.7. Prognóstico em HAP**

Por tratar-se de doença de caráter agressivo e de prognóstico reservado, sem tratamento específico até há poucos anos, o surgimento de terapêutica específica trouxe nova perspectiva, tanto para pacientes, quanto para clínicos que lidam com a doença em sua prática diária. Atualmente, recomenda-se que sejam estabelecidas estratégias de tratamento que, além de otimizá-lo, podem estar associadas a melhor sobrevida. É importante salientar que as metas relacionadas ao tratamento foram estabelecidas, em sua maioria, para pacientes com a forma idiopática, hereditária, associada a doenças do tecido conectivo, e ao uso de anorexígenos, devendo haver cuidado ao extrapolá-las para outras formas da doença. Espera-se que o tratamento proposto promova a melhora funcional, o incremento da pressão sistêmica como expressão de aumento no débito cardíaco, e a redução nas alterações hemodinâmicas ligadas à circulação pulmonar.

### 1.7.1. Marcadores funcionais

Estudos sugerem que a classe funcional seja um preditor de mortalidade, com risco elevado de óbito para pacientes em classe III ou IV.<sup>111</sup> Assim, o paciente com resposta favorável ao tratamento deve apresentar melhora, para classe funcional I ou II, ou se manter em classe II durante a evolução da doença. Estudos demonstram que pacientes com bom desempenho no teste de seis minutos de caminhada apresentam maior sobrevida.<sup>112,113</sup> O alcance da distância de 380 metros, no curso do tratamento, está relacionado a melhor prognóstico. De forma semelhante, medidas de pressão arterial sistólica durante esforço acima de 120 mmHg, e consumo de oxigênio acima de 10,4 mL/min/Kg, ao exame espirométrico, foram associados a melhor sobrevida.<sup>114,115</sup> Medidas hemodinâmicas, como pressão de átrio direito igual ou inferior a 10 mmHg, e índice cardíaco igual ou superior a 2,5 L/min/m<sup>2</sup>, são recomendados por alguns como meta durante o tratamento<sup>116</sup>. Entretanto, os resultados de estudos que correlacionam valores hemodinâmicos e sobrevida ainda são contraditórios.<sup>21,117</sup> Dados ecocardiográficos, como a área do átrio direito, o índice de desempenho do ventrículo direito (índice Tei) e a excursão sistólica do plano do anel tricúspide (TAPSE), são sugeridos como preditores de sobrevida em pacientes com HAP.<sup>118</sup>

### 1.7.2. Marcadores biológicos

Paralelamente às variáveis funcionais, esforços têm sido feitos na caracterização de 'marcadores biológicos', e sua importância prognóstica na HAP. Considera-se um elemento biológico como marcador, quando suas alterações estão associadas a eventos importantes, como morte, sendo essa associação comprovada por estudos prospectivos. Diversas substâncias circulantes, alteradas em pacientes com HAP, têm sido sugeridas como potenciais marcadores biológicos, com significado diagnóstico e prognóstico. São substâncias relacionadas à disfunção endotelial e plaquetária, insuficiência cardíaca, inflamação, estresse oxidativo e lesão de cardiomiócitos. Apresentam-se, a seguir, as substâncias circulantes que têm sido melhor caracterizadas como marcadores biológicos em HAP.

Os peptídeos natriuréticos atrial (ANP) e cerebral (BNP) são substâncias liberadas dos cardiomiócitos em resposta à sobrecarga ventricular, pressórica ou volumétrica.<sup>119</sup> Em estudo com pacientes portadores de HAP idiopática, o nível plasmático do BNP foi preditor independente de mortalidade.<sup>120</sup> De forma semelhante, o nível de seu fragmento N-terminal (NT pró-BNP) também apresenta correlação com a sobrevida.<sup>121</sup> É o marcador mais utilizado atualmente na prática clínica, tanto para avaliar gravidade da doença, como resposta à terapêutica. As troponinas, proteínas reguladoras dos filamentos de actina no músculo cardíaco, são liberadas com o rompimento da membrana do cardiomiócito. O

nível plasmático elevado de troponina, em pacientes com hipertensão pulmonar, associou-se a pior prognóstico.<sup>122</sup> Esta observação pode estar relacionada ao fato dessa proteína indicar isquemia miocárdica e, por consequência, um grau mais avançado da doença.

O ácido úrico plasmático representa o produto final de oxidação no metabolismo das purinas. Vários estudos demonstram a relação entre a elevação de seus níveis e a gravidade da HAP, sendo considerado marcador independente de mortalidade.<sup>123</sup> O GMP cíclico, produzido pela enzima guanilato-ciclase, é um marcador indireto da ação biológica do óxido nítrico e de peptídeos natriuréticos, como o ANP e BNP. A excreção urinária de GMP cíclico correlaciona-se com os níveis plasmáticos de tais peptídeos.<sup>124</sup> Estudos demonstram que pacientes com HAP idiopática apresentam excreção urinária elevada de GMP cíclico, havendo correlação inversa com o índice cardíaco e saturação venosa de oxigênio. Sugere-se, portanto, que possa ser um indicador do estado hemodinâmico do paciente.<sup>125</sup> Outro marcador importante é a endotelina-1, cujos níveis plasmáticos correlacionam-se com índices hemodinâmicos e variáveis clínicas em HAP.<sup>126</sup>

O dímero D é um produto da degradação da fibrina, sendo portanto utilizado como marcador de fibrinólise. Seu nível plasmático tem sido utilizado como indicativo, de maneira indireta, da ocorrência de trombose e/ou coagulação intravascular. Estudos em pacientes com HAP idiopática demonstram relação direta dos níveis plasmáticos de dímero D com a classe funcional e pressão média em artéria pulmonar. Por outro lado, há relação

inversa com a saturação de oxigênio em repouso, distância caminhada em seis minutos, e sobrevida.<sup>127,128</sup>

Outra substância com participação em mecanismos relacionados ao recrutamento de plaquetas e à trombose na HAP é o fator de von Willebrand, sintetizado por células endoteliais e megacariócitos. Essa proteína exerce função de adesão e agregação plaquetária em locais de dano vascular. Além de ser utilizado como marcador de disfunção endotelial, observações iniciais sugerem que níveis plasmáticos elevados do fator de von Willebrand, em pacientes com HAP idiopática e associada a cardiopatia congênita, correlacionam-se com a sobrevida. Em um estudo retrospectivo, foram analisados pacientes portadores de HAP idiopática, hereditária e associada ao uso de anorexígenos, por um período de oito anos. Houve associação significativa entre níveis elevados do fator de von Willebrand e menor sobrevida.<sup>129</sup> Na Unidade Clínica de Cardiologia Pediátrica e Cardiopatias Congênitas do Adulto (InCor – HCFMUSP), estudos foram realizados em pacientes portadores de HAP idiopática e associada a cardiopatias congênitas.<sup>62,130,131</sup> A elevação dos níveis plasmáticos do fator de von Willebrand pareceu estar associada a menor expectativa de vida, embora com um número pequeno de pacientes, acompanhados por apenas um ano.

### 1.8. Resumindo algumas questões não resolvidas...

Diante do que foi exposto, alguns problemas não suficientemente esclarecidos podem ser resumidos. Seria importante a caracterização da disfunção microvascular em formas específicas de apresentação da HAP. A forma idiopática tem sido estudada mais exhaustivamente, mas há relatos ainda escassos sobre o comportamento de marcadores biológicos nas outras subcategorias diagnósticas. O agrupamento de todas elas sob a designação de HAP facilita planejamentos terapêuticos, mas dificulta a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos. Além disso, apesar da aparente associação entre sucesso terapêutico e melhora nos marcadores bioquímicos que têm sido estudados,<sup>123,132-134</sup> tal atrelamento não tem sido investigado suficientemente com drogas moduladoras da função endotelial, que não apresentam ação primariamente vasodilatadora. Finalmente, caberia interrogar sobre a existência de associação entre disfunção microvascular e prognóstico, em termos de sobrevida. Há estudos iniciais, conforme mencionado, envolvendo casuísticas mistas, isto é, pacientes enquadrados em diferentes subcategorias diagnósticas. Estudos em doenças específicas são necessários, neste sentido.



## **2. OBJETIVOS**

---

## **2.1. Objetivo geral**

Caracterizar, através de marcadores bioquímicos, a disfunção microvascular em portadores de HAP, procurando verificar eventuais associações com variáveis funcionais e com o prognóstico, assim como o possível efeito de intervenção farmacológica com ação não primariamente vasodilatadora.

### **2.1.1. Objetivos específicos**

1. Caracterizar a disfunção microvascular em pacientes com HAP subdivididos em grupos, de acordo com a apresentação clínica. Relacionar, nos mesmos pacientes, os níveis circulantes de marcadores de disfunção endotelial e de inflamação, a variáveis funcionais;
2. Verificar o possível efeito da administração oral crônica de estatina sobre marcadores de disfunção endotelial e de inflamação;

3. Investigar possível associação entre a magnitude da disfunção microvascular, caracterizada pelo nível circulante de marcadores, e o prognóstico com respeito à sobrevida.

### **3. MÉTODOS**

---

### 3.1. Casuística

Foram incluídos no estudo pacientes com idade superior a oito anos, em acompanhamento ambulatorial na Unidade Clínica de Cardiologia Pediátrica e Cardiopatias Congênitas do Adulto (InCor – HCFMUSP). Todos os pacientes eram portadores de HAP. Foram admitidos no estudo pacientes com as formas idiopática, hereditária ou associada a cardiopatias congênitas. Dentre estes, pacientes com defeitos cardíacos, operados ou não, foram incluídos. A confirmação da doença foi feita através de uma série de procedimentos diagnósticos, constantes do prontuário dos pacientes, incluindo testes laboratoriais, métodos de imagem e estudo hemodinâmico. Assim, foram descartadas outras causas da doença, incluídas na categoria HAP, como por exemplo, pelo vírus HIV, esquistossomose, ou associada a doenças do tecido conectivo. Também foram excluídas causas de hipertensão pulmonar de outras categorias, que não HAP (categorias de 2 a 5, Quadro 1), como por exemplo, doenças do coração esquerdo, respiratórias crônicas ou tromboembólicas. Quanto à caracterização hemodinâmica do paciente como portador de HAP, foram incluídos no estudo aqueles com pressão média em artéria pulmonar superior a 30 mmHg, e pressão de encunhamento não superior a 15 mmHg. Todos os pacientes encontravam-se estáveis do ponto de vista clínico, em seguimento ambulatorial. Portanto, os pacientes incluídos apresentavam-se em classe funcional II ou III. Não houve admissão de pacientes em classe funcional IV,

isto é, em situação de emergência, ou durante período de internação por instabilidade clínica. Os pacientes encontravam-se sob tratamento convencional, em uso de anticoagulante oral (varfarina), medicação anticongestiva e/ou uso de oxigênio inalatório domiciliar. Além disso, na época do início do estudo (julho de 2005), ainda não havia no Brasil regulamentação específica para disponibilização de medicamentos para HAP. Assim sendo, apenas alguns pacientes encontravam-se em uso de vasodilatador específico. Pacientes em tratamento com o inibidor de fosfodiesterase-5 sildenafil, haviam participado de estudo anterior, aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – CAPPesq, sob o registro de número 851/02. A entrada dos pacientes foi feita de forma consecutiva.

### **3.1.1. Grupos de pacientes considerados no estudo**

Visando cumprir o objetivo de se analisar o quadro de disfunção microvascular em diferentes formas da doença, os pacientes foram subdivididos em três grupos, de acordo com a apresentação clínica: grupo A, pacientes portadores de HAP idiopática, HAP hereditária e HAP associada a cardiopatia congênita corrigida; grupo B, portadores de HAP associada a cardiopatia congênita sem hipoxemia; e grupo C, portadores de HAP

associada a cardiopatia congênita com hipoxemia (Síndrome de Eisenmenger). Para fins de direcionamento aos grupos, considerou-se hipoxemia valores de saturação periférica de oxigênio (SpO<sub>2</sub>) inferiores a 90%. Os pacientes classificados como grupo B apresentavam critérios clínicos, anatômicos ou hemodinâmicos, isoladamente ou em associação, que caracterizavam obstáculo para o tratamento cirúrgico.

### **3.1.2. Critérios de exclusão**

Foram excluídos do processo de seleção pacientes com diagnósticos além dos citados acima. Também foram excluídos pacientes nas seguintes situações: classe funcional IV; internados, sob cuidados intensivos e/ou com necessidade de medidas de suporte cardiocirculatório; com mais de duas visitas mensais ao pronto-socorro em sua história recente, isto é, com doença muito instável. Além disso, pacientes portadores de trombose pulmonar extensa, confirmada por exame angiotomográfico constando do prontuário, foram excluídos. Outro critério que impossibilitou a entrada do paciente foi a incapacidade, por qualquer razão, de realização de testes de acompanhamento, como o teste de caminhada de seis minutos. A segunda etapa das investigações, após as análises na condição basal, correspondeu à verificação dos efeitos de estatina comparativamente ao placebo. O desenho desta etapa foi feito de forma a incluir apenas indivíduos que

completarem seis meses de tratamento. Assim sendo, esta passou a constituir critério de exclusão das investigações como um todo. Em outras palavras, pacientes que, por quaisquer razões, não completassem o período inicial de seis meses, não seriam considerados posteriormente, por exemplo, na análise de sobrevida.

### **3.1.3. Aspectos éticos e aprovação por comitês científicos**

Somente foram incluídos os pacientes que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. No caso de menores de 18 anos, a autorização para participação foi feita por seu responsável legal. O estudo foi aprovado pela Comissão Científica e de Ética do Instituto do Coração, sob o registro SDC 2613/05/033, assim como pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sob o registro CAPPesq 380/05. Os recursos financeiros requisitados para compra dos testes imunoenzimáticos foram solicitados e concedidos pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, sob o registro de número 05/05320-5.



#### **3.1.4. Tamanho amostral**

O número de pacientes incluídos foi decidido com base em uma das etapas propostas, qual seja, o estudo randomizado com a utilização de estatina. Assim sendo, para se demonstrar diferença da ordem de 0,4 desvio-padrão ou superior, com poder de 0,8 e nível de significância de 0,05, estabeleceu-se como necessário um total de 72 pacientes, considerando-se a possibilidade de perda ou não aproveitamento em torno de 20%.

### **3.2. Desenho geral das investigações**

#### **3.2.1. Caracterização geral dos marcadores bioquímicos**

A primeira parte correspondeu à análise dos marcadores bioquímicos, na fase inicial do estudo (condição basal), caracterizados nos pacientes como um todo, assim como nos grupos subdivididos, de acordo com a apresentação clínica. Também foi feita análise dos dados demográficos e funcionais. Além disso, verificaram-se possíveis associações entre os níveis plasmáticos dos marcadores bioquímicos, e variáveis clínicas de gravidade e prognóstico. Assim, os níveis plasmáticos dos marcadores

foram correlacionados à idade, SpO<sub>2</sub> em repouso e após esforço, e hematócrito, bem como à distância caminhada no teste de seis minutos. Esta etapa, portanto, correspondeu a investigação descritiva de caráter transversal.

### **3.2.2. Efeito de estatinas sobre marcadores de disfunção microvascular**

Na segunda parte foi feita a análise do possível efeito da intervenção terapêutica com estatina, sobre marcadores de disfunção microvascular. Paralelamente, variáveis clínicas como a distância caminhada em seis minutos e a SpO<sub>2</sub> em repouso e após esforço foram registradas. Esta etapa consistiu de investigação de caráter prospectivo e randomizado, havendo controle por placebo. Os mesmos pacientes foram acompanhados durante seis meses, sendo feitas determinações sequenciais dos marcadores, conforme detalhado mais adiante.

### **3.2.3. Análise de sobrevida**

A partir do término da etapa anterior, os mesmos pacientes mantiveram-se em acompanhamento ambulatorial trimestral, em uso de estatina. Na última parte do estudo, foi considerado o período total de acompanhamento, desde o início (condição basal), através da fase de investigação do possível efeito de estatina (primeiros seis meses), até a última visita ambulatorial. De forma temporal, este período foi estabelecido como tendo início em julho de 2005 e término em setembro de 2009. Durante o período de quatro anos, foram registrados os óbitos. Assim sendo, fez-se a análise da possível associação entre alterações nos níveis plasmáticos dos marcadores bioquímicos, e a sobrevida. Esta etapa consistiu, portanto, na investigação de caráter prospectivo longitudinal de coorte.

### **3.3. Especificações sobre o estudo do possível efeito de estatina**

A droga usada no estudo foi a rosuvastatina. Trata-se de medicação amplamente utilizada, disponível comercialmente. Optou-se pelo uso da rosuvastatina porque, além de ser de última geração na época do início do estudo, preenchia critérios de hidrofobicidade (com menor possibilidade de

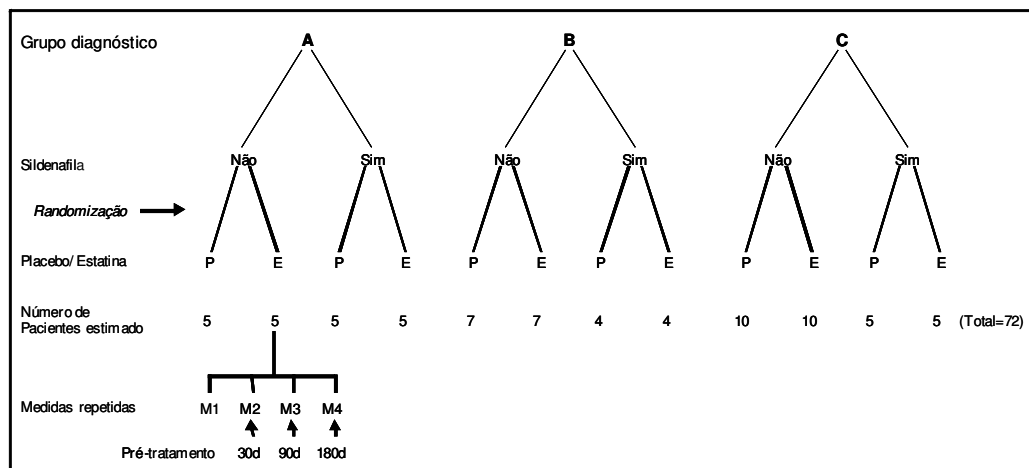
efeitos sistêmicos), apropriados para o tipo de paciente presente no estudo. Após determinações laboratoriais basais de segurança, os pacientes passaram a receber rosuvastatina, com administração diária de 10 mg, por via oral, ou placebo. Na ausência de efeitos colaterais ou modificações enzimáticas significantes, o tratamento foi mantido durante todo o período de estudo.

O processo de randomização (*nested-case control design*) foi feito como segue. Inicialmente, de maneira consecutiva, os pacientes foram organizados em pares. Cada par deveria ter ambos os pacientes com características A, B ou C. No caso de tratamento com sildenafil, ambos os pacientes do par deveriam estar sob uso da droga. Deveriam também ser semelhantes quanto à idade, com diferença não superior a dez anos. No caso de pacientes do grupo C, deveriam estar equilibrados quanto à gravidade da hipoxemia, com não mais que dez pontos percentuais de diferença. Com relação à Síndrome de Down, também deveria estar presente nos dois pacientes do par. Tendo sido constituídos os pares, procedeu-se à randomização, através da qual um dos elementos foi direcionado para o uso de rosuvastatina (Quadro 2).

Os procedimentos de diagnóstico funcional, quais sejam, classe funcional, teste de seis minutos de caminhada e saturação periférica de oxigênio, assim como as análises laboratoriais gerais e específicas (descritas adiante), foram realizados na condição basal e, sequencialmente, aos 30, 90 e 180 dias de tratamento.

Todos os pacientes foram supervisionados por consultas médicas mensais até o final desta etapa do estudo. Durante essas consultas, fornecia-se a medicação e solicitava-se ao paciente a devolução da embalagem entregue no mês anterior, com o intuito de se aferir a adesão ao tratamento. Também era feita a avaliação da condição clínica, e realizado questionamento sobre eventos adversos, incluindo sintomas sugestivos de rabdomiólise. Ao final do período de 180 dias, todos os pacientes em uso de placebo foram convertidos para estatina até a conclusão (término do seguimento do último paciente).

**Quadro 2. Desenho da etapa do estudo para análise do possível efeito de estatina sobre marcadores bioquímicos**



### 3.4. Procedimentos de diagnóstico funcional e laboratorial geral

Além dos dados demográficos, como procedência, idade e gênero, foi analisada a capacidade funcional dos pacientes. A classe funcional foi baseada nos critérios propostos pela *New York Heart Association*, adaptados para a hipertensão pulmonar pela Organização Mundial de Saúde.<sup>135</sup> Também foi registrada a distância obtida no teste de caminhada de seis minutos,<sup>136</sup> com a caracterização do grau de dispnéia, ao final, utilizando-se a escala de Borg.<sup>137</sup> A saturação periférica de oxigênio, por oximetria de pulso, também foi registrada, antes e após o término do teste. A avaliação funcional foi feita nos quatro momentos especificados anteriormente, isto é, na condição basal e após 30, 90 e 180 dias.

O exame ecocardiográfico com Doppler foi realizado em todos os pacientes para confirmação ou exclusão de cardiopatia estrutural. Também foram estimadas a pressão sistólica em artéria pulmonar, através da velocidade do fluxo sistólico de regurgitação tricúspide, e a pressão média, através da regurgitação pulmonar.<sup>138</sup> Foram realizadas determinações hematológicas através de coleta de sangue periférico, particularmente do hematócrito, analisado por contador eletrônico automatizado. Resultados superiores a 60% foram repetidos e analisados por contagem manual, a fim de se evitar possíveis erros de leitura.

### 3.4.1. Determinações de segurança

A segunda parte do estudo correspondeu à verificação do efeito da rosuvastatina sobre marcadores de disfunção microvascular. Sabe-se que as estatinas possuem potencial toxicidade hepática, assim como acometimento de musculatura esquelética, com eventos como mialgia e até rabdomiólise. Assim, foram realizados testes laboratoriais de segurança para controle da função hepática, com determinações plasmáticas de enzimas (AST, aspartato aminotransferase; ALT, alanina aminotransferase;  $\gamma$ GT, gamaglutamil-transferase). Além disso, para a verificação de ocorrência de rabdomiólise, foram avaliados os níveis plasmáticos de CPK (creatinofosfoquinase). Os testes de segurança foram realizados simultaneamente às determinações bioquímicas, ou seja, na condição basal (início do seguimento) e aos 30, 90 e 180 dias de acompanhamento.

### **3.5. Procedimentos laboratoriais específicos – marcadores bioquímicos**

#### **3.5.1. Coleta de sangue venoso periférico**

A amostra sanguínea foi obtida através de punção venosa periférica, utilizando-se escalpe de números 19G ou 21G. A coleta foi feita de forma lenta e suave, a fim de se evitar fragmentação celular durante o processo. Todo o material foi coletado em citrato de sódio a 3,8% (1:10 volumes). Além disso, o valor do hematócrito foi obtido simultaneamente para posterior correção das concentrações plasmáticas das proteínas em estudo (detalhes a seguir).

#### **3.5.2. Separação e estocagem do plasma**

O plasma foi separado, através de centrifugação, e estocado a -80°C até o uso. As amostras foram descongeladas uma única vez, sendo descartadas após o uso.



### 3.5.3. Processamento das amostras

Todas as determinações bioquímicas com amostras de plasma foram feitas através de testes imunoenzimáticos (*enzyme-linked immunosorbent assays*, ELISA), com 'kits' disponíveis no comércio. As amostras foram sempre processadas em duplicata, sendo os resultados obtidos mediante comparação com curva padrão.

### 3.5.4. Correção levando-se em conta o hematócrito

Todos os resultados correspondentes aos marcadores bioquímicos foram revistos em relação ao nível do hematócrito, sendo feitas as correções apropriadas. Tome-se como exemplo, um paciente com hematócrito de 40%. Em tubos contendo 0,75 mL de anticoagulante, seriam coletados 6,75 mL de sangue total do paciente. Após centrifugação, o volume plasmático, equivalente a 60% da amostra, neste caso, e no qual se encontraria o marcador bioquímico, seria de 4,05 mL. Acrescido da quantidade de anticoagulante, o volume total de plasma passaria a 4,8 mL. Para eliminação do efeito de diluição, aplicar-se-ia um fator de correção obtido da relação entre o volume total (4,8 mL) e o volume sem anticoagulante (4,05 mL), neste caso, 1,185. Em resumo, em um indivíduo com hematócrito de 40%, a

concentração encontrada de determinado marcador seria multiplicada por 1,185. Assim sendo, para cada valor de hematócrito, foi calculado um fator de correção, como demonstrado a seguir:

$$\text{Fator de correção} = \frac{[\text{volume de sangue total} \times 1/\text{hematócrito}] + [\text{volume de anticoagulante}]}{[\text{volume de sangue total} \times 1/\text{hematócrito}]}$$

Assim, a concentração final de um determinado marcador no plasma foi equivalente àquela obtida pelo teste, multiplicada pelo fator de correção. Nos indivíduos que apresentaram hematócrito aumentado (portanto, com volume de plasma menor), o fator de correção foi proporcionalmente superior.

### **3.5.5. Controles**

Os mesmos procedimentos de coleta e processamento foram feitos em voluntários saudáveis, a saber, doadores de sangue dentro dos limites de idade dos pacientes. Para cada um dos testes bioquímicos, um número mínimo de 28 controles foi selecionado.

### **3.5.6. Especificações sobre os 'kits' para as determinações bioquímicas**

Todas as determinações bioquímicas foram realizadas através de testes imunoenzimáticos de alta sensibilidade (enzyme-linked immunosorbent assays, ELISA). As dosagens de selectina-P, TNF $\alpha$ , IL-6 e IL-10 foram realizadas em 'kits' da R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, Estados Unidos. As dosagens do vWF:Ag, t-PA e PAI-1 foram obtidas com 'kits' da Diagnostica Stago, Asnières, França. Quanto às dosagens da proteína C reativa, foram realizadas em 'kits' da American Diagnostica Inc., Greenwich, Connecticut, Estados Unidos.

### **3.5.7. Cronograma das coletas**

As amostras foram coletadas na condição basal visando a descrição geral do comportamento da disfunção microvascular nos pacientes. Também foram efetuadas coletas após 30, 90 e 180 dias de seguimento, fundamentalmente em função do estudo do possível efeito da estatina sobre marcadores bioquímicos. Todas as determinações foram utilizadas posteriormente na análise de sobrevida.

### **3.6. Procedimentos de quantificação**

#### **3.6.1. Forma de apresentação dos dados**

Em RESULTADOS, são apresentados dados nominais, assim como variáveis categóricas e contínuas. Conforme a existência ou não de aderência à distribuição normal (Gaussiana), os resultados correspondentes às variáveis contínuas são apresentados em média ou mediana, como medidas de tendência central, e desvio-padrão ou limites, como medidas de dispersão. Quando mostrados sob a forma de gráficos, os resultados de variáveis com distribuição não Gaussiana são expostos em *box-plots*.

#### **3.6.2. Procedimentos realizados na situação de entrada no estudo**

Na condição basal, as comparações entre pacientes e controles, quanto aos marcadores bioquímicos, foram feitas com a utilização do teste *t* de Student ou do teste de Mann-Whitney, respectivamente, para variáveis com e sem distribuição normal. As comparações envolvendo grupos de pacientes em relação aos controles foram feitas com o uso de análise de

variância, complementada com o procedimento de Dunnett para comparações múltiplas. No caso de variáveis com distribuição não Gaussiana, as comparações foram feitas por meio do teste de Kruskal-Wallis, complementado com o procedimento de Dunn. Ainda na situação de entrada no estudo, as possíveis associações entre marcadores bioquímicos e variáveis demográficas e funcionais foram analisadas mediante a obtenção do coeficiente “ $r$ ” de Pearson (variáveis com distribuição normal) ou do coeficiente “ $r_s$ ” de Spearman (sem distribuição normal). Em todos os testes, adotou-se o valor 0,05 como nível de significância.

#### **3.6.2.1. Estudo crônico comparativo do efeito estatina em relação ao placebo**

Inicialmente, os grupos estatina e placebo foram comparados entre si, na condição basal (entrada no estudo), visando à verificação de possíveis diferenças, com o objetivo de se determinar a efetividade do procedimento de randomização. Foram utilizados os testes  $t$  de Student, ou de Mann-Whitney. A seguir, procedeu-se à comparação, propriamente dita, dos tratamentos (estatina *versus* placebo). Para tanto, foram ajustados modelos lineares gerais, com dois fatores (tipo de tratamento e tempo, 30, 90 e 180 dias), havendo medidas repetidas em um deles (tempo). No caso de variáveis com distribuição não Gaussiana, o teste de Mann-Whitney foi

empregado para comparações entre os tipos de tratamento nos tempos considerados. Em todos os testes adotou-se o valor 0,05 como nível de significância.

### **3.6.3. Sobrevida e fatores modificadores**

Os marcadores bioquímicos foram analisados quanto ao possível impacto na sobrevida dos pacientes. Devido ao número reduzido de indivíduos com diagnósticos de HAP idiopática e hereditária, a análise de sobrevida foi efetuada somente no grupo com HAPCCg. A possível influência de cada marcador bioquímico na sobrevida foi analisada considerando-o tanto na forma de variável contínua como de variável categórica, isto é, com níveis circulantes acima ou abaixo de determinado valor. Tais valores de 'corte' foram estabelecidos como sendo os níveis correspondentes aos percentis (superiores) 90 e 95 no grupo controle. Além disso, a possível influência de cada marcador bioquímico na sobrevida foi avaliada de três formas: o seu nível na condição basal, e os níveis médio e máximo de quatro determinações (basal, 30, 90 e 180 dias). De forma descritiva e comparativa, curvas de sobrevida foram analisadas com a utilização do procedimento de Kaplan-Meier, sendo as diferenças avaliadas pelo teste *log-rank* (Mantel-Cox). Modelos de regressão foram ajustados no sentido de se caracterizar os marcadores bioquímicos como possíveis

fatores de risco para o evento fatal. Cada variável bioquímica foi analisada mediante ajustamento de modelo de regressão (Cox, análise multivariada), com procedimentos do tipo *stepwise*, nos quais variáveis demográficas, funcionais e relacionadas a tratamentos foram testadas como possíveis fatores de interferência. Níveis de significância de 0,05 e 0,10 foram usados respectivamente para a inclusão e exclusão de potenciais interferentes. A seguir, em análise bivariada, o 'candidato a fator de risco' (variável bioquímica) foi testado juntamente com cada um dos possíveis interferentes mencionados, sendo calculada a razão de chances (e seu intervalo de confiança de 95%) para o evento fatal, antes e após o ajustamento. Modificações na razão de chances (após ajustamento) superiores a 20% (em relação ao valor prévio ao ajustamento) foram consideradas como indicativas de interferência significativa. Nesta situação, o fator de risco em análise (bioquímico) não pode ser aceito como tal.

## **4. RESULTADOS**

---



#### 4.1. Resumo das alterações encontradas

Os achados da presente investigação podem ser resumidos como segue:

Na primeira parte do estudo, a análise da disfunção microvascular, através da dosagem plasmática de marcadores bioquímicos, demonstrou que os níveis de seis das oito proteínas estudadas apresentaram-se significativamente elevados em relação aos controles. Analisando-se os pacientes com HAP como um todo, foram as seguintes as proteínas cujos níveis se mostraram alterados ( $p < 0,001$ ): vWF:Ag (16% em relação aos controles), t-PA (45%), PAI-1 (46%), selectina P (68%), IL-6 (63%) e IL-10 (107%). Houve correlação entre o aumento nos níveis desses marcadores e variáveis clínicas de gravidade e prognóstico. Assim por exemplo, o nível plasmático do t-PA relacionou-se de maneira direta com o hematócrito ( $r = 0,43$ ;  $p = 0,0006$ ) e inversa com a  $SpO_2$  ( $r = -0,27$ ;  $p = 0,0348$ ); o nível do seu inibidor, o PAI-1, relacionou-se de maneira inversa com a distância caminhada no teste de seis minutos ( $r = -0,35$ ;  $p = 0,0062$ ).

Na segunda parte do estudo, com relação ao possível efeito da rosuvastatina sobre os níveis circulantes dos marcadores bioquímicos, observou-se diferença significativa para um deles, qual seja, a selectina P. Partindo-se de níveis basais semelhantes nos grupos rosuvastatina e placebo, a concentração da selectina P, nos três momentos de verificação considerados ao longo do tratamento (30, 90 e 180 dias), esteve em média

24% inferior no grupo estatina ( $p=0,037$ ). Esse resultado pode representar efeito não apenas na disfunção endotelial, mas também na propriedade de recrutamento de células inflamatórias. Com respeito ao t-PA, houve uma tendência à redução em relação ao placebo (16,6% em média), embora a diferença não tenha sido estatisticamente significativa ( $p=0,094$ ). Além disso, o uso de rosuvastatina promoveu melhora na  $SpO_2$  após esforço, nos pacientes portadores de cardiopatias congênitas com hipoxemia, em relação ao grupo placebo.

Na terceira parte do estudo procurou-se verificar, em portadores de HAPCCg, o possível impacto das alterações bioquímicas (marcadores de disfunção microvascular) na sobrevida, considerando-se um período de acompanhamento de quatro anos. Níveis plasmáticos elevados de um entre os oito marcadores estudados, qual seja, o vWF:Ag, estiveram relacionados a pior prognóstico. Especificamente, a sobrevida cumulativa para pacientes com níveis superiores ao percentil 95, observado nos controles, foi significativamente menor quando comparada a indivíduos com níveis menores ( $p=0,0046$ ). O risco de evolução para óbito, neste caso, foi 6,56 vezes superior (intervalo de confiança de 95% 1,46 a 29,40 vezes). Este risco não sofreu alteração significativa quando outros fatores potencialmente interferentes foram incluídos no modelo estatístico (variáveis demográficas, funcionais e relacionadas a tratamentos recebidos).

Assim, o presente estudo revelou, em pacientes com HAP, notadamente os portadores de cardiopatias congênitas em presença de hipoxemia crônica, anormalidades em marcadores bioquímicos relacionados

à disfunção microvascular, potencialmente passíveis de melhora com uso crônico de estatina. Os dados ainda sugerem que tais anormalidades se revestem de valor prognóstico.

## **4.2. Análise descritiva**

### **4.2.1. Caracterização geral da população estudada**

Foram incluídos no estudo 60 pacientes, acompanhados no Ambulatório da Unidade Clínica de Cardiologia Pediátrica e Cardiopatias Congênitas do Adulto do Instituto do Coração – HCFMUSP. Os dados demográficos, os diagnósticos, e variáveis clínicas e laboratoriais dos pacientes encontram-se detalhados na Tabela 1. Os pacientes foram numerados de acordo com a ordem de inclusão no estudo, sendo trinta e seis do sexo feminino. A idade variou de 13 a 60 anos (mediana de 33 anos), a maioria encontrando-se entre a segunda e quarta décadas de vida. Todos os pacientes eram portadores de HAP, sendo subdivididos em três grupos de acordo com o diagnóstico clínico: grupo A, pacientes portadores de HAP idiopática (N=10), HAP hereditária (N=3) e HAP associada a cardiopatia congênita corrigida (N=1); grupo B, portadores de HAP associada a cardiopatia congênita sem hipoxemia (N=18); e grupo C,

portadores de HAP associada a cardiopatia congênita com hipoxemia (N=28). Nos grupos de pacientes portadores de cardiopatias congênitas, os principais diagnósticos foram comunicação interventricular (N=19) e comunicação interatrial (N=15). Em menor número encontrou-se a dupla via de saída do ventrículo direito (N=1), persistência do canal arterial (N=4), defeito do septo atrioventricular forma total (N=2), e transposição das grandes artérias associada a comunicação interatrial e comunicação interventricular (N=1). Outras associações presentes foram comunicação interatrial e comunicação interventricular (N=2), e comunicação interventricular com persistência do canal arterial (N=2).

Com relação à avaliação da capacidade funcional, os pacientes apresentaram-se em sua maioria em classe funcional II (N=50), estando o restante em classe III. Todos foram submetidos ao teste de caminhada de seis minutos, registrando-se a distância caminhada em metros, e a SpO<sub>2</sub> em repouso, e após o término do teste. A distância caminhada teve média de 415 m (com DP de 105,7 m). A maioria dos pacientes foi capaz de caminhar 400 m ou mais (N=39). Estabelecendo-se como critério de gravidade a marca de 380 m<sup>103</sup>, 19 pacientes não estiveram aptos a atingí-la, e dois destes caminharam menos de 200 m (pacientes de número 43 e 45 da Tabela 1). A SpO<sub>2</sub> teve média de 90,7% (com DP de 5,15%) ao repouso, e de 75,9% (DP de 15,8%) após esforço.

A pressão sistólica arterial pulmonar, estimada pela regurgitação tricúspide ao exame ecocardiográfico, foi aferida na maioria dos pacientes, variando de 46 a 141 mmHg (com mediana de 97,5 mmHg). O hematócrito teve média de 52,9% (com DP de 15,7%).

**Tabela 1 - Dados demográficos, diagnóstico e variáveis clínico-laboratoriais da população estudada (N=60)**

Número	Paciente	Gênero	Idade (anos)	Diagnóstico	Grupo*	Classe funcional	DC6M (m)	SpO <sub>2</sub> basal (%)	SpO <sub>2</sub> após-esforço (%)	PSAP** (mmHg)	Hematócrito (%)
2	FRS	M	35	CIV	C	II	510	89	62	60	65
3	JCS	M	39	CIV	C	II	472	88	69	123	62
4	RKE	M	35	DVSVD	C	II	457	89	66		71
5	RM	M	38	CIV	C	II	450	88	76	65	67
6	MNKR	F	50	CIV	C	II	440	88	72	74	53
7	MSPL	F	52	CIA	C	III	372	85	65	120	67
8	AI	M	26	DSAVT	C	II	210	83	71		72
9	PAMB	M	19	DSAVT	C	II	252	86	78	86	68
10	MACOA	F	47	CIA	C	III	231	83	65	86	52
11	SAVS	F	41	CIA	C	II	436	86	67	92	58
12	RSR	F	53	CIA	C	II	405	83	54	93	53
13	TCMS	F	40	CIA	C	II	277	86	56	80	54
14	LNR	M	41	CIV	C	II	433	81	40	89	68
15	MN	F	44	CIV	C	II	357	89	79	110	51
16	ARS	F	23	CIV	B	II	525	93	70	100	41
17	JNA	M	25	PCA	B	II	405	95	71	141	79
18	AKD	F	21	HAP hereditária	A	II	462	97	95	126	40
19	DED	M	18	HAP hereditária	A	II	420	98	97	97	52
20	CAS	F	32	CIA	B	II	520	96	91	107	44
21	ZRF	F	28	CIA	B	II	454	95	78	111	42
22	ANS	F	40	HAP idiopática	A	II	600	95	93	100	44
23	RPTF	F	36	CIA corrigida	A	III	378	96	96	96	42
24	AVNS	M	49	HAP idiopática	A	II	482	96	83	70	50
25	EBM	M	36	HAP hereditária	A	III	390	94	80	88	43
26	DGM	F	15	CIA/CIV	B	II	399	94	79	102	37
27	DCS	F	15	PCA	B	II	294	95	94		43
28	CASJ	M	13	HAP idiopática	A	II	474	96	93	87	42
29	CABS	F	14	HAP idiopática	A	II	378	95	91	93	40
30	AF	F	23	CIV	B	II	333	93	62	123	46
31	DPS	F	20	CIA	B	II	336	96	84	82	45
32	CBMS	F	60	CIV	C	II	403	84	63		55
33	OLJ	M	55	CIA	C	II	307	88	90	70	46
34	CCC	F	21	CIV	B	II	354	95	90	107	40
35	NBS	F	19	PCA	B	II	420	94	75		58
36	ACS	M	27	CIV	C	II	588	88	62	74	58
37	JLSC	M	30	CIV	C	II	505	87	44	75	69
38	APMN	F	39	PCA	B	II	447	94	87	140	47
39	GDN	M	36	CIA	C	II	427	89	68	119	55
40	DVS	M	33	CIV	B	II	630	90	85	120	45
41	EBS	F	31	CIA	C	III	294	88	74	90	44
42	JAN	F	48	HAP idiopática	A	II	483	97	97	100	45
43	MCS	F	38	HAP idiopática	A	II	457	98	98	62	41
44	LFMPC	F	41	CIV	C	III	168	88	82	48	47
45	TADB	F	37	CIV	C	II	483	86	66	115	45
46	CCS	F	52	CIA	C	III	126	82	79	89	47
47	CA	F	57	CIA	C	III	227	80	65	98	65
48	ESC	F	33	CIV	B	II	441	92	82	115	44
49	MCAS	F	23	CIA/CIV	C	III	294	79	31		51
50	VIS	M	32	HAP idiopática	A	I	588	93	80	103	51
51	ZPGS	F	28	HAP idiopática	A	II	462	97	96	60	32
52	FBO	M	33	TGA/CIA/CIV	C	II	352	83	66	127	58
53	KCM	F	23	CIA	C	II	504	87	60	56	54
54	FMDS	M	29	HAP idiopática	A	II	402	97	97	111	47
55	JLAS	M	38	HAP idiopática	A	II	462	94	84	95	45
56	CFM	F	19	CIV/PCA	B	II	532	96	84	100	41
57	FTL	M	30	DVSVD	C	III	546	87	63	120	65
58	DMN	F	45	CIV	B	II	462	90	71		45
59	MDT	M	38	CIA	B	II	525	92	82	46	52
60	IJL	F	26	CIV	B	II	450	96	92	93	45
60	JBS	M	31	CIV	B	II	441	94	71	115	52

CIA, comunicação interatrial; CIV, comunicação interventricular; DC6M, distância caminhada em seis minutos; DSAVT, defeito do septo atrioventricular forma total; DVSVD, dupla via de saída do ventrículo direito; F, feminino; HAP, hipertensão arterial pulmonar; M, masculino; PCA, persistência do canal arterial; PSAP, pressão sistólica em artéria pulmonar; SpO<sub>2</sub>, saturação periférica de oxigênio; TGA, transposição das grandes artérias; \*Categorias diagnósticas no estudo, conforme descrito em "CARACTERIZAÇÃO GERAL DA POPULAÇÃO ESTUDADA". \*\*os dados ausentes não foram estimados devido à ausência de regurgitação tricúspide

#### **4.2.2. Acompanhamento ambulatorial e tratamento**

Os pacientes foram incluídos no estudo durante seu seguimento ambulatorial, com avaliação hemodinâmica previamente à inclusão. Todos os pacientes apresentaram pressão média arterial pulmonar acima de 30 mmHg e pressão de encunhamento abaixo de 15 mmHg, caracterizando a HAP.

O tratamento ao qual eram submetidos à época da entrada no estudo (julho de 2005) incluía o uso de oxigênio inalatório domiciliar, em caso de hipoxemia ( $SpO_2$  inferior a 90%), anticoagulação oral com varfarina, e medicação anticongestiva. Alguns pacientes estavam em uso de vasodilatador específico (sildenafil) por fazerem parte de protocolo de pesquisa prévio. Além do tratamento medicamentoso, durante as consultas ambulatoriais eram controlados rigorosamente parâmetros clínicos como classe funcional, frequência cardíaca, pressão arterial sistêmica,  $SpO_2$ , bem como o hematócrito. Pacientes com hematócrito elevado (acima de 65%), em geral com sintomas decorrentes da hiperviscosidade sanguínea (piora do cansaço, cefaléia, tontura e artralgia) eram submetidos a procedimento de hemodiluição. Nestes, o controle de ferro sérico e sua reposição, se indicada, tornavam-se obrigatórios.

### **4.3. Análise inferencial – Parte 1**

#### **4.3.1. Caracterização bioquímica da disfunção microvascular**

Foi realizada a análise da disfunção microvascular nos 60 pacientes, através da dosagem plasmática de marcadores bioquímicos. Além da análise dos pacientes como um todo, também foi observado o comportamento desses marcadores nos grupos específicos, ou seja, grupos A, B e C, comparando-os a um grupo controle. Resultados individuais encontram-se dispostos nos anexos **1** a **8**. Também foram verificadas possíveis correlações entre esses marcadores e variáveis clínicas.

Foram obtidos os níveis plasmáticos de conhecidos marcadores de disfunção endotelial, como vWF:Ag, t-PA, PAI-1 e selectina-P. Como mediadores inflamatórios, foram analisados TNF- $\alpha$ , PCR, IL-6 e IL-10. Conforme se verifica na Tabela 2, os níveis plasmáticos do vWF:Ag, t-PA, PAI-1, selectina-P, IL-6 e IL-10 foram significativamente superiores aos controles.



**Tabela 2 - Nível plasmático de marcadores de disfunção microvascular nos pacientes**

Marcador	Pacientes (N=60)	Controles	Valor de p
vWF:Ag (U/dL)	122,2 (22,9)	105,24 (24,71)	0,0008
t-PA (ng/mL)	8,57 (3,96)	5,91 (1,71)	<0,0001
PAI-1 (ng/mL)	24,1 (9,69;134,7)	16,5 (5,23;42,9)	<0,0001
Selectina-P (ng/mL)	42,8 (23,0)	25,5 (10,3)	<0,0001
TNF- $\alpha$ (pg/mL)	0,72 (0,11;5,61)	0,60 (0,08;2,86)	0,1761
PCR (mcg/mL)	6,48 (0,18;11,8)	4,14 (0,67;9,91)	0,4911
IL-6 (pg/mL)	1,47 (0,37;10,6)	0,90 (0,29;8,48)	0,0003
IL-10 (pg/mL)	1,95 (0,04;11,9)	0,94 (0,003;3,32)	0,0001

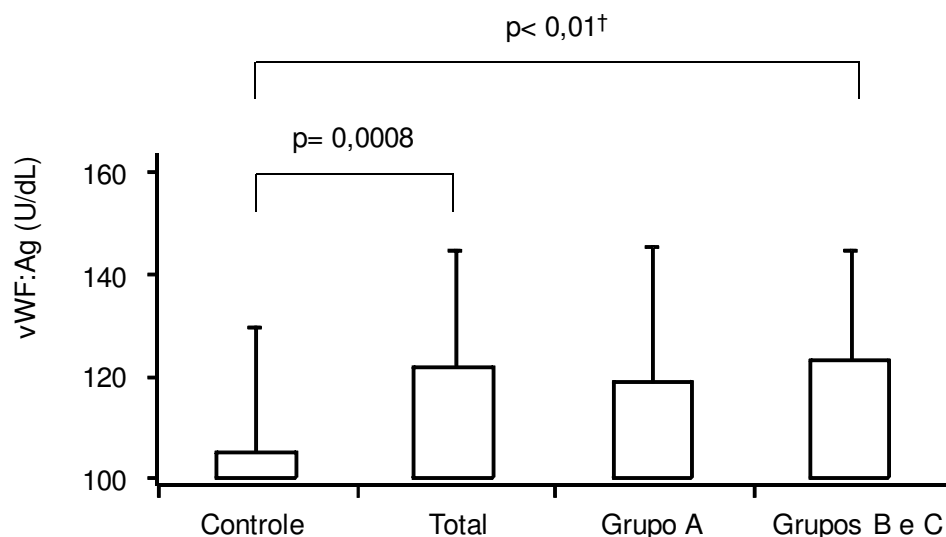
IL-6, interleucina-6; IL-10, interleucina-10; PAI-1, inibidor do ativador do plasminogênio; PCR, proteína C reativa; TNF- $\alpha$ , fator de necrose tumoral; t-PA, ativador do plasminogênio tecidual; vWF:Ag, antígeno do fator de von Willebrand. Valores de vWF:Ag, t-PA e selectina-P estão expressos em média e desvio padrão; PAI-1, TNF- $\alpha$ , PCR, IL-6 e IL-10 estão expressos em mediana, e limites inferior e superior

Todos os marcadores de disfunção microvascular supracitados foram analisados nos diferentes grupos e comparados aos controles. São apresentados adiante dois tipos de análise para cada um dos marcadores. No primeiro gráfico, os pacientes com cardiopatia congênita estão em categoria única e no segundo gráfico, são analisados separadamente.

#### 4.3.1.1. Determinação do nível plasmático do antígeno do fator de von Willebrand

O nível plasmático do vWF:Ag em todos os pacientes foi significativamente superior em relação ao grupo controle ( $p=0,0008$ ), como

demonstrado no Gráfico 1. Na análise por grupos, também houve diferença global significativa ( $p=0,0032$ ). No teste de múltiplas comparações, os pacientes portadores de cardiopatia congênita apresentaram níveis plasmáticos significativamente elevados.

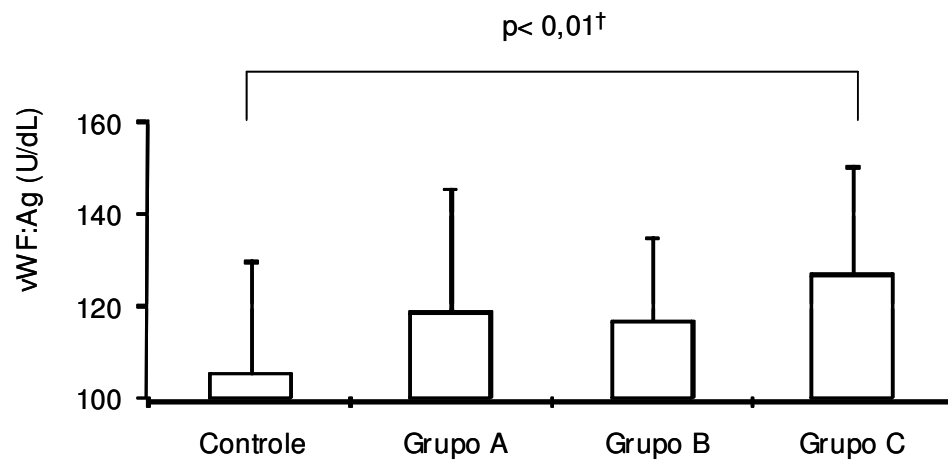


**Gráfico 1 - Nível plasmático do antígeno do fator de von Willebrand (vWF:Ag) nos diferentes grupos, comparativamente aos controles. O grupo total representa o conjunto dos 60 pacientes; grupo A, todos os pacientes sem comunicações intracardiácas; os grupos B e C representam os pacientes com cardiopatia congênita. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão.**

†Correspondente ao teste de Dunnet (múltiplas comparações)

Quando a análise foi feita com os pacientes portadores de cardiopatia congênita subdivididos em grupos B e C, ou seja, sem e com hipoxemia, também houve diferença global significativa em relação aos controles ( $p=$

0,0038). O teste de múltiplas comparações revelou aumento significativo no nível plasmático do vWF:Ag no grupo de pacientes com hipoxemia (Gráfico 2).

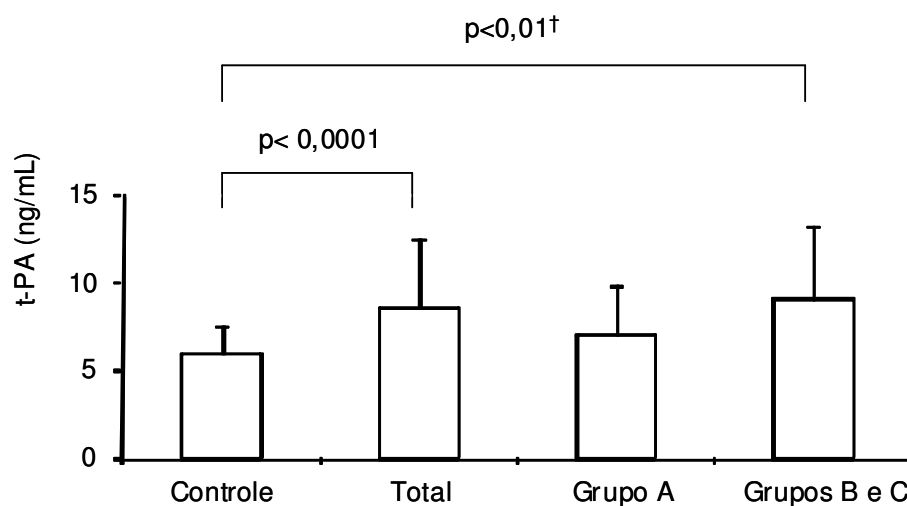


**Gráfico 2 -** Nível plasmático do antígeno do fator de von Willebrand (vWF:Ag) nos diferentes grupos diagnósticos, comparativamente aos controles. O grupo A representa todos os pacientes sem comunicações intracardíacas; grupo B, pacientes com cardiopatia congênita sem hipoxemia ( $SpO_2 \geq 90\%$ ); e grupo C, pacientes com cardiopatia congênita com hipoxemia ( $SpO_2 < 90\%$ ). Os resultados estão expressos em média e desvio padrão.

†Correspondente ao teste de Dunnet (múltiplas comparações)

#### 4.3.1.2. Determinação do nível plasmático do ativador tecidual do plasminogênio

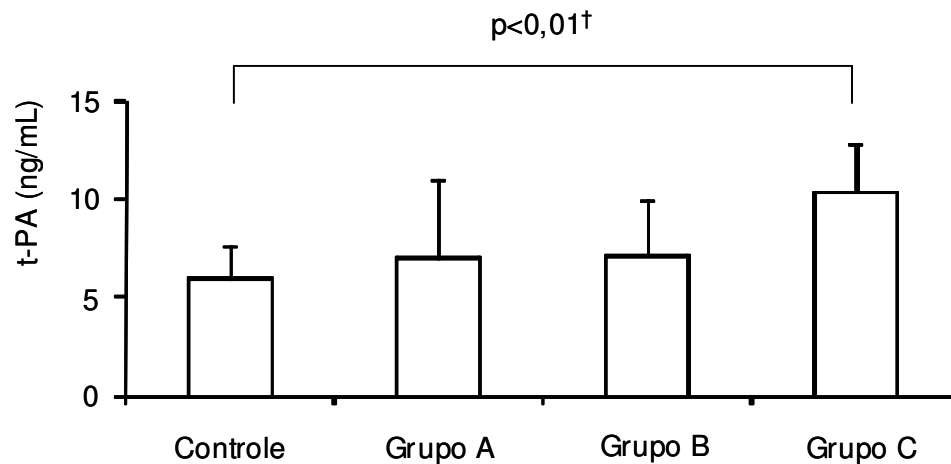
O nível plasmático do t-PA nos pacientes como um todo foi significativamente superior em relação ao grupo controle ( $p < 0,0001$ ), como demonstrado no Gráfico 3. Na análise por grupos também houve diferença global significativa ( $p < 0,0001$ ). No teste de múltiplas comparações, os pacientes portadores de cardiopatia congênita apresentaram níveis plasmáticos significativamente elevados.



**Gráfico 3 -** Nível plasmático do ativador tecidual do plasminogênio (t-PA) nos diferentes grupos, comparativamente aos controles. O grupo total representa o conjunto dos 60 pacientes; grupo A, todos os pacientes sem comunicações intracardíacas; os grupos B e C representam os pacientes com cardiopatia congênita. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão.

†Correspondente ao teste de Dunnet (múltiplas comparações)

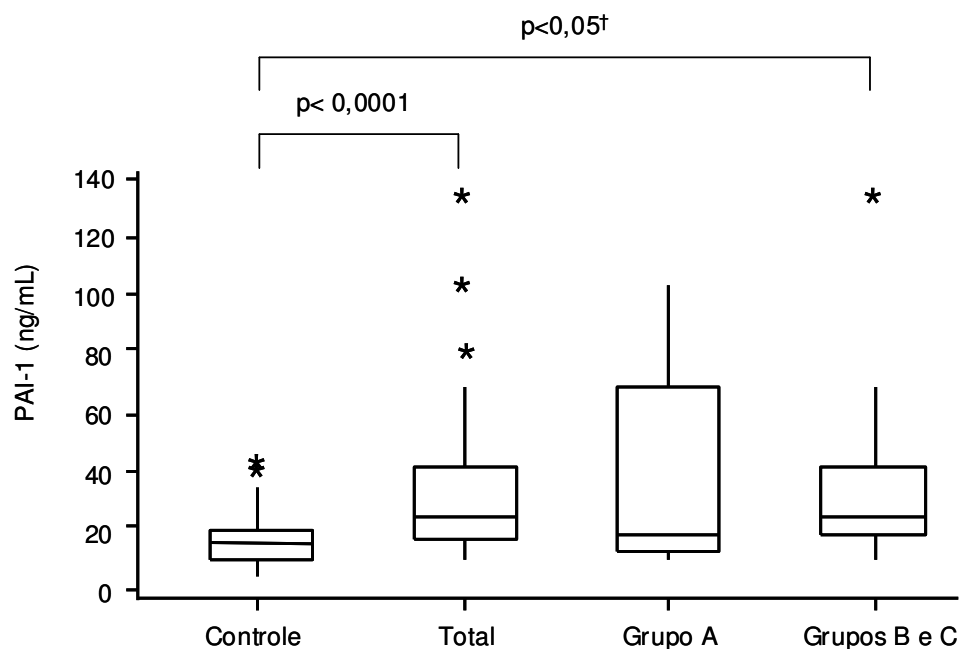
Quando a análise foi feita com os pacientes portadores de cardiopatia congênita subdivididos em grupos B e C, ou seja, pacientes sem e com hipoxemia, também houve diferença global significativa em relação aos controles ( $p < 0,0001$ ). O teste de múltiplas comparações revelou aumento significativo no nível do t-PA no grupo de pacientes com hipoxemia (Gráfico 4).



**Gráfico 4 -** Nível plasmático do ativador tecidual do plasminogênio (t-PA) nos diferentes grupos diagnósticos, comparativamente aos controle. O grupo A representa todos os pacientes sem comunicações intracardíacas; grupo B, pacientes com cardiopatia congênita sem hipoxemia ( $SpO_2 \geq 90\%$ ); e grupo C, pacientes com cardiopatia congênita com hipoxemia ( $SpO_2 < 90\%$ ). Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. †Correspondente ao teste de Dunnet (múltiplas comparações)

#### 4.3.1.3. Determinação do nível plasmático do inibidor do ativador do plasminogênio

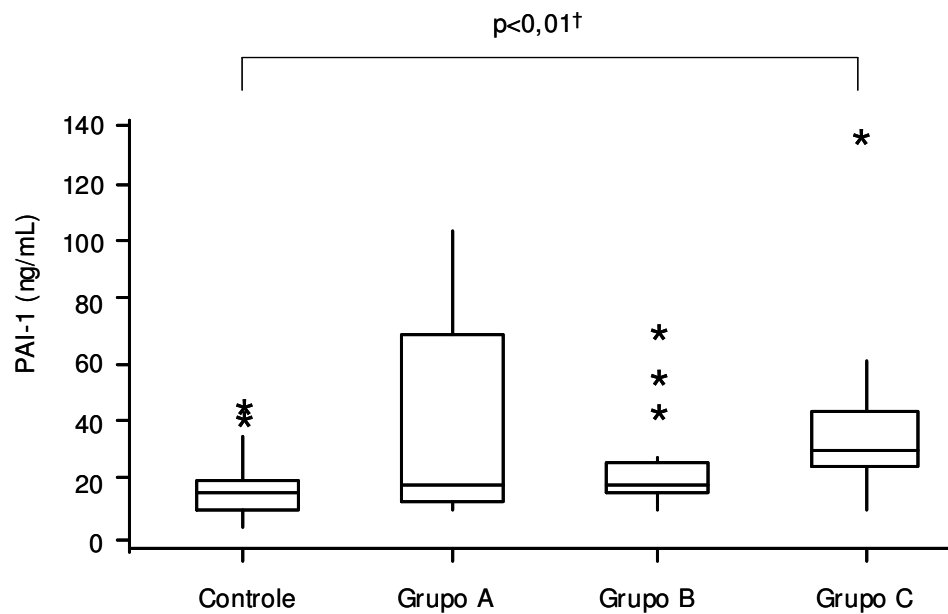
O nível plasmático do PAI-1 nos pacientes como um todo foi significativamente superior em relação ao grupo controle ( $p < 0,0001$ ), como demonstrado no Gráfico 5. Na análise por grupos, também houve diferença global significativa ( $p = 0,0001$ ). No teste de múltiplas comparações, os pacientes portadores de cardiopatia congênita apresentaram níveis significativamente elevados.



**Gráfico 5 - Nível plasmático do inibidor do ativador do plasminogênio (PAI-1) nos diferentes grupos, comparativamente aos controles. O grupo total representa o conjunto dos 60 pacientes; grupo A, todos os pacientes sem comunicações intracardíacas; os grupos B e C representam os pacientes com cardiopatia congênita. Os resultados estão apresentados em forma de 'box-plots'.**

†Correspondente ao teste de Dunn (múltiplas comparações)

Quando a análise foi feita com os pacientes portadores de cardiopatia congênita subdivididos em grupos B e C, ou seja, pacientes sem e com hipoxemia, também houve diferença global significativa em relação aos controles ( $p < 0,0001$ ). O teste de múltiplas comparações revelou aumento significativo no nível plasmático do PAI-1 no grupo de pacientes com hipoxemia (Gráfico 6).

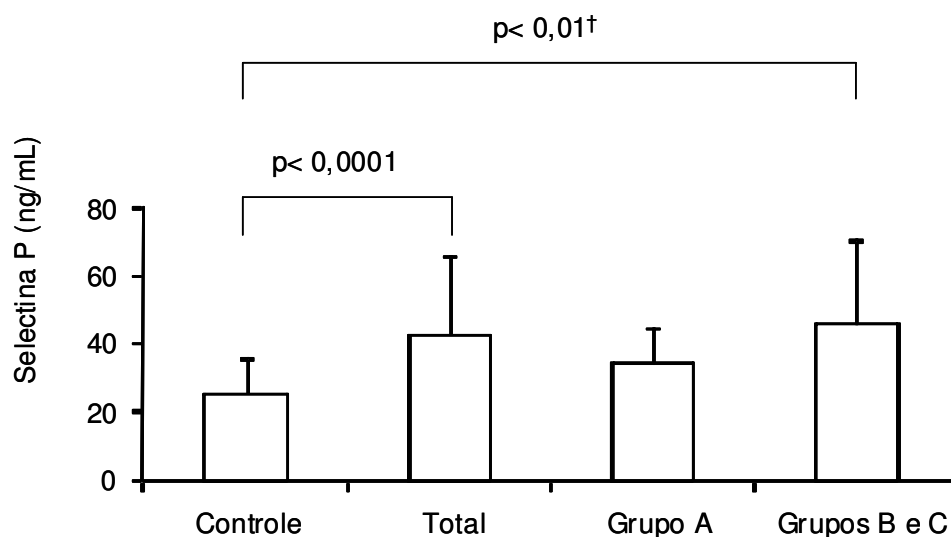


**Gráfico 6 - Nível plasmático do inibidor do ativador do plasminogênio (PAI-1) nos diferentes grupos diagnósticos, comparativamente ao grupo controle. O grupo A representa todos os pacientes sem comunicações intracardiácas; grupo B, pacientes com cardiopatia congênita sem hipoxemia ( $SpO_2 \geq 90\%$ ); e grupo C, pacientes com cardiopatia congênita com hipoxemia ( $SpO_2 < 90\%$ ). Os resultados são apresentados em forma de 'box-plots'.**

†Correspondente ao teste de Dunn (múltiplas comparações)

#### 4.3.1.4. Determinação do nível plasmático da selectina-P

O nível plasmático da selectina-P nos pacientes como um todo foi significativamente superior em relação ao grupo controle ( $p < 0,0001$ ), como demonstrado no Gráfico 7. Na análise por grupos, também houve diferença global significativa ( $p = 0,0001$ ). No teste de múltiplas comparações, os pacientes portadores de cardiopatia congênita apresentaram níveis plasmáticos significativamente elevados.

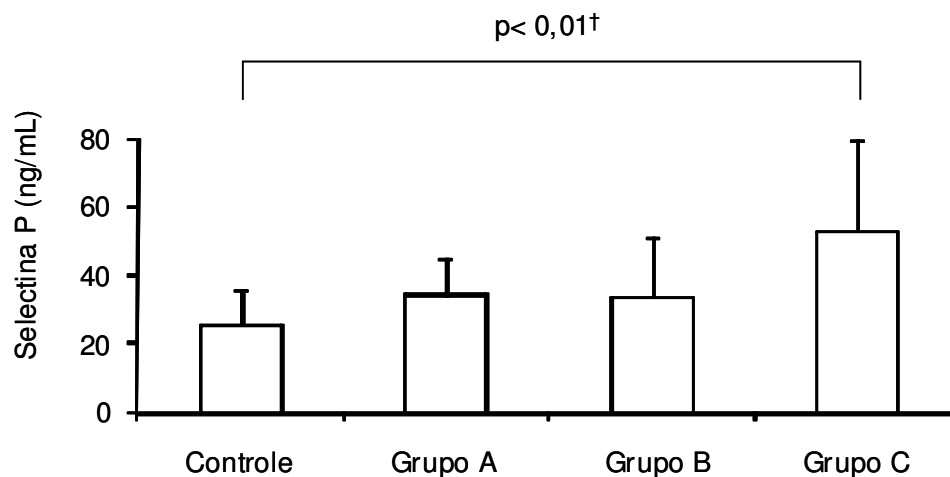


**Gráfico 7 -** Nível plasmático da selectina-P nos diferentes grupos, comparativamente aos controles. O grupo total representa o conjunto dos 60 pacientes; grupo A, todos os pacientes sem comunicações intracardiácas; os grupos B e C representam os pacientes com cardiopatia congênita. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão.

†Correspondente ao teste de Dunnet (múltiplas comparações)



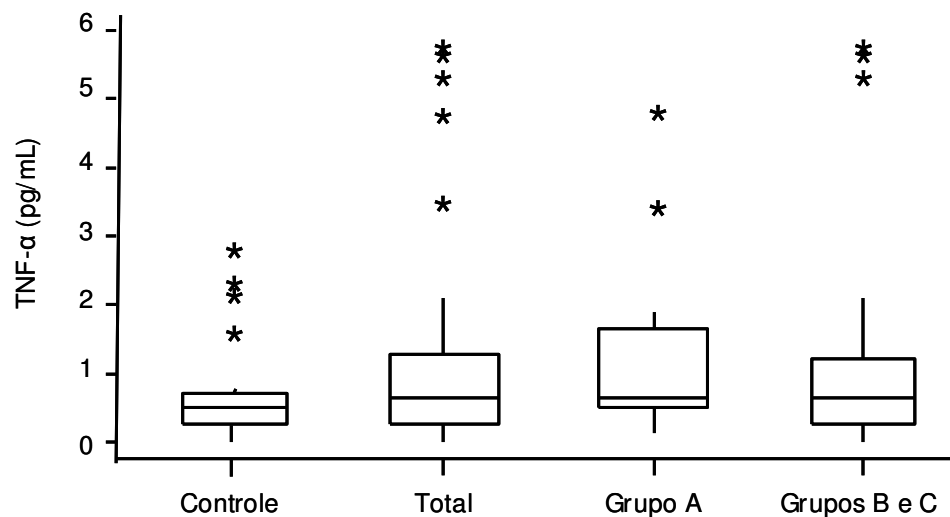
Quando a análise foi feita com os pacientes portadores de cardiopatia congênita subdivididos em grupos B e C, ou seja, sem e com hipoxemia, também houve diferença global significativa em relação aos controles ( $p < 0,0001$ ). O teste de múltiplas comparações revelou aumento significativo no nível plasmático da selectina-P no grupo de pacientes com hipoxemia (Gráfico 8).



**Gráfico 8 - Nível plasmático da selectina-P nos diferentes grupos diagnósticos, comparativamente aos controles. O grupo A representa todos os pacientes sem comunicações intracardíacas; grupo B, pacientes com cardiopatia congênita sem hipoxemia ( $SpO_2 \geq 90\%$ ); e grupo C, pacientes com cardiopatia congênita com hipoxemia ( $SpO_2 < 90\%$ ). Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. †Correspondente ao teste de Dunnet (múltiplas comparações)**

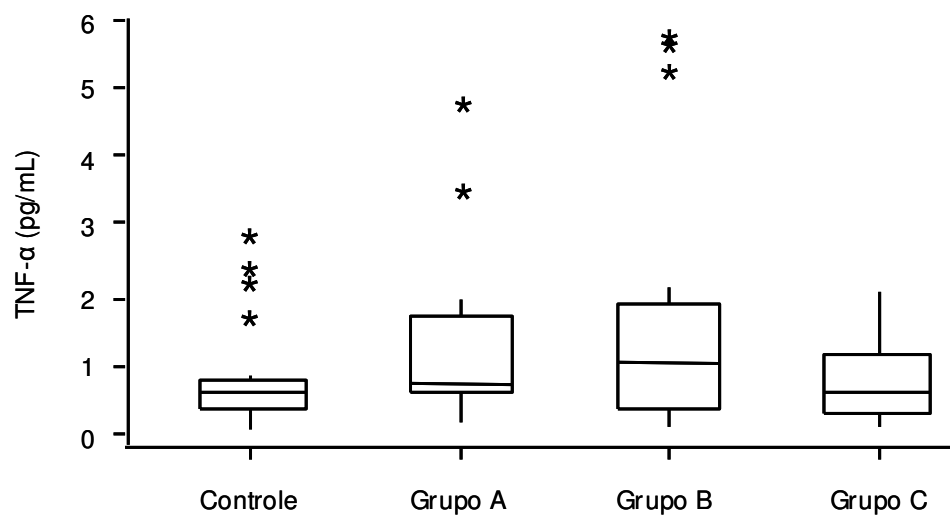
#### 4.3.1.5. Determinação do nível plasmático do fator de necrose tumoral

O nível plasmático do TNF- $\alpha$  nos pacientes como um todo, e na análise por grupos, não apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle, como se observa no Gráfico 9.



**Gráfico 9 -** Nível plasmático do fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) nos diferentes grupos, comparativamente aos controles. O grupo total representa o conjunto dos 60 pacientes; grupo A, todos os pacientes sem comunicações intracardíacas; os grupos B e C representam os pacientes com cardiopatia congênita. Os resultados estão apresentados em forma de 'box-plots'.

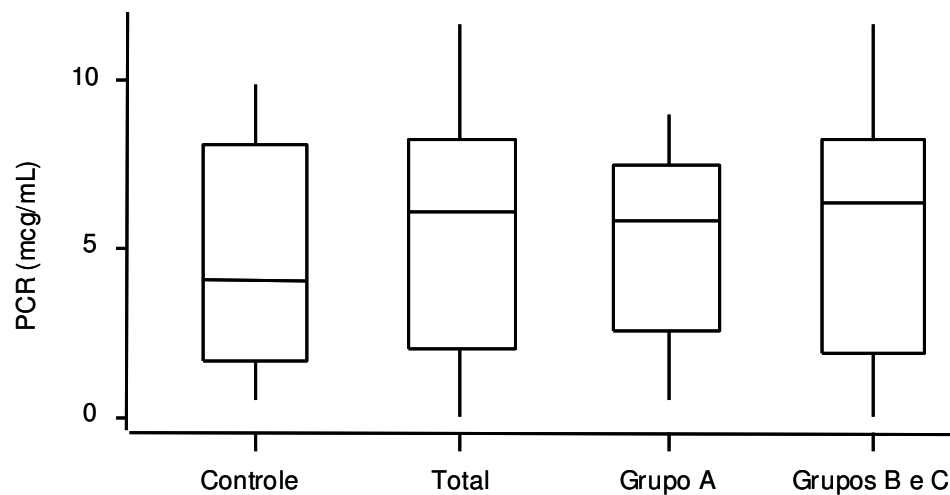
Quando a análise foi feita com os pacientes portadores de cardiopatia congênita subdivididos em grupos B e C, ou seja, sem e com hipoxemia, também não houve diferença significativa em relação aos controles (Gráfico 10).



**Gráfico 10 - Nível plasmático do fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) nos diferentes grupos diagnósticos, comparativamente aos controles. O grupo A representa todos os pacientes sem comunicações intracardíacas; grupo B, pacientes com cardiopatia congênita sem hipoxemia ( $SpO_2 \geq 90\%$ ); e grupo C, pacientes com cardiopatia congênita com hipoxemia ( $SpO_2 < 90\%$ ). Os resultados estão apresentados em forma de 'box-plots'.**

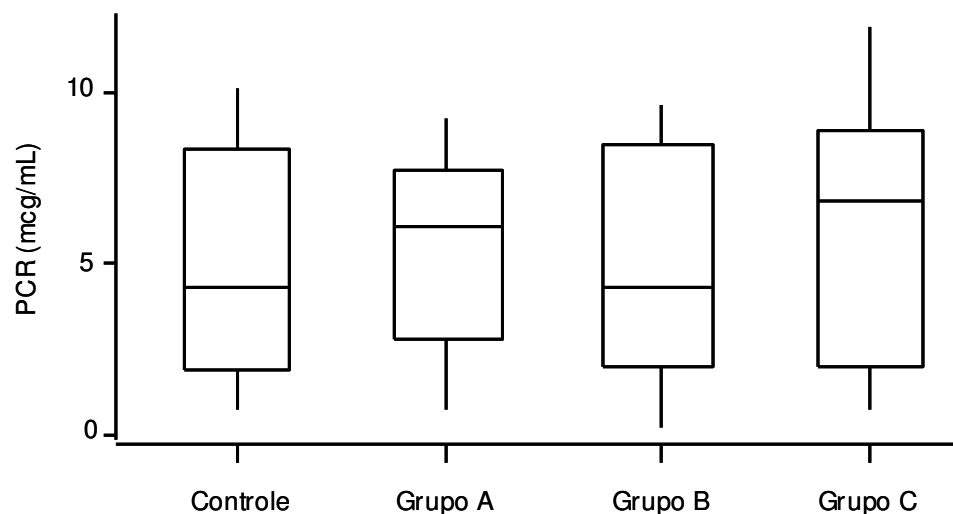
#### 4.3.1.6. Determinação do nível plasmático da proteína C reativa

O nível plasmático da PCR no total de pacientes, e na análise por grupos, não apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle, como se observa no Gráfico 11.



**Gráfico 11 - Nível plasmático da proteína C reativa (PCR) nos diferentes grupos, comparativamente aos controles. O grupo total representa o conjunto dos 60 pacientes; grupo A, todos os pacientes sem comunicações intracardíacas; os grupos B e C representam os pacientes com cardiopatia congênita. Os resultados estão apresentados em forma de 'box-plots'.**

Quando a análise foi feita com os pacientes portadores de cardiopatia congênita subdivididos em grupos B e C, ou seja, sem e com hipoxemia, também não houve diferença significativa (Gráfico 12).

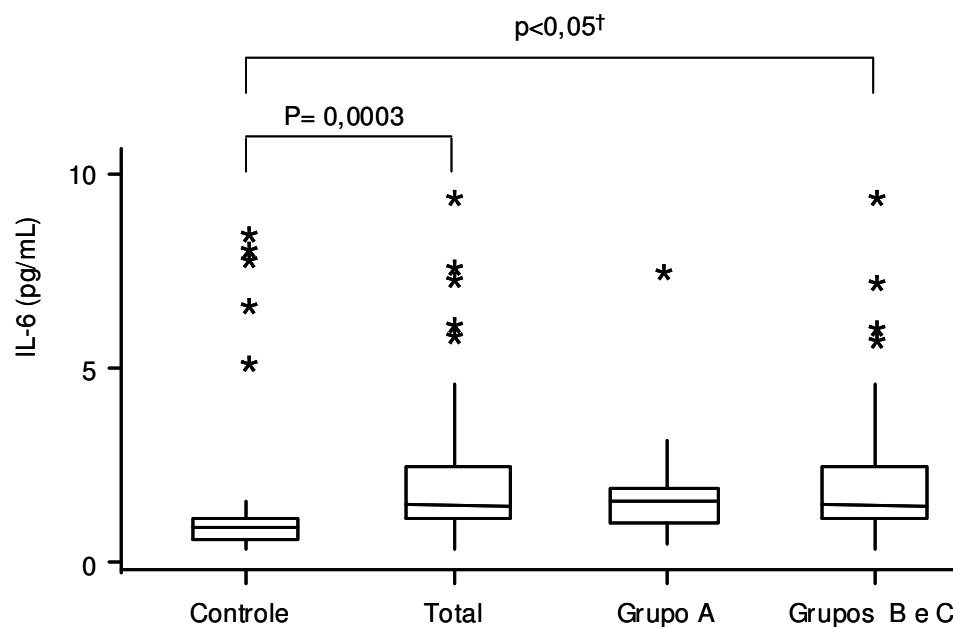


**Gráfico 12 - Nível plasmático da proteína C reativa (PCR) nos diferentes grupos diagnósticos, comparativamente aos controles. O grupo A representa todos os pacientes sem comunicações intracardiacas; grupo B, pacientes com cardiopatia congênita sem hipoxemia ( $SpO_2 \geq 90\%$ ); e grupo C, pacientes com cardiopatia congênita com hipoxemia ( $SpO_2 < 90\%$ ). Os resultados estão apresentados em forma de 'box-plots'.**

#### 4.3.1.7. Determinação do nível plasmático da interleucina-6

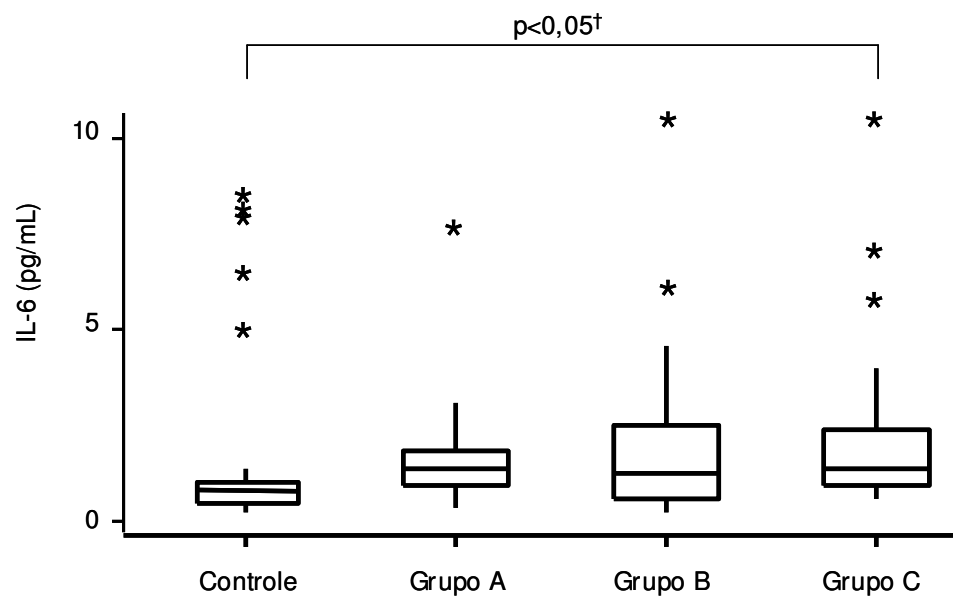
O nível plasmático da IL-6 em todos os pacientes foi significativamente superior em relação ao grupo controle ( $p=0,0003$ ), como demonstrado no

Gráfico 13. Na análise por grupos, também houve diferença global significativa ( $p=0,0014$ ). No teste de múltiplas comparações, os pacientes portadores de cardiopatia congênita apresentaram níveis plasmáticos significativamente elevados.



**Gráfico 13 - Nível plasmático da interleucina-6 (IL-6) nos diferentes grupos, comparativamente aos controles. O grupo total representa o conjunto dos 60 pacientes; grupo A, todos os pacientes sem comunicações intracardíacas; os grupos B e C representam os pacientes com cardiopatia congênita. Os resultados estão apresentados em forma de 'box-plots'. †Correspondente ao teste de Dunn (múltiplas comparações).**

Quando a análise foi feita com os pacientes portadores de cardiopatia congênita subdivididos em grupos B e C, ou seja, sem e com hipoxemia, também houve diferença global significativa em relação aos controles ( $p=0,0026$ ). O teste de múltiplas comparações revelou aumento significativo no nível plasmático da IL-6 no grupo de pacientes com hipoxemia (Gráfico 14).

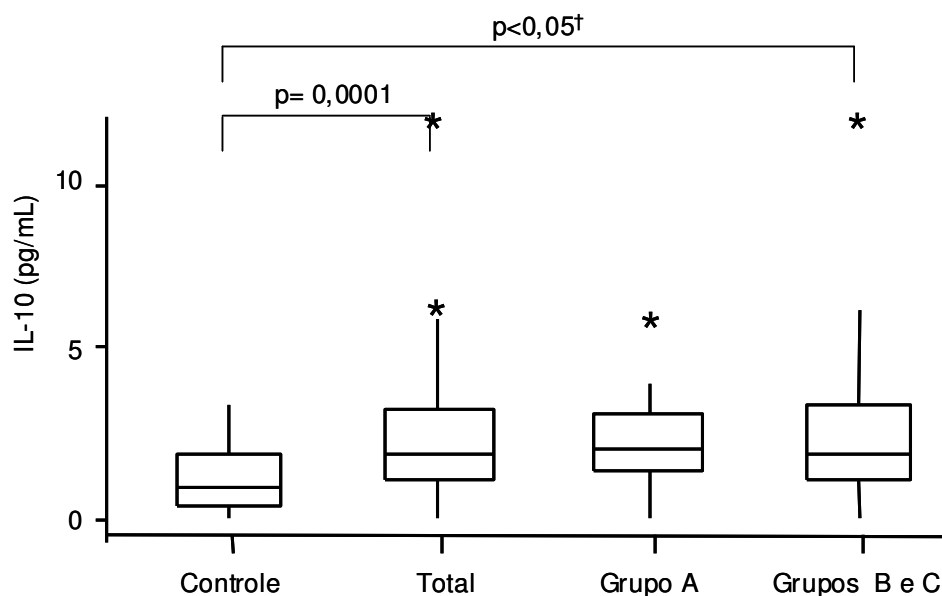


**Gráfico 14 - Nível plasmático da interleucina-6 (IL-6) nos diferentes grupos diagnósticos, comparativamente ao grupo controle. O grupo A representa todos os pacientes sem comunicações intracardíacas; grupo B, pacientes com cardiopatia congênita sem hipoxemia ( $SpO_2 \geq 90\%$ ); e grupo C, pacientes com cardiopatia congênita com hipoxemia ( $SpO_2 < 90\%$ ). Os resultados estão apresentados em forma de 'box-plots'.**

†Correspondente ao teste de Dunn (múltiplas comparações)

#### 4.3.1.8. Determinação do nível plasmático da interleucina-10

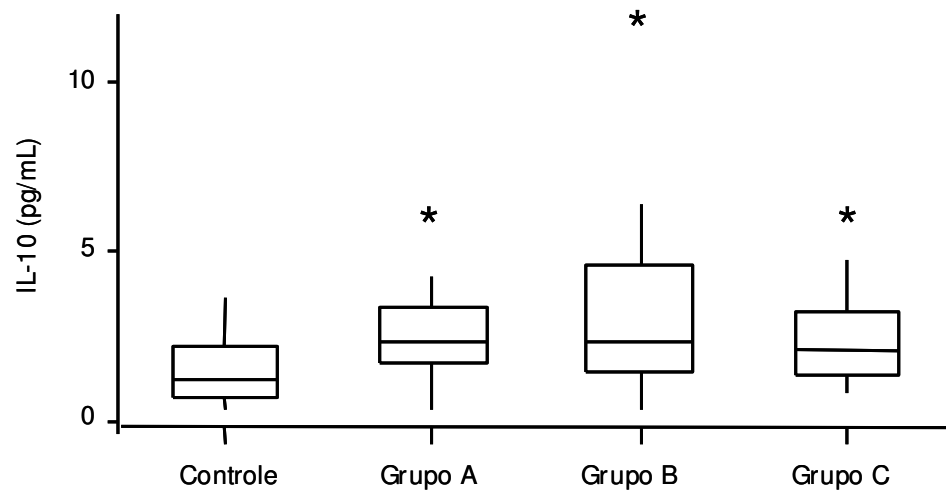
O nível plasmático da IL-10 nos pacientes como um todo foi significativamente superior em relação ao grupo controle ( $p=0,0001$ ), como demonstrado no Gráfico 15. Na análise por grupos, também houve diferença global significativa ( $p=0,0007$ ). No teste de múltiplas comparações, os pacientes portadores de cardiopatia congênita apresentaram níveis plasmáticos significativamente elevados.



**Gráfico 15 - Nível plasmático da interleucina-10 (IL-10) nos diferentes grupos, comparativamente aos controles. O grupo total representa o conjunto dos 60 pacientes; grupo A, todos os pacientes sem comunicações intracardíacas; os grupos B e C representam os pacientes com cardiopatia congênita. Os resultados estão apresentados em forma de 'box-plots'. †Correspondente ao teste de Dunnet (múltiplas comparações)**



Quando a análise foi feita com os portadores de cardiopatia congênita subdivididos em grupos B e C, ou seja, sem e com hipoxemia, também houve diferença global significativa em relação aos controles ( $p=0,0019$ ). Diferenças individuais, entretanto, não foram revelados pelo teste de múltiplas comparações (Gráfico 16).



**Gráfico 16 - Nível plasmático da interleucina-10 (IL-10) nos diferentes grupos diagnósticos, comparativamente ao grupo controle. O grupo A representa todos os pacientes sem comunicações intracardíacas; grupo B, pacientes com cardiopatia congênita sem hipoxemia ( $SpO_2 \geq 90\%$ ); e grupo C, pacientes com cardiopatia congênita com hipoxemia ( $SpO_2 < 90\%$ ). Os resultados são apresentados em forma de 'box-plots'.**

#### **4.3.2. Correlação dos marcadores de disfunção microvascular com variáveis clínicas de gravidade e prognóstico**

Os marcadores de disfunção microvascular foram analisados em relação às variáveis clínicas que estão implicadas em critérios de gravidade, como idade, SpO<sub>2</sub> em repouso e após esforço, e hematócrito, bem como de valor prognóstico, como a distância caminhada em seis minutos. Obteve-se correlação positiva do vWF:Ag ( $r = 0,28$  e  $p = 0,0325$ ) e da PCR ( $r_s = 0,29$  e  $p = 0,0259$ ) com a idade. Em repouso, tanto o t-PA ( $r = -0,29$  e  $p = 0,0259$ ) como a selectina-P ( $r = -0,26$  e  $p = 0,0435$ ) estiveram relacionados de maneira inversa com a SpO<sub>2</sub>. Entretanto, somente o t-PA relacionou-se, de maneira significativa, à SpO<sub>2</sub> após esforço físico ( $r = -0,27$  e  $p = 0,0348$ ). Além disso, tanto o t-PA como a selectina-P relacionaram-se de maneira direta com o nível do hematócrito (respectivamente,  $r = 0,43$  e  $p = 0,0006$ , e  $r = 0,53$  e  $p < 0,0001$ ). Finalmente, o PAI-1 mostrou-se inversamente relacionado à distância caminhada em seis minutos ( $r_s = -0,35$  e  $p = 0,0062$ ).

#### **4.4. Análise inferencial – Parte 2**

##### **4.4.1. Efeitos da intervenção terapêutica sobre a disfunção microvascular e variáveis clínicas**

Foi analisado o efeito da intervenção terapêutica com rosuvastatina sobre as variáveis clínicas e os marcadores de disfunção microvascular. Procedeu-se à randomização dos pacientes, como descrito em MÉTODOS. Os pacientes foram incluídos de forma sequencial, aos pares, levando-se em consideração características como idade, SpO<sub>2</sub>, presença de síndrome, uso de vasodilatador específico (sildenafil), entre outras. Na Tabela 3, pode-se observar o efeito da randomização, com características semelhantes entre os pacientes selecionados para uso de estatina ou placebo, em relação a variáveis clínicas e aos marcadores de disfunção microvascular. Não houve diferença significativa entre os dois grupos, na etapa pré-tratamento.

**Tabela 3 - Dados dos grupos placebo e rosuvastatina na condição basal**

	Placebo (N=30)	Rosuvastatina (N=30)
Idade (anos)	33,7 (11,1)	34,7 (12,3)
Distância caminhada em 6 minutos (metros)	415 (110)	416 (103)
SpO <sub>2</sub> repouso (%)	91 (4)	90 (6)
SpO <sub>2</sub> pós-esforço (%)	78 (12)	74 (17)
vWF:Ag (U/dL)	122,02 (23,79)	122,34 (22,35)
t-PA (ng/mL)	9,00 (4,04)	8,14 (3,89)
PAI-1 (ng/mL)	23,94 (9,69;134,71)	24,53 (9,85;103,28)
Selectina-P (ng/mL)	45,70 (26,81)	39,93 (18,50)
TNF- $\alpha$ (pg/mL)	0,71 (0,11;5,61)	0,82 (0,12;5,54)
PCR (mcg/mL)	6,28 (0,18;10,95)	6,23 (0,36;11,80)
IL-6 (pg/mL)	1,46 (0,40;10,58)	1,51 (0,37;10,55)
IL-10 (pg/mL)	2,23 (0,04;11,88)	1,67 (0,04;5,94)

IL-6, interleucina-6; IL-10, interleucina-10; PAI-1, inibidor do ativador do plasminogênio; PCR, proteína C reativa; SpO<sub>2</sub>, saturação periférica de oxigênio; TNF- $\alpha$ , fator de necrose tumoral; t-PA, ativador do plasminogênio tecidual; vWF:Ag, antígeno do fator de von Willebrand.

Valores do vWF:Ag, t-PA e selectina-P expressos em média e desvio padrão; valores do PAI-1, TNF- $\alpha$ , PCR, IL-6 e IL-10 expressos em mediana, e limites inferior e superior

Os pacientes foram tratados com rosuvastatina por via oral, na dose de 10 mg, uma vez ao dia, ou placebo, por um período de 180 dias. A medicação, em embalagens com 30 comprimidos, era fornecida durante avaliação mensal (mais precisamente, a cada 28 dias). Nessa mesma avaliação, eram realizados os questionamentos sobre aderência ao tratamento, eventos adversos e estado clínico do paciente. Solicitava-se aos pacientes a devolução da embalagem fornecida no mês anterior, com o objetivo de confirmar a aderência ou não ao uso da medicação. Após a avaliação, o paciente realizava o controle habitual da anticoagulação e do hematócrito, quando indicado.

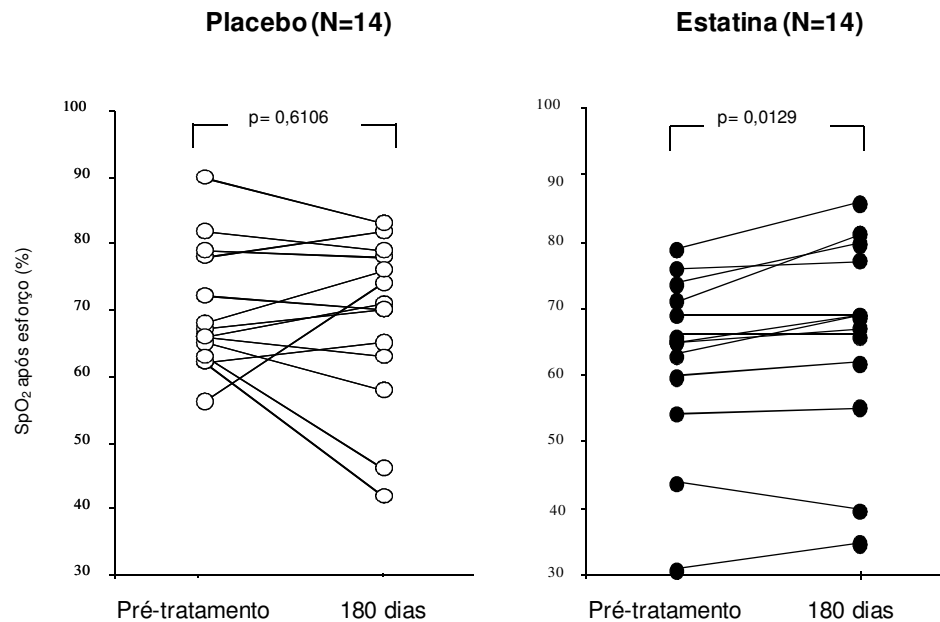
No momento da entrada no estudo, e ao completar 30, 90 e 180 dias, além da avaliação supracitada, o paciente foi submetido à coleta de amostra sanguínea para a determinação dos marcadores bioquímicos. Também foi realizado o teste de caminhada de seis minutos, com registros da SpO<sub>2</sub> e frequência cardíaca, no repouso e após o término do exercício.

Todos os pacientes completaram o tempo de tratamento estabelecido, comparecendo às consultas mensalmente, e informando sobre a aderência ao tratamento. A falha na tomada de dois ou mais comprimidos ao mês ocorreu em 7% das vezes. Em relação aos eventos adversos, quatro pacientes apresentaram sintomas como mialgia ou dor em articulações (pacientes de número 3, 13, 21 e 41, Tabela 1), porém exames laboratoriais realizados por medidas de precaução, ao longo do tratamento, não demonstraram alteração. Por outro lado, seis pacientes (de número 1, 19, 27, 29, 54 e 60) apresentaram alteração nos exames supracitados, porém com ausência de sintomas, e normalização dos exames nas medidas subsequentes. Assim, não houve indicação de redução ou suspensão da medicação em nenhum dos pacientes. Não houve óbitos nesse período.

#### **4.4.1.1. Efeito do tratamento sobre as variáveis clínicas**

A análise comparativa dos grupos placebo e rosuvastatina (N=30 em cada grupo) não mostrou diferença significativa na distância caminhada em

seis minutos ou na  $SpO_2$  (repouso e após esforço) ao longo dos seis meses de observação. Entretanto, nos 28 pacientes portadores de HAP associada a cardiopatia congênita com hipoxemia (grupo C), os 14 pacientes tratados com rosuvastatina apresentaram melhora significativa ( $p=0,0129$ ) nos níveis de  $SpO_2$  após esforço, em relação aos 14 tratados com placebo ( $p=0,6106$ ) (Gráfico 17).



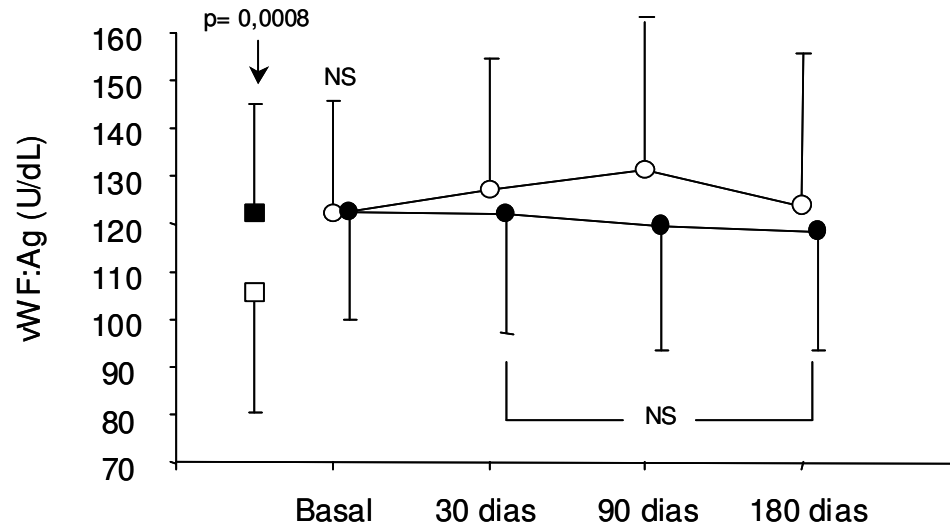
**Gráfico 17 - Saturação periférica de oxigênio ( $SpO_2$ ) após esforço, nos 28 pacientes com cardiopatia congênita com hipoxemia ( $SpO_2 < 90\%$ ), nas condições pré-tratamento e após 180 dias de uso de rosuvastatina.**

#### **4.4.1.2. Efeito do tratamento sobre os marcadores de disfunção microvascular**

Os níveis plasmáticos de todos os marcadores, obtidos em diferentes tempos, ou seja, após 30, 90 e 180 dias, foram analisados comparativamente entre os grupos rosuvastatina e placebo. Resultados individuais encontram-se dispostos nos anexos **9 a 16**.

##### **4.4.1.2.1. Efeito do tratamento sobre o nível plasmático do antígeno do fator de von Willebrand**

A análise do nível plasmático do vWF:Ag não demonstrou diferença significativa entre os grupos de tratamento (gráfico **18**).

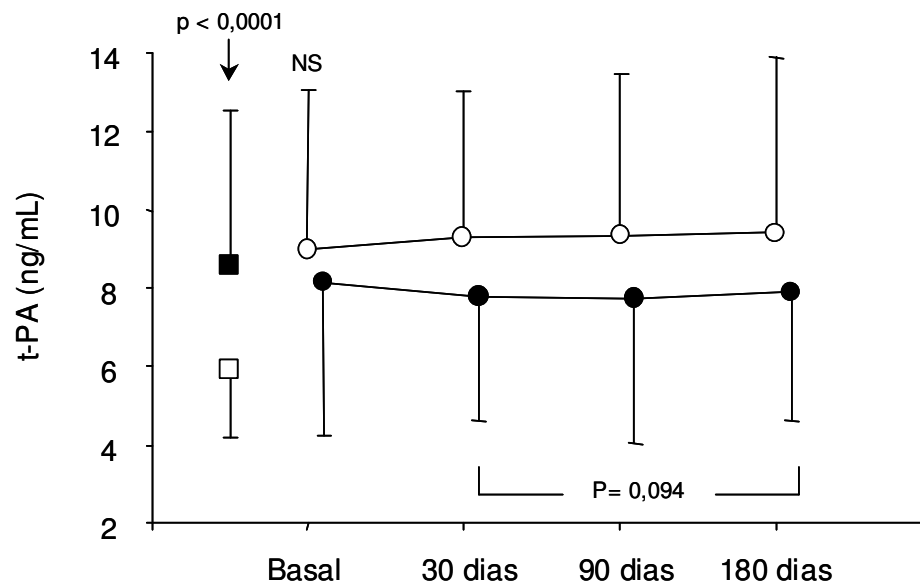


**Gráfico 18 - Nível plasmático do antígeno do fator de von Willebrand (vWF:Ag). À esquerda, todos os pacientes com hipertensão arterial pulmonar (N=60, quadrado cheio) em relação aos controles (N=38, quadrado vazio). No restante do gráfico, grupos rosuvastatina (N=30, círculos cheios) e placebo (N=30, círculos vazios), na condição pré-tratamento e ao longo deste. Os resultados estão apresentados em média e desvio padrão.**



#### 4.4.1.2.2. Efeito do tratamento sobre o nível plasmático do ativador tecidual do plasminogênio

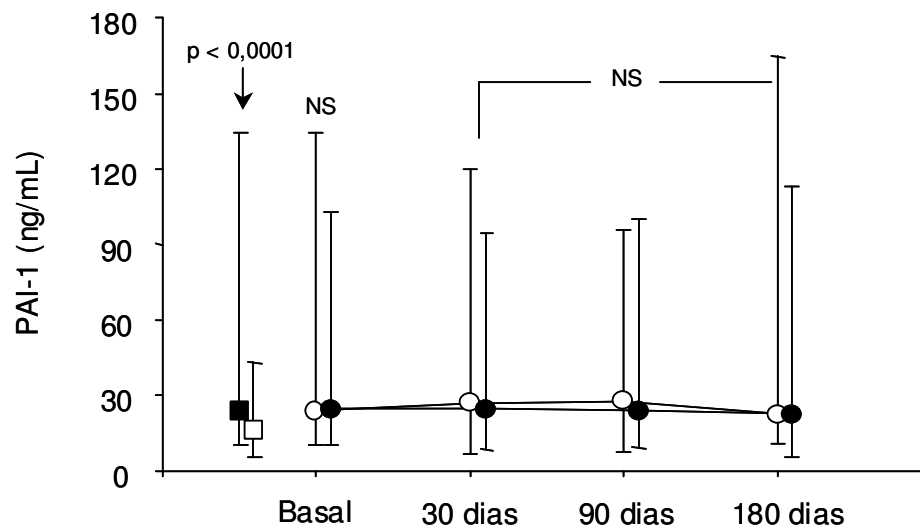
No período de tratamento, houve tendência à redução no nível plasmático do t-PA ( $p=0,094$ ), no grupo rosuvastatina, comparativamente ao placebo (gráfico 19).



**Gráfico 19 -** Nível plasmático do ativador tecidual do plasminogênio (t-PA). À esquerda, todos os pacientes com hipertensão arterial pulmonar (N=60, quadrado cheio) em relação aos controles (N=38, quadrado vazio). No restante do gráfico, grupos rosuvastatina (N=30, círculos cheios) e placebo (N=30, círculos vazios), na condição pré-tratamento e ao longo deste. Os resultados estão apresentados em média e desvio padrão.

#### 4.4.1.2.3. Efeito do tratamento sobre o nível plasmático do inibidor do ativador do plasminogênio

A análise do nível plasmático do PAI-1 não demonstrou diferença significativa entre os grupos de tratamento (gráfico 20).



**Gráfico 20 - Nível plasmático do inibidor do ativador do plasminogênio (PAI-1).** À esquerda, todos os pacientes com hipertensão arterial pulmonar (N=60, quadrado cheio) em relação aos controles (N=39, quadrado vazio). No restante do gráfico, grupos rosuvastatina (N=30, círculos cheios) e placebo (N=30, círculos vazios), na condição pré-tratamento e ao longo deste. Os resultados estão representados como mediana, e limites inferior e superior.

#### 4.4.1.2.4. Efeito do tratamento sobre o nível plasmático da selectina-P

A análise da selectina-P plasmática mostrou diferença entre os grupos de tratamento ( $p=0,037$ ), com níveis significativamente inferiores no grupo rosuvastatina em relação ao placebo (gráfico 21).

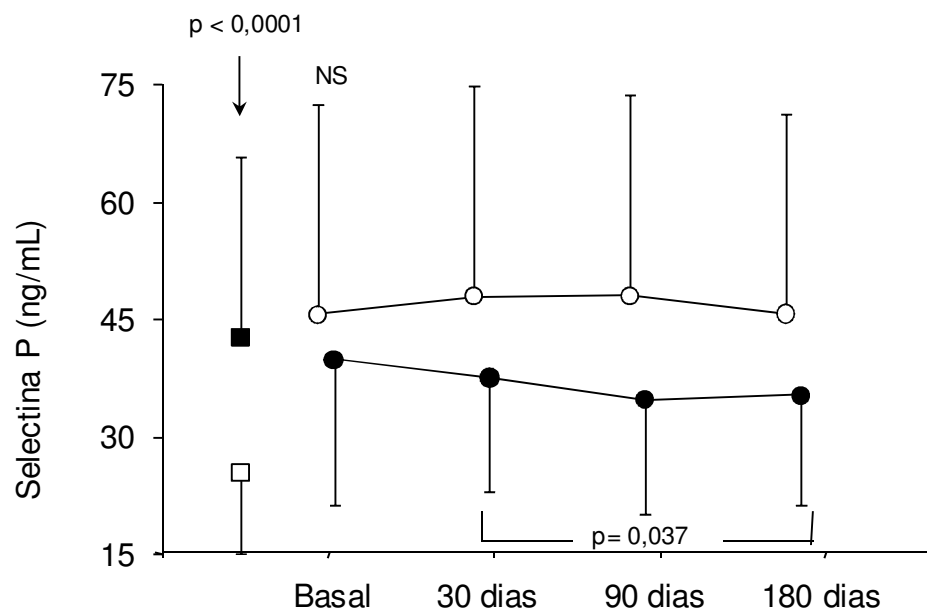


Gráfico 21 - Nível plasmático da selectina-P. À esquerda, todos os pacientes com hipertensão arterial pulmonar (N=60, quadrado cheio) em relação aos controles (N=31, quadrado vazio). No restante do gráfico, grupos rosuvastatina (N=30, círculos cheios) e placebo (N=30, círculos vazios), na condição pré-tratamento e ao longo deste. Os resultados estão apresentados em média e desvio padrão.

#### 4.4.1.2.5. Efeito do tratamento sobre o nível plasmático do fator de necrose tumoral

A análise do nível plasmático do TNF- $\alpha$  não mostrou diferença entre os grupos rosuvastatina e placebo no curso do tratamento (gráfico 22).

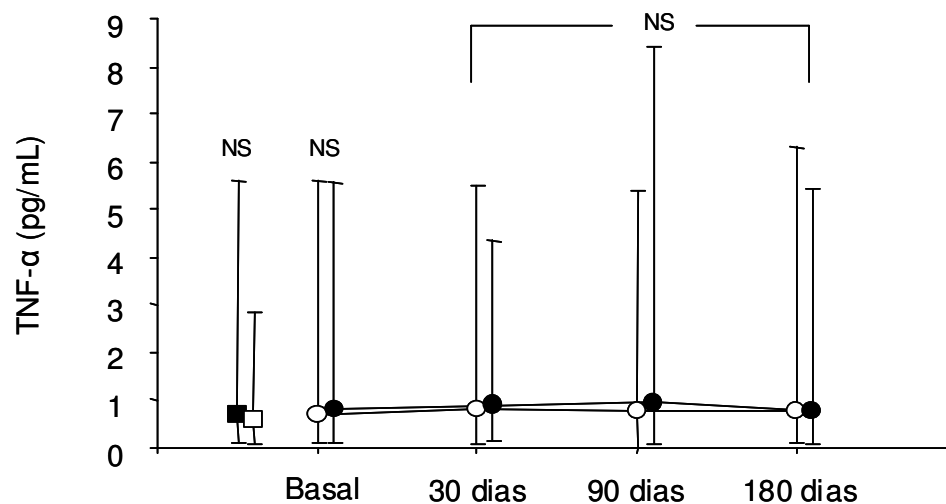
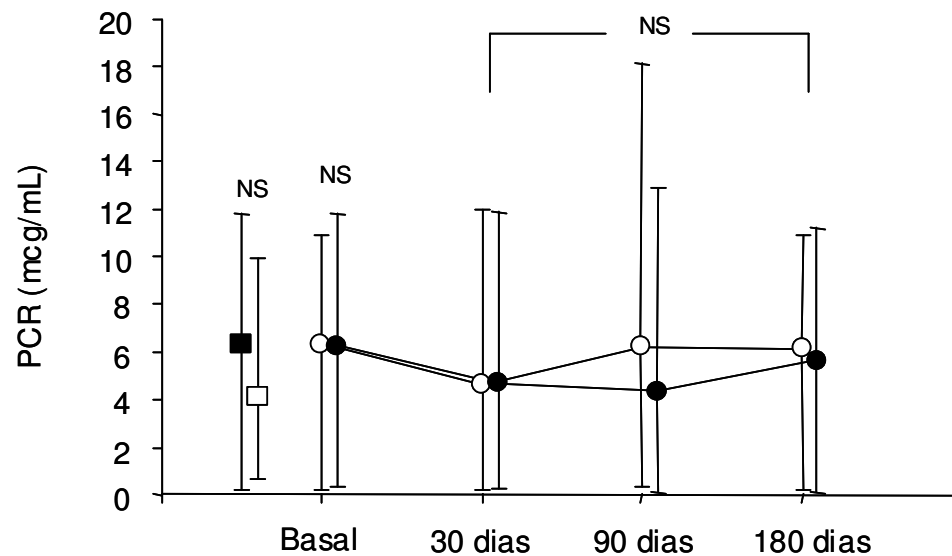


Gráfico 22 - Nível plasmático do fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ). À esquerda, todos os pacientes com hipertensão arterial pulmonar (N=60, quadrado cheio) em relação aos controles (N=28, quadrado vazio). No restante do gráfico, grupos rosuvastatina (N=30, círculos cheios) e placebo (N=30, círculos vazios), na condição pré-tratamento e ao longo deste. Os resultados estão representados como mediana, e limites inferior e superior.

#### 4.4.1.2.6. Efeito do tratamento sobre o nível plasmático da proteína C reativa

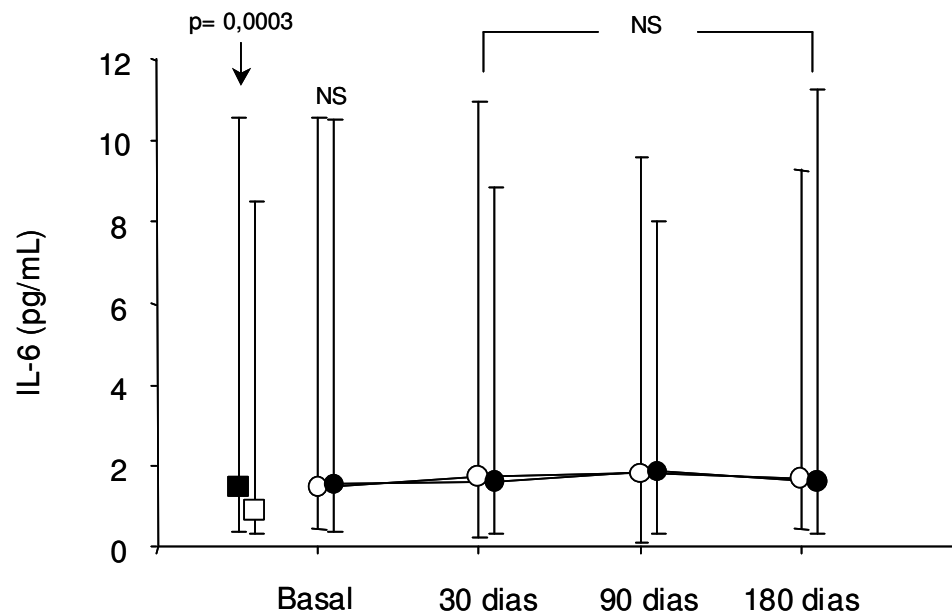
Quando analisado o nível plasmático da PCR, não se demonstrou diferença entre os grupos rosuvastatina e placebo, no curso do tratamento (gráfico 23).



**Gráfico 23 -** Nível plasmático da proteína C reativa (PCR. À esquerda, todos os pacientes com hipertensão arterial pulmonar (N=60, quadrado cheio) em relação aos controles (N=32, quadrado vazio). No restante do gráfico, grupos rosuvastatina (N=30, círculos cheios) e placebo (N=30, círculos vazios), na condição pré-tratamento e ao longo deste. Os resultados estão representados como mediana, e limites inferior e superior.

#### 4.4.1.2.7. Efeito do tratamento sobre o nível plasmático da interleucina-6

A análise do nível plasmático da IL-6 não demonstrou diferença significativa entre os grupos de tratamento (gráfico 24).



**Gráfico 24 - Nível plasmático da interleucina-6 (IL-6).** À esquerda, todos os pacientes com hipertensão arterial pulmonar (N=60, quadrado cheio) em relação aos controles (N=35, quadrado vazio). No restante do gráfico, grupos rosuvastatina (N=30, círculos cheios) e placebo (N=30, círculos vazios), na condição pré-tratamento e ao longo deste. Os resultados estão representados como mediana, e limites inferior e superior.

#### 4.4.1.2.8. Efeito do tratamento sobre o nível plasmático da interleucina-10

A análise do nível plasmático da IL-10 não demonstrou diferença significativa entre os grupos de tratamento (gráfico 25).

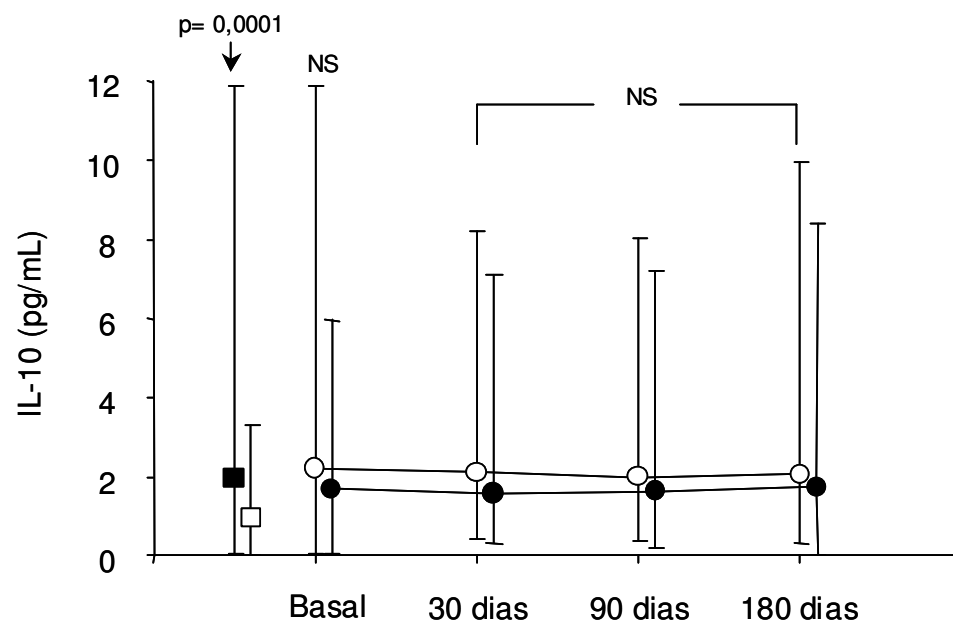


Gráfico 25 - Nível plasmático da interleucina-10 (IL-10). À esquerda, todos os pacientes com hipertensão arterial pulmonar (N=60, quadrado cheio) em relação aos controles (N=32, quadrado vazio). No restante do gráfico, grupos rosuvastatina (N=30, círculos cheios) e placebo (N=30, círculos vazios), na condição pré-tratamento e ao longo deste. Os resultados estão representados como mediana, e limites inferior e superior.

## **4.5. Análise inferencial – Parte 3**

### **4.5.1. Período de acompanhamento ambulatorial**

A terceira parte do estudo corresponde ao seguimento ambulatorial dos pacientes. A partir da entrada na etapa anterior do estudo (comparação do tratamento com estatina *versus* placebo), e incluindo o período de 180 dias daquele, os pacientes se mantiveram em acompanhamento de forma prospectiva e sistematizada. Os pacientes que fizeram parte do grupo com estatina permaneceram em uso da medicação, e aqueles do grupo placebo passaram a utilizá-la a partir de então. O seguimento ambulatorial dos pacientes transcorreu do período de julho de 2005 até setembro de 2009. Ao longo desse período, foi iniciado o programa da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo – SES-SP, com a finalidade de fornecer medicação específica para HAP. Sendo assim, alguns pacientes foram incluídos nesse programa, passando a utilizar os medicamentos sildenafil (inibidor da enzima fosfodiesterase-5) e bosentana (antagonista do receptor da endotelina-1) de forma isolada ou em associação. A evolução dos pacientes com HAP idiopática, hereditária ou associada a cardiopatia congênita corrigida (grupo A) e dos pacientes com HAP associada a cardiopatia congênita não submetidos a tratamento cirúrgico (grupos B e C), é analisada a seguir.



#### **4.5.1.1. Pacientes com HAP idiopática, hereditária ou associada a cardiopatia congênita corrigida**

Os 14 pacientes desse grupo foram acompanhados por um período de 0,7 a 3,8 anos (mediana 3,5 anos). Os retornos ambulatoriais eram trimestrais ou mensais, de acordo com a necessidade. Todos se mantiveram sob medidas de tratamento geral, com anticongestivos e anticoagulação oral. Alguns pacientes já estavam em uso de medicação específica para HAP quando da entrada no estudo (pacientes de número 17, 18, 21, 22, 23 e 24, Tabela 1). Cinco dos demais (pacientes de número 28, 42, 49, 53 e 54, Tabela 1) foram incluídos no programa e iniciaram o uso de drogas para HAP.

A maioria dos pacientes permaneceu estável durante o período de acompanhamento. Apenas três apresentaram piora da classe funcional: pacientes de número 22, 24 e 49 da Tabela 1. Este último desenvolveu trombose pulmonar bilateral apesar da anticoagulação oral, evoluindo de classe funcional I para III. Houve três óbitos no grupo. Os pacientes de número 22 e 24 da Tabela 1 (citados anteriormente) apresentaram piora progressiva da classe funcional e foram introduzidos em lista de espera para transplante pulmonar, tendo ambos evoluído para óbito antes (paciente de número 24) ou depois (paciente de número 22) do procedimento. O paciente de número 18 da Tabela 1, apesar de evolução estável, em classe funcional

II, faleceu em outro Estado, não tendo sido possível a obtenção de dados concretos sobre o óbito.

#### **4.5.1.2. Pacientes com HAP associada à cardiopatia congênita**

##### **4.5.1.2.1. Aspectos descritivos do seguimento e sobrevida**

Os 46 pacientes com cardiopatia congênita não operada, que fizeram parte da etapa anterior, sendo 18 e 28, respectivamente, sem e com hipoxemia ( $SpO_2 < 90\%$ ), foram acompanhados com vistas à análise de sobrevida. Devido à randomização na etapa anterior, 23 pacientes usaram placebo e 23, estatina, nos primeiros seis meses. O tempo de seguimento foi de 0,7 a 4 anos (mediana 3,6 anos). Os dados demográficos e funcionais de entrada no estudo, que foram levados em conta na análise de sobrevida, encontram-se resumidos na Tabela 4.

**Tabela 4 - Dados demográficos e funcionais dos pacientes portadores de HAP associada a cardiopatia congênita, não operados (N=46)**

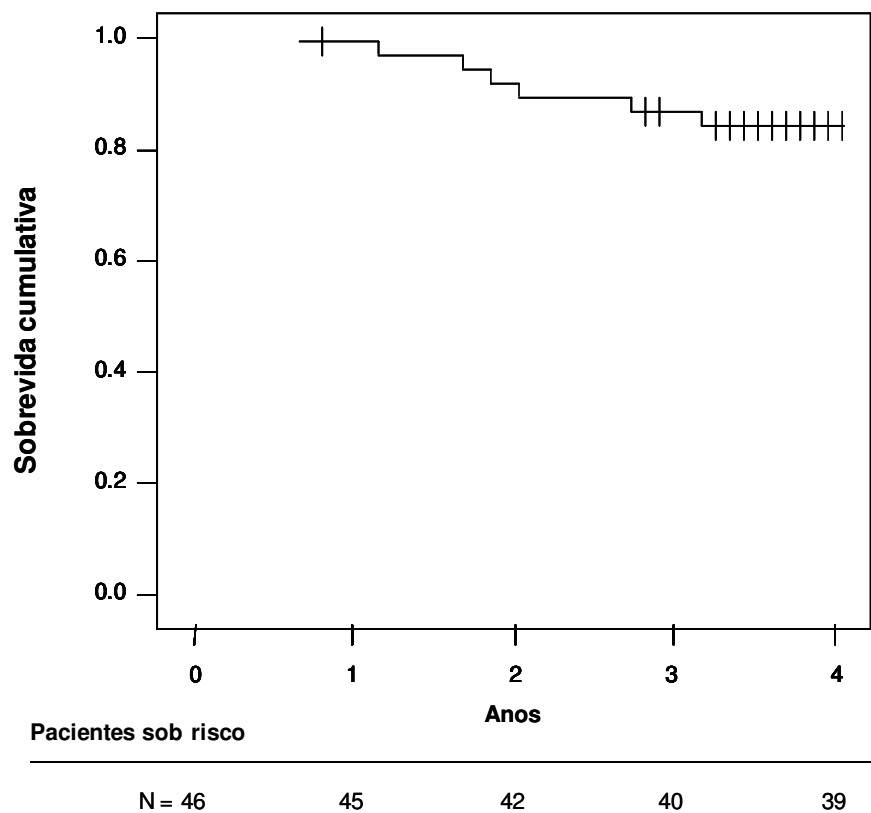
Idade (anos)	33,5 (15,0; 60,2)*
Gênero : masculino	29:17
Sem hipoxemia: com hipoxemia	18:28
Classe funcional (II : III)	38:08
Pressão sistólica arterial pulmonar (mmHg)	97 ( 25) <sup>†</sup>
Pressão média arterial pulmonar (mmHg)	52 (17) <sup>†</sup>
Saturação periférica de oxigênio em repouso (%)	89 (79; 96)*
Saturação periférica de oxigênio após esforço (%)	71 (31; 94)*
Distância caminhada em seis minutos (metros)	402 (112) <sup>†</sup>
Hematócrito (%)	52 (37; 79)*

\*Dados expressos em mediana, e limites inferior e superior

<sup>†</sup>Dados expressos em média e desvio padrão

A maioria dos pacientes encontrava-se em classe funcional II na entrada, permanecendo estável durante o tempo de seguimento. Semelhantemente ao grupo anterior, os retornos ambulatoriais eram trimestrais ou mensais, de acordo com a necessidade, sendo os pacientes mantidos sob medidas de tratamento geral, com anticongestivos e anticoagulação oral. Dois pacientes já estavam em uso de droga específica para HAP quando da entrada no estudo (pacientes de número 19 e 20, Tabela 1). Dezenove pacientes foram incluídos no programa da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo – SES-SP, para iniciar o uso de medicamento específico para HAP, por piora da classe funcional (pacientes de número 9, 11, 26, 30, 40, 43, 45 e 46, Tabela 1) ou da hipoxemia (pacientes de número 2, 3, 6, 10, 12, 14, 16, 38, 48, 52 e 56, Tabela 1).

Sete pacientes evoluíram para óbito, sendo quatro por insuficiência cardíaca direita (pacientes de número 9, 11, 44 e 46, Tabela 1) e três por trombose arterial pulmonar (pacientes de número 26, 36 e 39, Tabela 1). Em relação à capacidade funcional nos demais, apenas o paciente de número 40 apresentou piora ao final do estudo, em relação à condição basal. No gráfico 26, encontra-se a curva de sobrevida correspondente aos 46 pacientes desse grupo.



**Gráfico 26 - Curva de sobrevida de Kaplan-Meier dos pacientes com HAP associada a cardiopatia congênita, não operados. Ao final do quarto ano de seguimento, a sobrevida alcançada foi de 85%. (+) representa casos censurados.**

#### 4.5.1.2.2. Variáveis com possível impacto na sobrevida

As variáveis clínicas e sobretudo as funcionais, apresentadas na Tabela 4, foram testadas. Além disso, o uso de drogas específicas para HAP, assim como o tempo de tratamento, foram levados em consideração na análise de sobrevida. Considerando que 23 pacientes haviam usado estatina no período inicial do estudo, esta variável foi também investigada de forma categórica. Não houve, porém, associação significativa entre essas variáveis e a sobrevida.

Os níveis plasmáticos dos marcadores de disfunção endotelial (vWF:Ag, t-PA, PAI-1 e selectina-P) se mostraram significativamente elevados em comparação aos controles, no início do estudo estatina *versus* placebo, assim permanecendo nas determinações feitas ao longo dos seis meses de tratamento. Semelhantemente, os marcadores inflamatórios IL-6 e IL-10 apresentaram elevação significativa de seus níveis plasmáticos em relação aos controles. Na Tabela 5, estão apresentados os resultados das determinações bioquímicas realizadas ao longo dos seis meses iniciais (fase do estudo com estatina). Os dados referentes ao grupo controle estão representados em mediana, e limites inferior e superior; também são fornecidos os valores correspondentes aos percentis superiores 90 e 95, utilizados como nível de “corte” na análise de sobrevida. Quanto aos pacientes, são apresentados resultados correspondentes ao momento de entrada no estudo (valor basal), assim como o valor médio das quatro

determinações feitas ao longo dos seis meses. Observa-se, de forma semelhante aos valores basais, que o nível plasmático de seis das proteínas foi aumentado. Verifica-se ainda que o nível plasmático de IL-10 esteve elevado em relação ao TNF $\alpha$ , o que sugere uma resposta de citocinas predominantemente do tipo Th2.

**Tabela 5 - Níveis plasmáticos dos marcadores de disfunção microvascular em comparação aos controles**

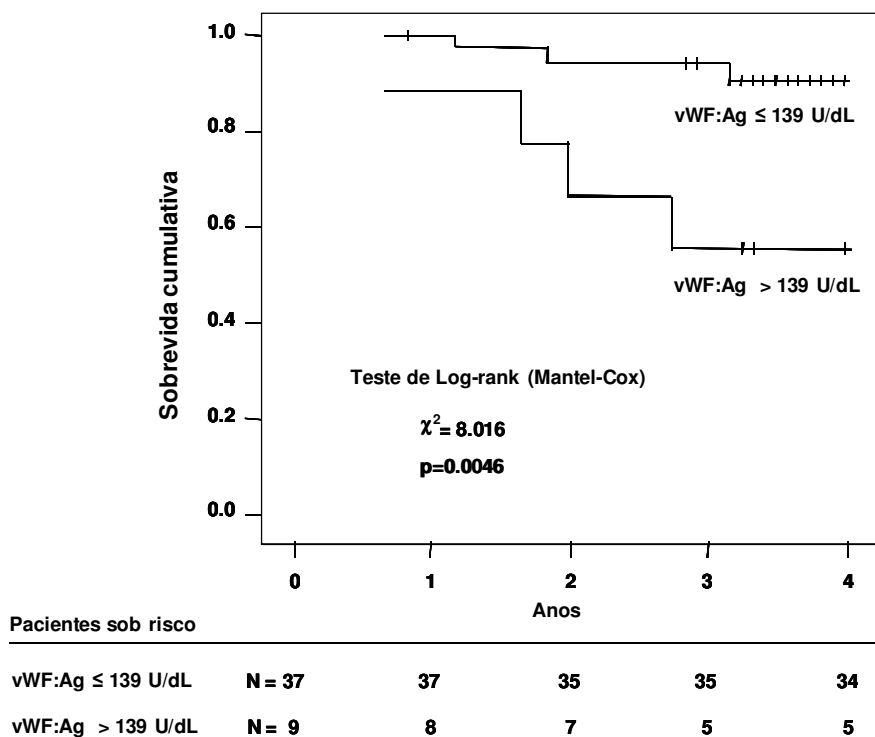
		vWF:Ag U/dL	t-PA ng/mL	PAI-1 ng/mL	Selectina-P ng/mL	PCR mcg/mL	TNF- $\alpha$ pg/mL	IL-6 pg/mL	IL-10 pg/mL
<i>Controles</i>	Mediana	109	5,58	16,46	24,79	4,14	0,6	0,9	0,94
	Mínimo	62	2,87	5,23	8,82	0,67	0,08	0,29	0,003
	Máximo	147	10,25	42,88	53,96	9,91	2,86	8,48	3,32
	Percentil 90	135	8,5	35,28	39,66	9,45	2,25	6,57	2,37
	Percentil 95	139	9,7	41,15	49,84	9,76	2,86	8,02	2,58
<i>Pacientes (valor basal)</i>	Mediana	123	7,82	24,53	43,12	6,50	0,70	1,44	1,94
	Mínimo	73	3,01	9,69	10,71	0,18	0,11	0,37	0,04
	Máximo	177	23,93	134,71	136,94	11,80	5,61	10,58	11,88
<i>Pacientes (valor médio*)</i>	Mediana	125	7,72	25,25	42,70	6,04	0,84	1,80	1,89
	Mínimo	60	4,11	10,54	11,51	0,23	0,13	0,34	0,42
	Máximo	197	21,67	127,55	138,12	13,00	5,93	8,67	6,24
<i>Valor basal vs controles<sup>†</sup></i>		0,0025	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,4961	0,3492	0,0006	0,0003
<i>Valor médio vs controles<sup>†</sup></i>		0,0015	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,5355	0,2244	<0,0001	0,0002

IL-6, interleucina-6; IL-10, interleucina-10; PAI-1, inibidor do ativador do plasminogênio; PCR, proteína C reativa; TNF- $\alpha$ , fator de necrose tumoral; t-PA, ativador do plasminogênio tecidual; vWF:Ag, fator de von Willebrand.

\*Valor médio das quatro determinações obtidas ao longo do tratamento (condições basal, 30 dias, 90 dias e 180 dias)

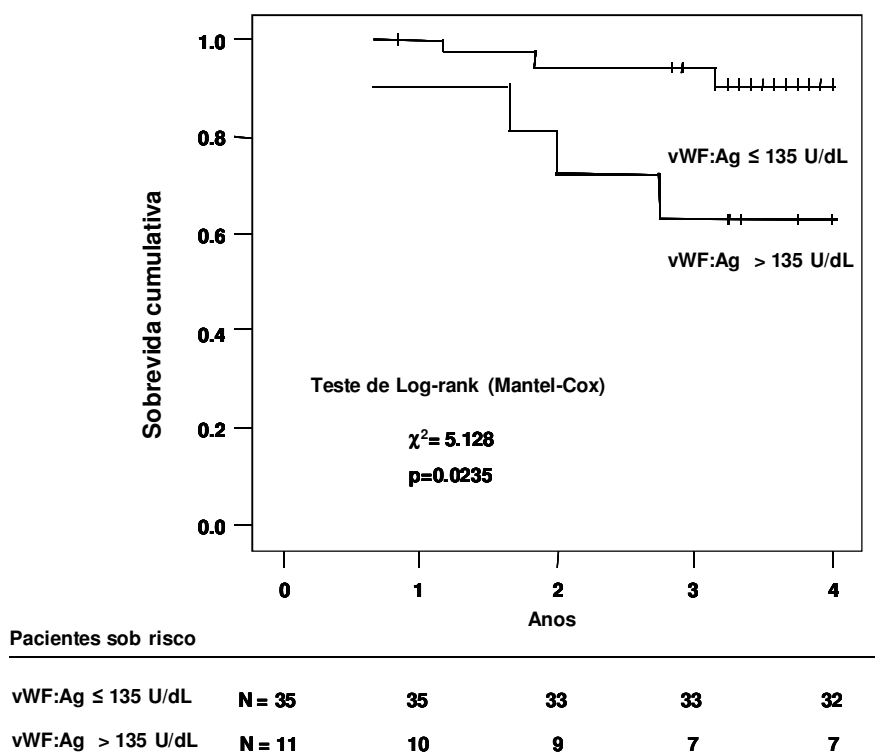
<sup>†</sup>São apresentados os valores de 'p'.

Analisando-se possíveis associações entre os marcadores bioquímicos e a sobrevida, observou-se que o nível plasmático médio do vWF:Ag (obtido das quatro determinações) teve impacto significativo. Níveis acima do valor correspondente ao percentil 95 dos controles (139 U/dL) associaram-se a menor sobrevida ( $p=0,0140$ , regressão de Cox), com risco de evolução para óbito 6,56 vezes superior (IC 95% 1,46 - 29,40). Nove pacientes apresentaram tais níveis, com quatro evoluções para óbito. Adotando-se como nível de 'corte' o percentil 90 dos controles (135 U/dL), também se verificou que níveis plasmáticos acima desse valor tinham impacto na sobrevida ( $p=0,0404$ ), com risco de evolução para óbito 4,79 vezes superior (IC 95% 1,07 - 21,44). Onze pacientes apresentaram tais níveis, também com quatro evoluções para óbito. Nos gráficos **27** e **28**, respectivamente construídos levando-se em conta os percentis 95 e 90 observados em controles, são apresentadas curvas de sobrevida cumulativa (Kaplan-Meier) para pacientes abaixo e acima dos valores de 'corte' mencionados.



**Gráfico 27 - Curva de sobrevida de Kaplan-Meier de pacientes com HAP associada a cardiopatia congênita, em função do nível médio do antígeno do fator de von Willebrand (vWF:Ag, condições basal, 30, 90 e 180 dias). Valores acima de 139 U/dL, correspondente ao percentil 95 dos controles, associaram-se a menor tempo de sobrevida (média de 3,01 anos), comparados a valores iguais ou inferiores (média de 3,8 anos). (+) representa casos censurados.**





**Gráfico 28 - Curva de sobrevida de Kaplan-Meier de pacientes com HAP associada a cardiopatia congênita, em função do nível médio do antígeno do fator de von Willebrand (vWF:Ag, condições basal, 30, 90 e 180 dias). Valores acima de 135 U/dL, correspondente ao percentil 95 dos controles, associaram-se a menor tempo de sobrevida (média de 3,19 anos), comparados a valores iguais ou inferiores (média de 3,82 anos). (+) representa casos cen-surados.**

Valores analisados em um único momento, como por exemplo, na condição basal, ou o valor mais elevado das quatro determinações, não tiveram impacto na sobrevida. A análise do vWF:Ag como variável contínua também não demonstrou associação significativa. Em relação aos níveis plasmáticos dos outros marcadores, quer analisados como variáveis categóricas ou contínuas, não houve associação com a sobrevida.

Tendo sido verificada a associação dos níveis plasmáticos do vWF:Ag com o risco de evolução para óbito, o passo seguinte foi analisar o efeito de variáveis potencialmente interferentes sobre esse risco. A Tabela 6 mostra o risco de evolução para óbito associado a níveis médios elevados de vWF:Ag (acima dos percentis 90 e 95 dos controles), após ajustamento para cada uma das variáveis potencialmente interferentes. Observa-se que o risco não é alterado de maneira expressiva pela adição, no modelo estatístico, de qualquer uma das variáveis em questão.

**Tabela 6 - Risco de evolução para óbito em presença de níveis plasmáticos médios elevados do vWF:Ag**

	N	RC (IC 95%)*	Valor de p	RC (IC 95%) <sup>†</sup>	Valor de p
<b>Sem ajustamento</b>	46	4,79 (1,07- 21,44)	0,040	6,56 (1,46- 29,40)	0,014
<b>Com ajustamento para:</b>					
Idade	46	4,23 (0,86- 20,70)	0,075	5,94 (1,23- 28,75)	0,027
Gênero	46	4,71 (1,03- 21,57)	0,046	6,73 (1,41- 32,17)	0,017
Apresentação clínica <sup>‡</sup>	46	4,67 (1,01- 21,68)	0,049	6,39 (1,41- 28,95)	0,016
Classe funcional	46	5,06 (1,12- 22,91)	0,035	6,61 (1,47- 29,79)	0,014
SpO <sub>2</sub> repouso	46	4,51 (1,00- 20,37)	0,050	5,75 (1,26- 26,34)	0,024
SpO <sub>2</sub> pós-esforço	46	4,83 (1,07- 21,78)	0,040	6,41 (1,42- 28,83)	0,015
Distância caminhada em seis minutos	46	4,98 (1,09- 22,86)	0,039	6,86 (1,49- 3,51)	0,013
Hematócrito	46	4,87 (1,08- 21,89)	0,039	6,58 (1,47- 29,52)	0,014
Terapia específica para HAP	46	4,70 (1,04- 21,13)	0,044	6,88 (1,52- 31,16)	0,012
Duração do tratamento <sup>§</sup>	46	4,85 (1,08- 21,75)	0,039	5,75 (1,27- 26,05)	0,023
Pressão sistólica arterial pulmonar <sup>§</sup>	46	4,88 (1,09- 21,89)	0,038	8,45 (1,72- 41,43)	0,009
Estatina <sup>  </sup>	46	5,30 (1,16- 24,20)	0,031	7,71 (1,65- 35,95)	0,009

HAP, hipertensão arterial pulmonar; IC, intervalo de confiança; RC, razão das chances; SpO<sub>2</sub>, saturação periférica de oxigênio; vWF:Ag, antígeno do fator de Von Willebrand

\*Razão das chances (intervalo de confiança de 95%) associada a um valor médio do vWF:Ag (de quatro determinações obtidas nas condições basal, 30 dias, 90 dias e 180 dias) acima do nível correspondente ao percentil 90 dos controles;

<sup>†</sup>Razão das chances (intervalo de confiança de 95%) associada a um valor médio do vWF:Ag (de quatro determinações obtidas nas condições basal, 30 dias, 90 dias e 180 dias) acima do nível correspondente ao percentil 95 dos controles;

<sup>‡</sup>Pacientes com hipoxemia (SpO<sub>2</sub> <90%) versus sem hipoxemia;

<sup>§</sup>O tratamento específico para HAP incluiu a bosentana, sildenafil, ou a combinação de ambos;

<sup>||</sup>Usada nos primeiros seis meses de estudo.

Assim sendo, dentro dos limites das variáveis analisadas, o nível médio do vWF:Ag obtido de quatro determinações feitas ao longo de 180 dias, foi considerado como indicador independente de sobrevida.

#### **4.6. Análise sobre a vida (sem ferramentas estatísticas)**

Este item tem como objetivo demonstrar que estudos clínicos, além de permitirem avanços no conhecimento científico relacionado a inúmeras doenças, também podem fornecer rico material do ponto de vista humano. Para tanto, basta apenas que o pesquisador esteja disposto a OUVIR as informações que o sujeito da pesquisa tem a dizer, demonstrando interesse e atenção. Longe de ser apenas um estudo bioquímico ou terapêutico, com coletas e mais coletas de amostras sanguíneas, analisadas em mais de 10.000 tubos de ensaio, para toda a equipe este é um estudo sobre a pessoa com HAP. Conviver com esses indivíduos excepcionais, que suportam o peso de ouvir, desde a mais tenra idade, que são portadores de 'DOENÇA GRAVE, INCURÁVEL E PROGRESSIVA', e vivem intensamente cada dia, permite ao pesquisador concluir que a vida é bela, independentemente de seu estado de saúde física ou financeira. É o 'estado de espírito' que conta. Estes sujeitos têm filhos, maridos, esposas, sogras, empregos, chefes... e ainda têm que freqüentar mensalmente o hospital para o controle da anticoagulação ("fazer TP", como diz a maioria). Extrapolaram

em muitos anos a expectativa de vida que outros estipularam, demonstrando que a sobrevivência pode sim, ter 'correlação positiva' com a felicidade e a vontade de viver. Acompanhá-los nos últimos cinco anos nos fez conhecer com mais profundidade cada um deles. Alguns são mais falantes, e adoram contar detalhes do dia a dia. Outros são tímidos, a vida é quase um mistério. Para um grupo seletivo, a consulta era sempre uma terapia, da qual saíam aliviados e com um sorriso aberto.

Das histórias de cada um, ouvidas ao longo desses cinco anos, algumas foram 'significativamente' mais marcantes e são relatadas a seguir.

**JCS**, após algum tempo do término do estudo, iniciou o uso de sildenafil. Teve uma melhora tão expressiva que, orgulhoso, voltou a trabalhar. Desde que iniciou a medicação, não mais necessitou de hemodiluições ou correções do hematócrito para dosagem do INR (o que significa uma picada a menos na coleta). Fez "luzes" no cabelo.

**RKE** submete-se a hemodiluições quase mensais, tão elevado é seu hematócrito. Nada porém impediu que vivesse a vida. É casado, trabalha como contador, já fez vários concursos públicos e tem um otimismo de dar inveja. Acompanhado no InCor desde os 7 anos de idade (hoje tem 41), já participou de quase todos os protocolos de pesquisa em HAP em nossa Unidade.

**MNKR** iniciou seu acompanhamento no Hospital das Clínicas em 1970, quando tinha apenas 16 anos e recebeu o diagnóstico de HAP, o que contraindicava a correção cirúrgica de sua cardiopatia congênita. Porém,

apesar de ter 40 anos de diagnóstico, ser fumante, portadora de enfisema pulmonar e já ter sobrevivido a três episódios de hemoptise e tuberculose, além de ter hipotireoidismo e transtorno bipolar, não apresenta hipoxemia importante, é ativa, “namora bastante” e... teve uma filha! Está sempre de bem com a vida. Tão bem, que se recusa a usar medicação vasodilatadora para HAP.

**AI** tem Síndrome de Down. Ao contrário da maioria dos pacientes com a síndrome, é tímido, calado. Adora música e tem “todos os lançamentos de CD”, segundo sua mãe. Sempre veio impecavelmente vestido às consultas. Nunca faltou a uma coleta de TP (mensal, com hemodiluição). Mudou-se para o sul do país há cerca de dois anos.

Fazendo par com **AI**, está o **PAMB**. Oposto ao colega de coleta, é um comediante, carinhoso, falante, noveleiro, dançarino. Sempre nos trazia desenhos que rabiscava como sinal de afeto. Ao final do teste de caminhada, imitava Michael Jackson dando um rodopio (com o gritinho característico no final). Continua assíduo nas consultas, TP's e hemodiluições, graças ao seu pai e sua avó (a mãe trabalhava e não pode acompanhá-lo com freqüência). Após o nascimento de minha primeira filha, deu-me de presente um boneco verde, para que ela também pudesse saber que ele gostava de mim.

**SAVS** é classe funcional III, “muito roxa” (como se refere a si mesma), em tratamento combinado de vasodilatadores em doses máximas, mas conseguiu ter dois filhos e é uma feliz avó de 2 netos.

**RSR** era uma pessoa doce e agradável, que adorava contar histórias de sua vida. Nos últimos anos, porém, estava abatida por estar em estado terminal. Frequentadora assídua do pronto-socorro, vinha de Boituva para o InCor mensalmente. Deu-me um chaveirinho de lembrança, que guardo até hoje.

**TCMS** é zen. Usa florais e chás. Tem voz suave e apelido com nome de flor. Mas o medo da evolução da doença, sendo mãe de uma única filha, a fez ter ataques de pânico durante o período de estudo. Conversas e mais conversas durante a madrugada não surtiram efeito. Foi durante uma crise de pânico no hospital, quando pudemos demonstrar que era de fundo emocional, que ela mudou de vida. Com o auxílio da medicação e a conseqüente melhora da classe funcional e da hipoxemia, passou a sair mais à noite e cantar em karaokês. Tornou-se cantora profissional e gravou um CD de MPB. Irradiando felicidade, é um exemplo de pessoa que “não é doente, e sim, apenas tem uma doença”.

**MN** adotou a Vitória, que não poderia ser filha de mais ninguém. Física e emocionalmente semelhantes, ambas são portadoras da mesma cardiopatia congênita. Porém, MN prometeu dar à filha a chance de cura que não teve. Vitória foi operada no início do ano de 2011, graças a sua mãe. Com a promessa cumprida, MN já era uma pessoa feliz, mas descobriu que poderia ser mais ainda, como mãe.

**AKD** era uma ‘aborrecente’ no início do estudo. Vinha com a mãe, que denunciava suas estripulias. Hoje é uma mulher casada e responsável,

que trabalha como professora. Tem estudo genético positivo para a mutação no BMPR2, assim como o irmão DED.

Conhecemos **DED** aos 14 anos, no pronto-socorro. Iniciou o uso de sildenafil no protocolo piloto, em 2002. Tinha uma namorada de 24 anos. A melhora de sua classe funcional com a droga foi espantosa. Convenceu a mãe a autorizar seu casamento aos 15 anos, já que não sabia quanto tempo iria viver, e queria saber como era ser casado. Apesar de saber do risco de ter um filho com a mutação, e de ter percebido sozinho a chamada ‘antecipação genética’ na família (pai e tios falecidos na quarta década de vida, e ele e a irmã diagnosticados por volta dos 15 anos), acabou por decidir ser pai. Nascido com a mutação, seu filho está em acompanhamento no InCor, até agora sem surgimento da doença. Durante viagem ao sul do país para apresentar seu filho à família, contam que teve episódio de palpitação, sendo levado a um hospital próximo. Faleceu aos 18 anos, casado e pai do Matheus.

**CAS** nem era cianótica quando sua enorme artéria pulmonar comprimia o tronco da artéria coronária descendente anterior. Foi submetida a revascularização do miocárdio aos vinte e pouco anos. É tão feliz e otimista que até irrita! Sempre traz chocolates e pães de mel em épocas festivas. E adora dar gravatas para o seu médico preferido, o Dr. Antônio Augusto.

**ZRF** tornou-se amiga de CAS por causa do estudo (é o seu par). São tão amigas até hoje que dividem as “tarefas” no dia da consulta: uma marca a consulta de retorno, enquanto a outra vai à farmácia. Fazem controle de

anticoagulação no mesmo dia. Já se passaram seis anos e continuam melhores amigas. Também foi revascularizada pelo mesmo motivo na segunda década de vida... coisas do destino.

**ANS** estava sempre de bom humor, apesar de ter uma vida difícil. Tinha síncope por baixo débito cardíaco, e o marido tinha síncope por convulsões. Melhorou das síncope com vasodilatador. O filho deu-lhe uma neta para sustentar. O marido a abandonou. Continuou de bom humor, mãe feliz e avó feliz. Faleceu em 2010, no primeiro episódio de descompensação cardíaca em oito anos de tratamento.

**RPTF** era a mais otimista. Com cardiopatia congênita operada tardiamente, já tinha HAP. Encaminhada ao InCor por piora da classe funcional, foi participante do estudo piloto com sildenafil em 2002. Tinha uma filha que era uma princesa. Apesar do divórcio, ocorrido porque o marido “não aguentava mais essa doença”, tinha muita vontade de viver. Com a esperança e certeza de que faria um transplante pulmonar, seguiu sua vida da forma mais otimista possível. Faleceu no pós-operatório imediato do transplante. Segundo a família, partiu feliz, pois seu desejo se tornou realidade.

**AVNS** tem medo de sangue. Que sacrifício foram as quatro coletas! Apesar do medo de agulhas, fez curso de acupuntura para tentar descobrir um meio não medicamentoso de melhorar a doença. Casado, trabalha, e diz ter melhorado com o uso das agulhas...

Dona Joana é mãe de **EBM**. Perdeu duas filhas com HAP (aos 11 e 14 anos, com evolução da doença para óbito em poucos meses). Ele (o



paciente) teve diagnóstico aos 33 anos. Era tratado pela mãe com um cuidado extremo, que lhe garantiram mais seis anos de vida. Ela estava ao seu lado 24h por dia, checando a tomada de cada comprimido, controlando sua alimentação rica e saudável, e posicionando o cateter de oxigênio atrás da orelha na hora de dormir. Seu pai, sempre grato, me ofereceu um papagaio de presente, que tive de recusar por razões óbvias. Após seis anos, faleceu enquanto aguardava o transplante pulmonar. Lamentavelmente não pude estar ao seu lado, pois estava em licença maternidade.

**DGM** era calma, tinha voz mansa, uma atípica adolescente bem resolvida. Mas a mãe... Santo Deus! Ansiosa, falava alto, sem pausas, interrompia as consultas inúmeras vezes para contar de suas doenças. DGM conheceu seu pai verdadeiro no Rio de Janeiro durante o estudo. Abandonou o tratamento há alguns anos. Acho que se mudou para o Rio...

**DCS** era também uma adolescente calma e tímida. Apesar de jovem, evoluiu com piora da classe funcional rapidamente, porém estabilizou-se com o uso de vasodilatador. Quem falava dos sintomas era o pai, pois para ela tudo sempre estava bem. Teve morte súbita em casa com o pai, 'Seu' Aguinaldo.

**CASJ** era um moleque, moleque mesmo. Não queria fazer controle da anticoagulação, não gostava de vir às consultas e fazia 'cara feia'. Durante o estudo, aos 14 anos, aprendeu a dirigir o caminhão do pai e se achava adulto. Hoje é um jovem adulto, seguro de si, e ri ao se lembrar da época de moleque...

A mãe de **CABS** era telefonista. Para falar com ela no emprego era um sacrifício, pois as colegas de trabalho não entendiam que se queria falar com ela, não com a empresa. Também era uma mãe que não deixava a filha falar, queria falar tudo sozinha. Devia ser reflexo do emprego.

**AF** sempre deu muito trabalho. Em todas as consultas referia queixas sem muito sentido e não seguia nenhuma orientação da equipe médica ou do planejamento familiar. Após o estudo, engravidou duas vezes e teve aborto espontâneo. Disse que vai continuar tentando, apesar do risco.

‘Seu’ **OLJ** era saxofonista da banda da igreja. Abandonado pela esposa, sustentava uma filha problemática. Após interromper o acompanhamento clínico por anos, retornou em junho de 2011, informando que está morando no interior de São Paulo e a filha está com saudades. Continua tocando saxofone na banda da igreja local.

**CCC** é uma adolescente assustada. A mãe é segura, firme, e lhe dá bons conselhos. Mas ela só acredita que a mãe está certa se a ‘doutora’ assim o disser. Há seis anos ela tenta, sem sucesso, convencer a ‘doutora’ a se converter à igreja evangélica à qual pertence, e traz trimestralmente mensagens divinas escritas de próprio punho, para tentar a conversão.

**GDN** é o típico paciente difícil. Muito difícil. Reclama de tudo desde a entrada no consultório até o final da consulta. Apesar de ter melhorado a classe funcional e a saturação periférica de oxigênio, fala que está pior. Reclama até hoje, de tudo.

**ESC** é casada e sempre quis ter filhos. Seu marido, porém, sempre respeitou a orientação da anticoncepção, pois estava ciente dos riscos.

Optaram pela adoção. Descendente de orientais, ESC viajou, com hipoxemia e sem oxigênio inalatório, até o Japão (!!!) para adotar duas irmãs. Elas estão com três anos, e a mãe está esgotada e feliz.

**VIS** era o paciente que ditava o próprio tratamento. Em classe funcional I/II, dizia que “era uma pessoa normal, então seu INR tinha de ser normal”. Estabeleceu que o valor do INR deveria estar entre 1,0 e 1,3. Há três anos, teve trombose pulmonar extensa, passando a apresentar classe III/IV. Continuou insistindo no INR normal, com extensão da trombose pulmonar e piora da classe funcional. Faleceu em casa, há cerca de um ano.

**KCM** também é cliente antiga do InCor. Já tinha HAP quando iniciou seu acompanhamento. Seu irmão também é portador de cardiopatia congênita, mas corrigida cirurgicamente, a tempo de evoluir bem. Não esperava ter filhos, quando surgiu uma oportunidade de adoção. Também está esgotada fisicamente e feliz.

**JLAS** é um dos raros casos de boa evolução da doença, com progressão lenta. Seu problema se restringia aos laudos médicos: “a doutora não sabe fazer laudo médico, não coloca o código certo de aposentar e conseguir passe de ônibus”. E mais: “não dá pra colocar no laudo que eu sou meio cego?” Não era a doutora que não sabia fazer laudo, ele é que não tinha a doença certa...

**FTL** está no InCor desde a infância. Era o “doentinho” da família que não sobreviveria muito. Está com quase 40 anos. Durante as internações no pronto-socorro por hemoptise elogiavam seus desenhos. Gostou do ofício e hoje é pintor profissional, tendo exposto sua arte em vários locais de

destaque. Sua mãe tem deficiência visual e outras doenças de maior gravidade, e é ele quem a acompanha em todas as consultas e exames atualmente. É um exemplo de bom filho.

## 5. DISCUSSÃO

---

### 5.1. Considerações gerais sobre os dados observados

Fazendo-se um resumo das principais observações, identifica-se, em primeiro lugar, uma mostra de 60 pacientes portadores de HAP, com características diagnósticas que refletem as etiologias encontradas no ambulatório da Unidade Clínica de Cardiologia Pediátrica e Cardiopatias Congênitas do Adulto (InCor – HCFMUSP), em suas exatas proporções. A exemplo do que se observa em outras instituições devotadas ao manejo de doenças cardiovasculares no país,<sup>25</sup> a proporção de pacientes com HAPCCg que não tiveram suas anomalias corrigidas precocemente é três a quatro vezes superior em relação à forma idiopática da doença. Esta foi exatamente a observação neste estudo, e reflete a importância das cardiopatias congênitas como elemento associado à HAP no adolescente e no adulto em nosso meio.

No presente estudo, o tamanho amostral foi estabelecido fundamentalmente visando a segunda etapa das investigações, isto é, a análise comparativa entre estatina e placebo. Neste sentido, não houve a preocupação de se estabelecer um número apropriado de pacientes por grupo (A, B e C) a fim de possibilitar uma análise comparativa. A idéia inicial foi simplesmente fazer uma apreciação geral do comportamento dos marcadores bioquímicos nos pacientes que haveriam de ser então, subseqüentemente, expostos à estatina ou ao placebo. Sendo conhecido o fato de que os pacientes com a forma idiopática da doença e aqueles com

HAP associada a anomalias cardíacas congênitas corrigidas estariam em menor número na amostra (devido às proporções encontradas no ambulatório e ao caráter consecutivo de entrada no estudo), já era previsto que a análise desse grupo (A), individualmente, ficaria prejudicada tanto na caracterização inicial como no seguimento. Assim sendo, os objetivos primeiro e terceiro puderam ser melhor explorados nos pacientes com HAPCCg.

Feitas essas observações, o que se verificou, fundamentalmente, foi a alteração em seis dos oito marcadores plasmáticos analisados, com níveis circulantes apontando na direção da ocorrência de disfunção endotelial com a participação de componentes inflamatórios. Pelas razões expostas, as alterações foram evidentes nos grupos B e C (pacientes com HAPCCg não operados). Além disso, houve associação significativa entre as alterações em algumas proteínas e variáveis clínicas como o nível do hematócrito, a saturação periférica de oxigênio e a distância caminhada no teste de seis minutos. Em conjunto, essas verificações sugerem um certo “atrelamento” entre a disfunção microvascular que ocorre na HAP e a gravidade clínica com que se apresentam os pacientes. A presença do componente inflamatório, notadamente na HAPCCg, constitui observação ainda escassa na literatura.

Ainda a título de resumo dos achados, na segunda parte do estudo, verificou-se que o uso crônico da rosuvastatina exerceu influência significativa sobre um dos marcadores bioquímicos sob verificação, qual seja, o nível circulante da selectina-P. Houve tendência à modificação do

nível plasmático do t-PA. É oportuna esta verificação com apenas oito marcadores analisados, já que muitas vezes esta pesquisa é realizada com um grande número de “candidatos”.<sup>139</sup> Ressalte-se ainda o fato de que a observação foi feita com uso de dose relativamente baixa de estatina (usada rotineiramente para o tratamento de dislipidemias), inferiores às que poderiam ser utilizadas, por exemplo, com finalidade de modulação da resposta imune.<sup>140-142</sup> Nos pacientes do grupo C, o uso da rosuvastatina também pareceu associar-se a melhora na saturação de oxigênio medida após a realização de esforço físico.

Na terceira parte do estudo, foi verificada associação significativa entre os níveis circulantes da proteína do fator de von Willebrand e a sobrevida de pacientes com HAPCCg. Especificamente, observou-se que a elevação persistente (valor médio de quatro observações) do vWF:Ag no plasma esteve associada à redução da expectativa de vida. O nível plasmático máximo (quatro observações) não foi preditivo de pior prognóstico. Assim, neste grupo de indivíduos (HAPCCg), a persistência de níveis mais elevados de vWF:Ag pareceu necessária para a caracterização da condição de risco. Esta observação foi feita com a inclusão, nos mesmos modelos utilizados, de um grande número de variáveis consideradas como possíveis interferentes. Portanto, o vWF:Ag plasmático foi caracterizado como marcador independente de prognóstico nesse grupo de indivíduos, até onde os dados permitiram afirmar.



## 5.2. A disfunção microvascular na HAP e possibilidades de modificação através de intervenções terapêuticas

Não se sabe se a disfunção microvascular, entendida em seu aspecto “endotélio e elementos circulantes”, tem papel inicial/deflagrador em relação à vasculopatia pulmonar. É possível que alguns dos seus componentes sejam iniciais no processo, como a produção defectiva de óxido nítrico e prostaciclina,<sup>28-30,32</sup> ou o contato de elementos circulantes com a parede do vaso, decorrente de lesão endotelial (propriamente dita) por fatores mecânicos.<sup>143</sup> Por outro lado, parece não haver dúvidas quanto à importância da disfunção microvascular (agora entendida em sua multiplicidade de componentes) na progressão da vasculopatia pulmonar. A expressão aumentada de endotelina e seus receptores,<sup>144-146</sup> tromboxane-A<sub>2</sub>,<sup>34</sup> PAI-1,<sup>147</sup> fator tissular,<sup>148,149</sup> citocinas,<sup>150,151</sup> moléculas de adesão<sup>152-154</sup> e fatores peptídicos de crescimento,<sup>155-158</sup> e reduzida de trombomodulina<sup>159,160</sup> e outros proteoglicanos, são apenas alguns dos múltiplos fatores que concorrem para a vasoconstrição, proliferação celular, recrutamento de elementos circulantes e trombose em modelos experimentais de hipertensão pulmonar, assim como na doença humana.

A caracterização clínica/bioquímica da disfunção microvascular, no presente estudo, não é absolutamente inédita com respeito à HAP, uma vez que estudos anteriores, conforme mencionado, já chamaram a atenção para este aspecto. Há referências inclusive à melhora no perfil de marcadores

biológicos ocorrendo de maneira paralela à estabilização clínica, mediante tratamentos específicos, particularmente com epoprostenol por via intravenosa.<sup>161-164</sup> Este estudo contribui de forma particular para a caracterização do problema, sobretudo na forma associada às cardiopatias congênitas, sua relação com variáveis de gravidade clínica, como o hematócrito e a saturação de oxigênio, e reforça evidências de participação de elementos inflamatórios, um aspecto ainda pouco explorado.<sup>77,78</sup> Neste sentido, embora com o uso de restrito número de marcadores, as observações sugerem a presença de resposta inflamatória do tipo Th2 em HAPCCg, a se julgar pelo nível plasmático aumentado de IL-10 em relação ao TNF- $\alpha$ . De maneira interessante, verificações experimentais recentemente publicadas parecem também apontar na direção da participação de resposta tipo Th2 no processo de remodelagem arterial pulmonar.<sup>165</sup>

Um aspecto que merece comentário é a relação entre disfunção microvascular (notadamente endotelial) e hipóxia. Este fato requer atenção, em virtude do número de pacientes, no estudo, apresentando-se com hipoxemia crônica. A hipóxia promove uma série de alterações envolvendo o endotélio e componentes circulantes, incluindo o recrutamento de células inflamatórias via selectina-P, moléculas de adesão intracelular (ICAM), quimiocinas (interleucina-8/NAP-1) e fator ativador de plaquetas (PAF), entre outros mecanismos.<sup>166-170</sup> A hipóxia também possui efeito pró-coagulante, mediante expressão gênica do fator tissular e ativação do fator X em superfície endotelial.<sup>171,172</sup> O efeito pró-coagulante é amplificado pela

supressão da expressão gênica da trombosmodulina,<sup>173</sup> um proteoglicano implicado na ativação da proteína C e inativação dos fatores V e VIII da coagulação. Por outro lado, a hipóxia possui efeito inibitório sobre a fibrinólise, através da indução da expressão gênica do PAI-1.<sup>59</sup> Em condições de hipóxia, os corpúsculos de Weibel-Palade, em células endoteliais, são mobilizados em direção à membrana plasmática, à qual se unem com a abertura de poros de secreção.<sup>174</sup> Três dos marcadores analisados no presente estudo (a selectina-P, o fator de von Willebrand e o t-PA) são armazenados nos corpúsculos de Weibel-Palade e liberados mediante hipóxia.<sup>58</sup> Dois deles estão implicados com a adesão de leucócitos e plaquetas (respectivamente, a selectina-P e o fator de von Willebrand). Estas observações permitem inferir sobre o papel da hipóxia na deflagração e agravamento da disfunção microvascular, com alterações microcirculatórias na direção da vaso-oclusão. Neste sentido, em portadores de HAPCCg com diminuição na saturação periférica de oxigênio (grupo C no presente estudo), justifica-se especular sobre a sequência “hipóxia-disfunção microvascular-piora da hipoxemia”, associada à falência ventricular direita e progressivo aumento do *shunt* de direita para esquerda. Este “ciclo vicioso” poderia, especulativamente, ser quebrado por intervenções, por exemplo, sobre mecanismos envolvidos no processo de disfunção endotelial/microvascular.

Diferentemente dos modelos experimentais, em que as condições podem ser até certo ponto controladas, as relações entre hipóxia/hipoxemia, disfunção microvascular e resposta a intervenções terapêuticas são mais

difíceis de se demonstrar no cenário mais complexo da doença clínica em humanos. Apesar disso, no presente estudo, foram observadas correlações entre os níveis circulantes de t-PA e selectina-P, e a intensidade da hipoxemia, assim como a elevação do hematócrito. O nível plasmático do vWF:Ag, entretanto, não guardou relação com essas variáveis, embora tenha refletido a gravidade clínica, em termos de risco de evolução para óbito. Por outro lado, a administração de rosuvastatina associou-se a redução significativa do nível plasmático de selectina-P, e à melhora da saturação periférica de oxigênio, após esforço, em pacientes do grupo C.

A possibilidade de se modular, através de intervenções terapêuticas, a função endotelial (e de forma estendida, microvascular), e se obter, como conseqüência, a melhora das condições microcirculatórias (neste caso, pulmonares), ou pelo menos algum grau de desaceleração no remodelamento e oclusão dos vasos, teoricamente parece real. A literatura, entretanto, com respeito à HAP, é escassa no sentido de responder se os pacientes tratados apropriadamente, e que apresentam modificações favoráveis em índices bioquímicos de disfunção endotelial/microvascular, evoluem de maneira mais satisfatória e com melhores desfechos em relação àqueles que não exibem tais mudanças. Há alguma informação neste sentido, sobretudo com uso de prostanóides por via intravenosa,<sup>124</sup> mas esses “atrelamentos” precisam ser feitos de maneira mais ampla, em formas específicas de hipertensão pulmonar. Além das drogas disponíveis para uso clínico, alguns medicamentos propostos para o tratamento da HAP, incluindo fármacos em fases avançadas de testes e estudos clínicos, possuem ação

inequívoca sobre funções endoteliais, ainda que a expectativa inicial seja de que possam agir primariamente como vasodilatadores, inibidores de proliferação celular e/ou indutores de apoptose. Entre elas, podem ser citados os inibidores de tirosina-quinases,<sup>99,100</sup> os ativadores da guanilato ciclase solúvel que não dependem do óxido nítrico,<sup>101</sup> e as estatinas.<sup>108,109</sup> No contexto de “reparo endotelial”, merecem ser citadas as tentativas com a utilização de células tronco e progenitoras de endotélio.<sup>175,176</sup>

A possibilidade de emprego das estatinas como coadjuvantes no tratamento da HAP surgiu com estudos, em modelos experimentais, nos quais a sinvastatina se mostrou eficaz em inibir a proliferação e induzir apoptose em células musculares lisas de vasos pulmonares, a partir da modulação de vários genes implicados.<sup>105-107</sup> A partir desse ponto, várias interrogações apareceram, e as questões ainda permanecem sem resposta. O que foi verificado com uso da sinvastatina seria reproduzido com outras estatinas? As doses a serem utilizadas seriam semelhantes às recomendadas para o tratamento das dislipidemias? Seriam necessárias doses com capacidade de imunomodulação e portanto muito mais altas? Os efeitos observados em modelos animais poderiam ser transpostos para a doença humana? Em que formas de apresentação clínica da HAP?

Frente a todas essas interrogações e preocupados, sobretudo, com a segurança em relação à hepatotoxicidade e aos potenciais efeitos sobre o músculo esquelético, decidiu-se, neste estudo, utilizar a rosuvastatina (justificativa de escolha já mencionada) em dose considerada baixa. Com efeito, nenhum sintoma (ou alteração laboratorial) foi observado, de

magnitude que justificasse a interrupção. O tratamento assim administrado resultou em redução significativa no nível de selectina-P circulante, o que poderia refletir melhora ainda mais relevante na produção/secreção desta proteína em locais de lesão microvascular avançada. Por outro lado, especula-se que a resposta, em termos de melhora nos níveis das proteínas, poderia ter sido mais expressiva (mais ampla) com doses de rosuvastatina, por exemplo, até 40 mg diários.

Estudo recentemente publicado com uso clínico da sinvastatina em pacientes com HAP<sup>109</sup> revelou melhora em índices ecocardiográficos e laboratoriais, porém não mostrou efeito significativo sobre variáveis funcionais após período de um ano de tratamento. Antes, porém, de se desqualificar esta classe de drogas quanto à sua potencial utilidade em pacientes com HAP, é necessário verificar se os indivíduos com formas específicas da doença, em estágios determinados, tratados com a estatina apropriada e na dose adequada, podem ser beneficiados. Nesse sentido, os desfechos utilizados em estudos clínicos com drogas primariamente vasodilatadoras (efeitos hemodinâmicos e funcionais, e modificação no tempo de piora clínica e na sobrevida) não parecem apropriados. A definição de índices que poderiam ser mais adequados para a medida da eficácia dessas drogas na HAP permanece como assunto ainda em discussão.

### 5.3. Índices de prognóstico na hipertensão arterial pulmonar

Conforme exposto na INTRODUÇÃO, esses índices têm sido desenvolvidos e caracterizados, sobretudo, para pacientes e condições clínicas correspondentes à primeira categoria da classificação diagnóstica, ou seja, a HAP. A idéia de se caracterizar uma variável (genética, bioquímica, funcional) como índice ou marcador de prognóstico prende-se ao conceito de substituição. Como diante do caso clínico não se pode aguardar a ocorrência de um grande desfecho (óbito, por exemplo) para se decidir quanto à mudança na estratégia de tratamento, lança-se mão dos “substitutivos” (*surrogate*, em língua inglesa). Para a caracterização de determinado marcador como substitutivo (de evolução para óbito, por exemplo), é necessária a demonstração da existência de consistente associação com o desfecho considerado, preferencialmente de forma independente de outras variáveis. O processo de caracterização precisa, portanto, pode ser exaustivo. Além disso, os “atrelamentos” entre índices substitutivos e grandes eventos clínicos precisa ser estabelecido, ao longo do tempo, a partir de observações feitas por diferentes grupos de investigadores, envolvendo número representativo de casos.

Na HAP, conforme explicitado anteriormente, variáveis como a distância caminhada no teste de seis minutos, o consumo de oxigênio determinado pela ergoespirometria e o índice cardíaco, entre outras, têm sido associadas ao prognóstico e à sobrevida.<sup>112,114,116</sup> Entretanto, as informações ainda são escassas sobre marcadores de prognóstico em

formas específicas de HAP. Por outro lado, a caracterização dos peptídeos natriuréticos como índices de gravidade<sup>120,121</sup> reflete a intenção de se vincular a evolução clínica desfavorável à deterioração progressiva da função miocárdica (notadamente a função ventricular direita). Neste sentido, torna-se justificável a busca por marcadores biológicos que reflitam a gravidade da disfunção microvascular em si. Na HAP, níveis circulantes de substâncias como as endotelinas,<sup>126</sup> o fator de von Willebrand,<sup>129-131</sup> as selectinas (e outras proteínas de adesão),<sup>152</sup> nucleotídeos cíclicos,<sup>125,177</sup> citocinas<sup>139</sup> e moléculas como sCD40 e sCD154 (sCD40-L)<sup>178,179</sup> podem ser explorados quanto ao seu potencial de predizer a evolução e a gravidade da doença.

No presente estudo, optou-se por analisar, em maior profundidade, os possíveis fatores de risco para o desfecho fatal apenas nos portadores de cardiopatia congênita, em vista do número de indivíduos na amostra. Neste sentido, a análise resultou específica para esta subcategoria diagnóstica da HAP. Entre as oito proteínas analisadas em amostra de sangue periférico, apenas o nível plasmático de vWF:Ag mostrou associação significativa com a sobrevida. Dentro dos limites dos fatores que puderam ser analisados como possíveis interferentes, o vWF:Ag foi considerado como um fator de risco independente, com respeito ao prognóstico. Ressalte-se que nesta parte do estudo a maioria dos pacientes apresentava-se em classe funcional II. Especula-se que outras proteínas poderiam ter sido também caracterizadas como fatores de risco, caso houvesse um maior número de pacientes em situação mais grave (classe III avançada, por exemplo). Esta mesma



situação de condição clínica de menor gravidade (38 de 46 pacientes em classe funcional II e 18 indivíduos acianóticos, sem o típico perfil da síndrome de Eisenmenger) possivelmente explique a não observação, no estudo, de associação entre capacidade física, resposta a tratamento com drogas específicas e sobrevida, contrariando observações recentes.<sup>180,181</sup>

Há particularidades importantes no que diz respeito à análise da concentração plasmática de vWF:Ag, sobretudo no estabelecimento de “níveis de corte” para a caracterização de gravidade da doença. Um dos problemas diz respeito aos métodos de determinação. Houve modificações, ao longo do tempo, de forma que inicialmente as análises eram feitas por imunodifusão em gel (eletroforese do tipo *rocket*), e mais recentemente têm sido empregados testes imunoenzimáticos do tipo “ELISA.”<sup>129-131</sup> No presente estudo, com objetivo de tornar os resultados mais reprodutíveis e comparáveis, optou-se por estabelecer, como “níveis de corte”, valores correspondentes a percentis (90 e 95) do grupo controle, ao invés de se considerar concentrações dadas, mencionadas na literatura, ou mesmo identificadas em verificações prévia em nosso laboratório. Este cuidado pareceu relevante e recomendável em futuros estudos envolvendo este marcador.

Outro aspecto a ser considerado, é que a concentração plasmática de vWF:Ag pode flutuar de maneira não diretamente relacionada à evolução da doença (no caso, HAP). O fator de von Willebrand é considerado como uma “proteína de fase aguda”. Como tal, seus níveis circulantes podem flutuar em decorrência de diversas situações de natureza inflamatória ou

infeciosa.<sup>58,182-184</sup> Este comportamento talvez explique o fato de apenas o nível médio de quatro determinações ao longo de seis meses ter se associado de forma significativa com a sobrevida. Aqui, novamente, especula-se que uma única determinação pudesse ter se mostrado suficiente (conforme verificado por Kawut e colaboradores em indivíduos com outras formas de HAP<sup>129</sup>) caso a amostra de pacientes incluísse maior número em situação de doença mais avançada. De qualquer forma, permanece a impressão de que em HAPCCg, uma elevação persistente do vWF:Ag plasmático (a partir de determinações sequenciais) é necessária para a definição da condição de risco.

Finalmente, caberia especular sobre a razão pela qual níveis circulantes aumentados de vWF:Ag refletiriam um prognóstico mais sombrio. Sendo o fator de von Willebrand uma molécula de adesão para células endoteliais e plaquetas,<sup>185</sup> e um transportador do fator VIII da coagulação,<sup>186</sup> a idéia mais imediata é a de que a trombose poderia ser o elemento de ligação. Com efeito, a trombose arterial, notadamente em território pulmonar, é uma complicação amplamente conhecida na síndrome de Eisenmenger.<sup>61,187</sup> Entretanto, é igualmente passível de especulação o fato de o vWF:Ag plasmático poder refletir, indiretamente, uma série de eventos biológicos implicados no desenvolvimento da disfunção microvascular. Ressalte-se, nesse sentido, que o fator é liberado, a partir dos corpúsculos de Weibel-Palade, por uma gama de estímulos que inclui a hipóxia, *shear stress*, citocinas, trombose, fibrina, componentes do complemento (C56-9), histamina e epinefrina. Especulativamente, esses (ou outros) poderiam ser

elos entre o que se verifica com o fator de von Willebrand circulante e a progressão da doença em pacientes com HAPCCg.

Em suma, essas verificações são ainda preliminares. Futuras observações, envolvendo casuísticas maiores, acompanhadas por tempo mais longo, serão importantes para a eleição definitiva do fator de von Willebrand como índice de risco na doença. Entretanto, os dados de que se dispõe até o momento, oriundos de estudos Unidade Clínica de Cardiologia Pediátrica e Cardiopatias Congênitas do Adulto (InCor – HCFMUSP),<sup>62,130,131</sup> publicados por outros autores<sup>129</sup> e as presentes verificações parecem apontar nesta direção.

## **6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS**

---

As observações feitas nas diferentes etapas do estudo permitem considerações que são relacionadas a seguir. Estas devem ser vistas no âmbito de uma coorte de indivíduos com formas restritas de apresentação da HAP, que se apresentavam inicialmente em condição de discreta a moderada limitação decorrente da doença, e foram seguidos por um período de até quatro anos. Devido às características dos pacientes encaminhados ao ambulatório da Unidade Clínica de Cardiologia Pediátrica e Cardiopatias Congênitas do Adulto do InCor –HCFMUSP, a presente coorte se caracterizou pela predominância de indivíduos com a forma da doença associada a anomalias cardíacas congênitas. As observações, então, permitem concluir o seguinte:

1. Pacientes (adolescentes e adultos) com HAP idiopática, hereditária ou associada a cardiopatias congênitas apresentam alterações em proteínas circulantes (plasmáticas) de origem endotelial e inflamatória, que permitem caracterizar a condição de disfunção microvascular. Esta situação é particularmente presente em portadores de cardiopatias congênitas, nos quais, de forma semelhante ao observado na HAP idiopática, componentes inflamatórios estão presentes. As alterações bioquímicas observadas correlacionam-se com variáveis funcionais de gravidade da doença.
2. Na HAP, o uso crônico da rosuvastatina, em dose baixa, por via oral, associa-se à redução do nível circulante de pelo menos um marcador de disfunção microvascular, a selectina-P, além de

propiciar aumento discreto na saturação periférica de oxigênio, ao final do exercício, nos indivíduos com hipoxemia crônica.

3. Em portadores de HAP associada a cardiopatias congênitas, níveis circulantes persistentemente elevados do fator de von Willebrand, observados em pelo menos quatro determinações realizadas em período de seis meses, constituem fator de risco independente para o desfecho fatal. Níveis de corte para a definição de gravidade devem ser estabelecidos levando-se em conta valores obtidos para a população normal, através de determinações feitas no mesmo laboratório e com a mesma metodologia.

Em HAP, as alterações que ocorrem na interface entre a superfície mais interna dos vasos e os elementos circulantes, se não iniciais, certamente contribuem para a ocorrência de complicações e progressão do processo vaso-oclusivo. No futuro, esses eventos deverão merecer atenção cada vez maior, possibilitando o desenvolvimento de recursos terapêuticos específicos. No que diz respeito à HAPCCg, sucessivas observações têm apontado na direção da participação de componentes inflamatórios. Conhecida que é a estreita relação fisiopatológica entre inflamação e trombose (esta última amplamente demonstrada em adultos portadores de cardiopatias congênitas), ações terapêuticas poderão vir a ser propostas no sentido de se atingir mecanismos moleculares que são centrais e comuns a esses eventos.

Até o presente, os esforços no sentido do desenvolvimento de recursos farmacológicos para o tratamento da HAP têm sido concentrados em drogas que são primariamente vasodilatadoras, embora, reconhecidamente, apresentem outros efeitos. Entretanto, o manejo de pacientes com HAP, como síndrome complexa, envolvendo múltiplos mecanismos fisiopatológicos, deverá incluir também terapias não necessariamente vasodilatadoras. Drogas com ação sobre propriedades específicas do endotélio e/ou moduladoras da resposta imune poderão e deverão ser adicionadas ao cenário. As perguntas que ficam aguardando resposta dizem respeito aos potenciais efeitos de longo prazo dessas drogas: como medi-los, e que benefícios esperar nas diferentes fases da doença vascular pulmonar.

O que se espera dos marcadores biológicos, além da informação acerca dos riscos, é a possibilidade de virem a constituir um auxílio na condução dos tratamentos. Deseja-se saber, por exemplo, se dois pacientes com tratamento iniciado em presença de diferenças marcantes no nível dos marcadores, apresentarão respostas diferentes. Deseja-se também saber se pacientes com melhora bioquímica expressiva, logo após o início da terapêutica, apresentarão estabilização clínica mais consistente e prolongada em relação àqueles nos quais os índices não se modificam substancialmente. Por fim, interessa saber que tipo de interpretação se deve dar às flutuações nos níveis dos marcadores bioquímicos observadas no curso de determinado tratamento, e como tais flutuações podem ser úteis nas decisões de mudanças de estratégias. Evidentemente, estas são

apenas expectativas no momento, mas poderão abrir portas para futuras linhas de investigação.

Finalmente, sugere-se que o acompanhamento ambulatorial dos pacientes portadores de HAP seja rigoroso, no uso das ferramentas diagnósticas e terapêutica adequada, e delicado, no trato com os pacientes e seus familiares. Paciência para ouvir queixas e valorizá-las, sensibilidade para perceber angústia e sofrimento disfarçados em um sorriso com olhar distante, e sinceridade ao informar que a vida pode ser bem vivida apesar da doença, parecem ter papel importante na sobrevida dos pacientes. Recomenda-se que essas observações sejam objeto de investigação diária daqueles que convivem com pacientes com HAP, devendo ser até extrapoladas para outras doenças.



## **7. ANEXOS**

---

## ANEXO 1 - Dados individuais relativos ao nível plasmático do vWF:Ag na condição basal

Número	Paciente	Grupo	vWF:Ag (U/dL)					Controle
			Todos	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupos B e C	
1	FRS	C	145,53			145,53	145,53	117,48
2	JCS	C	146,01			146,01	146,01	85,62
3	RKE	C	102,49			102,49	102,49	68,00
4	RM	C	146,51			146,51	146,51	63,49
5	MNKR	C	112,89			112,89	112,89	139,02
6	MSPL	C	137,02			137,02	137,02	107,55
7	AI	C	116,56			116,56	116,56	119,56
8	PAMB	C	124,33			124,33	124,33	131,42
9	MACOA	C	145,70			145,70	145,70	129,36
10	SAVS	C	177,48			177,48	177,48	117,28
11	RSR	C	138,02			138,02	138,02	103,27
12	TCMS	C	81,96			81,96	81,96	109,91
13	LNR	C	134,93			134,93	134,93	132,31
14	MNKR	C	137,41			137,41	137,41	123,01
15	ARS	B	125,19		125,19		125,19	95,68
16	JNA	B	138,59		138,59		138,59	115,89
17	AKD	A	72,27	72,27				80,32
18	DED	A	120,51	120,51				134,01
19	CAS	B	94,81		94,81		94,81	64,65
20	ZRF	B	119,77		119,77		119,77	100,35
21	ANS	A	152,17	152,17				102,56
22	RPTF	A	135,45	135,45				113,44
23	AVNS	A	127,76	127,76				131,49
24	EBM	A	86,10	86,10				102,70
25	DGM	B	94,07		94,07		94,07	119,07
26	DCS	B	111,36		111,36		111,36	98,95
27	CASJ	A	79,22	79,22				74,99
28	CABS	A	122,49	122,49				135,39
29	AF	B	120,98		120,98		120,98	82,29
30	DPS	B	123,05		123,05		123,05	93,15
31	CBMS	C	133,05			133,05	133,05	76,28
32	OLJ	C	140,60			140,60	140,60	146,84
33	CCC	B	118,14		118,14		118,14	63,61
34	NBS	B	132,21		132,21		132,21	62,23
35	ACS	C	103,39			103,39	103,39	122,75
36	JLSC	C	146,92			146,92	146,92	79,37
37	APMN	B	114,74		114,74		114,74	120,50
38	GDN	C	94,29			94,29	94,29	135,38
39	DVS	B	108,96		108,96		108,96	
40	EBS	C	112,74			112,74	112,74	
41	JAN	A	124,84	124,84				
42	MCS	A	89,26	89,26				
43	LFMPC	C	127,11			127,11	127,11	
44	TADB	C	113,98			113,98	113,98	
45	CCS	C	122,06			122,06	122,06	
46	CA	C	158,74			158,74	158,74	
47	ESC	B	150,52		150,52		150,52	
48	MCAS	C	146,51			146,51	146,51	
49	VIS	A	147,90					
50	ZPGS	A	119,76					
51	FBO	C	111,69			111,69	111,69	
52	KCM	C	128,55			128,55	128,55	
53	FMDS	A	153,73	153,73				
54	JLAS	A	133,05	133,05				
55	CFM	B	152,02		152,02		152,02	
56	FTL	C	72,50			72,50	72,50	
57	DMN	B	104,86		104,86		104,86	
58	MDT	B	109,74		109,74		109,74	
59	IJL	B	89,84		89,84		89,84	
60	JBS	B	98,30		98,30		98,30	
			122,2 (22,9)	118,9 (26,9)	117,6 (18,12)	127,11 (23,22)	125,05 (20,65)	105,24 (24,71)

vWF:Ag, fator de von Willebrand;

Medidas de tendência central e dispersão expressas, ao final, em média e desvio padrão.

## ANEXO 2 - Dados individuais relativos ao nível plasmático do t-PA na condição basal

Número	Paciente	Grupo	t-PA (ng/mL)				Controle	
			Todos	Grupo A	Grupo B	Grupo C		
1	FRS	C	12,92			12,92	4,31	
2	JCS	C	18,24			18,24	6,41	
3	RKE	C	7,19			7,19	4,44	
4	RM	C	9,51			9,51	5,88	
5	MNKR	C	11,75			11,75	4,43	
6	MSPL	C	5,55			5,55	4,09	
7	AI	C	10,92			10,92	4,70	
8	PAMB	C	10,16			10,16	7,49	
9	MACOA	C	11,28			11,28	4,85	
10	SAVS	C	23,93			23,93	4,59	
11	RSR	C	6,21			6,21	2,87	
12	TCMS	C	12,18			12,18	6,05	
13	LNR	C	8,22			8,22	5,62	
14	MNKR	C	9,07			9,07	4,96	
15	ARS	B	3,96		3,96		4,88	
16	JNA	B	7,42		7,42		6,31	
17	AKD	A	12,22	12,22			6,47	
18	DED	A	11,90	11,90			8,50	
19	CAS	B	4,70		4,70		8,49	
20	ZRF	B	3,01		3,01		5,19	
21	ANS	A	3,93	3,93			4,90	
22	RPTF	A	6,25	6,25			5,00	
23	AVNS	A	8,93	8,93			6,88	
24	EBM	A	4,62	4,62			6,74	
25	DGM	B	4,49		4,49		3,77	
26	DCS	B	6,55		6,55		8,88	
27	CASJ	A	5,41	5,41			6,70	
28	CABS	A	5,32	5,32			5,41	
29	AF	B	6,23		6,23		8,34	
30	DPS	B	12,01		12,01		4,24	
31	CBMS	C	16,15			16,15	6,09	
32	OLJ	C	7,01			7,01	6,57	
33	CCC	B	5,56		5,56		5,46	
34	NBS	B	10,02		10,02		5,54	
35	ACS	C	10,43			10,43	3,88	
36	JLSC	C	18,55			18,55	5,74	
37	APMN	B	10,06		10,06		9,71	
38	GDN	C	7,04			7,04	10,25	
39	DVS	B	6,92		6,92			
40	EBS	C	7,26			7,26		
41	JAN	A	9,35	9,35				
42	MCS	A	4,61	4,61				
43	LFMPC	C	13,87			13,87		
44	TADB	C	6,94			6,94		
45	CCS	C	7,02			7,02		
46	CA	C	11,68			11,68		
47	ESC	B	8,95		8,95			
48	MCAS	C	6,69			6,69		
49	VIS	A	5,30	5,30				
50	ZPGS	A	3,61	3,61				
51	FBO	C	5,56			5,56		
52	KCM	C	5,81			5,81		
53	FMDS	A	8,42	8,42				
54	JLAS	A	7,70	7,70				
55	CFM	B	6,32		6,32			
56	FTL	C	8,71			8,71		
57	DMN	B	8,44		8,44			
58	MDT	B	10,65		10,65			
59	IJL	B	6,24		6,24			
60	JBS	B	5,31		5,31			
			8,57 (3,96)	6,97 (2,83)	7,05 (2,50)	10,35 (4,50)	9,06 (4,14)	5,91 (1,71)

tPA, ativador do plasminogênio tecidual;

Medidas de tendência central e dispersão expressas, ao final, em média e desvio padrão.

### ANEXO 3 - Dados individuais relativos ao nível plasmático do PAI-1 na condição basal

Número	Paciente	Grupo	PAI-1 (ng/mL)				Controle	
			Total	Grupo A	Grupo B	Grupo C		
1	FRS	C	43,49			43,49	43,49	11,21
2	JCS	C	60,60			60,60	60,60	10,49
3	RKE	C	23,80			23,80	23,80	24,77
4	RM	C	29,31			29,31	29,31	10,85
5	MNKR	C	34,42			34,42	34,42	21,67
6	MSPL	C	28,27			28,27	28,27	21,12
7	AI	C	37,21			37,21	37,21	20,73
8	PAMB	C	31,14			31,14	31,14	16,46
9	MACOA	C	43,56			43,56	43,56	15,29
10	SAVS	C	134,71			134,71	134,71	18,36
11	RSR	C	23,86			23,86	23,86	11,40
12	TCMS	C	49,69			49,69	49,69	16,41
13	LNR	C	41,96			41,96	41,96	17,01
14	MNKR	C	30,22			30,22	30,22	19,06
15	ARS	B	17,41		17,41			9,34
16	JNA	B	14,97		14,97			10,25
17	AKD	A	103,28	103,28				13,36
18	DED	A	69,82	69,82				9,29
19	CAS	B	12,68		12,68		12,68	6,49
20	ZRF	B	11,18		11,18		11,18	19,67
21	ANS	A	9,85	9,85				5,23
22	RPTF	A	17,00	17,00				9,73
23	AVNS	A	81,32	81,32				8,41
24	EBM	A	17,45	17,45				22,16
25	DGM	B	24,60		24,60		24,60	15,54
26	DCS	B	42,68		42,68		42,68	9,83
27	CASJ	A	20,76	20,76				41,15
28	CABS	A	18,75	18,75				35,29
29	AF	B	51,72		51,72		51,72	18,95
30	DPS	B	69,05		69,05		69,05	17,98
31	CBMS	C	32,63			32,63	32,63	20,49
32	OLJ	C	24,08			24,08	24,08	9,68
33	CCC	B	27,08		27,08		27,08	23,12
34	NBS	B	9,69		9,69		9,69	16,54
35	ACS	C	9,88			9,88	9,88	7,54
36	JLSC	C	54,80			54,80	54,80	19,73
37	APMN	B	20,55		20,55		20,55	10,85
38	GDN	C	22,53			22,53	22,53	40,81
39	DVS	B	22,85		22,85		22,85	42,88
40	EBS	C	10,71			10,71	10,71	
41	JAN	A	16,15	16,15				
42	MCS	A	12,76	12,76				
43	LFMPC	C	45,55			45,55	45,55	
44	TADB	C	17,33			17,33	17,33	
45	CCS	C	20,99			20,99	20,99	
46	CA	C	42,93			42,93	42,93	
47	ESC	B	19,69		19,69		19,69	
48	MCAS	C	31,98			31,98	31,98	
49	VIS	A	9,74	9,74				
50	ZPGS	A	39,20	39,20				
51	FBO	C	24,15			24,15	24,15	
52	KCM	C	13,54			13,54	13,54	
53	FMDS	A	67,44	67,44				
54	JLAS	A	13,28	13,28				
55	CFM	B	24,46		24,46		24,46	
56	FTL	C	28,64			28,64	28,64	
57	DMN	B	18,75		18,75		18,75	
58	MDT	B	18,31		18,31		18,31	
59	IJL	B	17,87		17,87		17,87	
60	JBS	B	15,41		15,41		15,41	
			24,11	18,10	19,22	30,68	24,53	16,46
			(9,69;34,7)	(9,74;103,3)	(9,69;69,05)	(9,88;134,71)	(9,69;134,71)	(5,23;42,88)

PAI-1, inibidor do ativador do plasminogênio;

Medidas de tendência central e dispersão expressas, ao final, em mediana,, e limites inferior e superior.

### ANEXO 4- Dados individuais relativos ao nível plasmático da selectina-P na condição basal

Número	Paciente	Grupo	Selectina-P (ng/mL)					Controle
			Total	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupos B e C	
1	FRS	C	76,00			76,00	76,00	32,92
2	JCS	C	62,81			62,81	62,81	39,66
3	RKE	C	85,33			85,33	85,33	28,52
4	RM	C	83,36			83,36	83,36	25,86
5	MNKR	C	50,19			50,19	50,19	17,72
6	MSPL	C	32,99			32,99	32,99	26,62
7	AI	C	79,65			79,65	79,65	27,38
8	PAMB	C	81,76			81,76	81,76	8,82
9	MACOA	C	29,16			29,16	29,16	30,58
10	SAVS	C	91,61			91,61	91,61	19,40
11	RSR	C	47,83			47,83	47,83	18,36
12	TCMS	C	33,65			33,65	33,65	16,11
13	LNR	C	57,56			57,56	57,56	26,37
14	MNKR	C	23,42			23,42	23,42	14,47
15	ARS	B	62,55		62,55		62,55	24,79
16	JNA	B	75,06		75,06		75,06	14,94
17	AKD	A	46,17	46,17				29,96
18	DED	A	41,22	41,22				29,03
19	CAS	B	24,37		24,37		24,37	49,85
20	ZRF	B	14,18		14,18		14,18	35,54
21	ANS	A	22,02	22,02				36,79
22	RPTF	A	30,23	30,23				22,62
23	AVNS	A	40,02	40,02				53,96
24	EBM	A	41,98	41,98				29,68
25	DGM	B	28,87		28,87		28,87	11,62
26	DCS	B	23,63		23,63		23,63	24,07
27	CASJ	A	42,56	42,56				23,23
28	CABS	A	13,68	13,68				15,82
29	AF	B	49,58		49,58		49,58	19,30
30	DPS	B	36,19		36,19		36,19	20,01
31	CBMS	C	51,90			51,90	51,90	17,82
32	OLJ	C	136,94			136,94	136,94	
33	CCC	B	37,72		37,72		37,72	
34	NBS	B	54,42		54,42		54,42	
35	ACS	C	35,37			35,37	35,37	
36	JLSC	C	45,78			45,78	45,78	
37	APMN	B	25,41		25,41		25,41	
38	GDN	C	45,75			45,75	45,75	
39	DVS	B	32,82		32,82		32,82	
40	EBS	C	19,26			19,26	19,26	
41	JAN	A	36,65	36,65				
42	MCS	A	46,59	46,59				
43	LFMPC	C	37,60			37,60	37,60	
44	TADB	C	49,93			49,93	49,93	
45	CCS	C	18,75			18,75	18,75	
46	CA	C	51,68			51,68	51,68	
47	ESC	B	42,38		42,38		42,38	
48	MCAS	C	21,13			21,13	21,13	
49	VIS	A	40,57	40,57				
50	ZPGS	A	24,89	24,89				
51	FBO	C	43,87			43,87	43,87	
52	KCM	C	43,90			43,90	43,90	
53	FMDS	A	18,29	18,29				
54	JLAS	A	31,99	31,99				
55	CFM	B	15,53		15,53		15,53	
56	FTL	C	48,40			48,40	48,40	
57	DMN	B	20,19		20,19		20,19	
58	MDT	B	29,85		29,85		29,85	
59	IJL	B	23,05		23,05		23,05	
60	JBS	B	10,71		10,71		10,71	
			42,8 (23,0)	34,06 (10,69)	33,69 (17,41)	53,06 (26,61)	43,12 (25,11)	25,54 (10,26)

Medidas de tendência central e dispersão expressas, ao final, em média e desvio padrão.

### ANEXO 5 - Dados individuais relativos ao nível plasmático do TNF- $\alpha$ na condição basal

Número	Paciente	Grupo	TNF- $\alpha$ (pg/mL)				Controle	
			Total	Grupo A	Grupo B	Grupo C		
1	FRS	C	0,71			0,71	0,71	0,35
2	JCS	C	1,22			1,22	1,22	0,64
3	RKE	C	0,69			0,69	0,69	0,75
4	RM	C	1,07			1,07	1,07	0,81
5	MNKR	C	0,84			0,84	0,84	0,80
6	MSPL	C	1,44			1,44	1,44	0,82
7	AI	C	1,19			1,19	1,19	0,56
8	PAMB	C	1,15			1,15	1,15	1,68
9	MACOA	C	2,07			2,07	2,07	0,64
10	SAVS	C	1,31			1,31	1,31	0,15
11	RSR	C	0,29			0,29	0,29	2,50
12	TCMS	C	0,67			0,67	0,67	0,38
13	LNR	C	0,84			0,84	0,84	0,79
14	MNKR	C	0,39			0,39	0,39	0,71
15	ARS	B	0,31		0,31		0,31	0,43
16	JNA	B	0,81		0,81		0,81	0,66
17	AKD	A	1,94	1,94				0,54
18	DED	A	0,63	0,63				0,52
19	CAS	B	0,31		0,31		0,31	0,87
20	ZRF	B	1,62		1,62		1,62	0,51
21	ANS	A	0,62	0,62				0,17
22	RPTF	A	0,72	0,72				0,08
23	AVNS	A	1,64	1,64				0,20
24	EBM	A	0,72	0,72				0,44
25	DGM	B	1,38		1,38		1,38	0,10
26	DCS	B	5,25		5,25		5,25	0,35
27	CASJ	A	3,55	3,55				2,25
28	CABS	A	4,79	4,79				2,86
29	AF	B	1,80		1,80		1,80	
30	DPS	B	5,61		5,61		5,61	
31	CBMS	C	0,56			0,56	0,56	
32	OLJ	C	0,36			0,36	0,36	
33	CCC	B	0,54		0,54		0,54	
34	NBS	B	0,36		0,36		0,36	
35	ACS	C	1,09			1,09	1,09	
36	JLSC	C	0,41			0,41	0,41	
37	APMN	B	1,02		1,02		1,02	
38	GDN	C	0,30			0,30	0,30	
39	DVS	B	0,29		0,29		0,29	
40	EBS	C	0,18			0,18	0,18	
41	JAN	A	0,20	0,20				
42	MCS	A	0,23	0,23				
43	LFMPC	C	0,44			0,44	0,44	
44	TADB	C	0,44			0,44	0,44	
45	CCS	C	0,18			0,18	0,18	
46	CA	C	0,55			0,55	0,55	
47	ESC	B	0,12		0,12		0,12	
48	MCAS	C	0,12			0,12	0,12	
49	VIS	A	0,87	0,87				
50	ZPGS	A	0,72	0,72				
51	FBO	C	0,11			0,11	0,11	
52	KCM	C	0,19			0,19	0,19	
53	FMDS	A	0,76	0,76				
54	JLAS	A	1,45	1,45				
55	CFM	B	1,29		1,29		1,29	
56	FTL	C	1,47			1,47	1,47	
57	DMN	B	0,43		0,43		0,43	
58	MDT	B	2,15		2,15		2,15	
59	IJL	B	5,54		5,54		5,54	
60	JBS	B	1,07		1,07		1,07	
			0,72	0,74	1,04	0,61	0,70	0,6
			(0,11;5,61)	(0,20;4,79)	(0,12;5,61)	(0,11;2,07)	(0,11;5,61)	(0,08;2,86)

TNF- $\alpha$ , fator de necrose tumoral

Medidas de tendência central e dispersão expressas, ao final, em mediana, e limites inferior e superior

## ANEXO 6 - Dados individuais relativos ao nível plasmático da PCR na condição basal

Número	Paciente	Grupo	PCR (mcg/mL)				Controle	
			Total	Grupo A	Grupo B	Grupo C		
1	FRS	C	2,83			2,83	2,83	6,46
2	JCS	C	11,80			11,80	11,80	1,51
3	RKE	C	6,44			6,44	6,44	6,00
4	RM	C	5,87			5,87	5,87	6,21
5	MNKR	C	10,95			10,95	10,95	0,92
6	MSPL	C	6,57			6,57	6,57	2,97
7	AI	C	1,88			1,88	1,88	8,75
8	PAMB	C	1,76			1,76	1,76	8,68
9	MACOA	C	1,34			1,34	1,34	9,45
10	SAVS	C	2,25			2,25	2,25	5,42
11	RSR	C	8,00			8,00	8,00	1,86
12	TCMS	C	0,78			0,78	0,78	8,05
13	LNR	C	3,86			3,86	3,86	2,45
14	MNKR	C	1,55			1,55	1,55	2,73
15	ARS	B	2,21		2,21		2,21	9,91
16	JNA	B	0,97		0,97		0,97	2,72
17	AKD	A	6,72	6,72				4,43
18	DED	A	6,12	6,12				7,42
19	CAS	B	0,36		0,36		0,36	9,76
20	ZRF	B	8,17		8,17		8,17	8,36
21	ANS	A	2,68	2,68				9,38
22	RPTF	A	5,56	5,56				0,67
23	AVNS	A	7,25	7,25				2,39
24	EBM	A	1,21	1,21				1,04
25	DGM	B	1,42		1,42		1,42	2,73
26	DCS	B	0,18		0,18		0,18	3,85
27	CASJ	A	0,63	0,63				0,75
28	CABS	A	3,99	3,99				0,90
29	AF	B	8,88		8,88		8,88	1,45
30	DPS	B	2,47		2,47		2,47	1,96
31	CBMS	C	10,14			10,14	10,14	7,04
32	OLJ	C	9,23			9,23	9,23	9,22
33	CCC	B	2,09		2,09		2,09	
34	NBS	B	9,13		9,13		9,13	
35	ACS	C	5,51			5,51	5,51	
36	JLSC	C	9,70			9,70	9,70	
37	APMN	B	2,89		2,89		2,89	
38	GDN	C	6,79			6,79	6,79	
39	DVS	B	4,15		4,15		4,15	
40	EBS	C	1,62			1,62	1,62	
41	JAN	A	6,53	6,53				
42	MCS	A	5,90	5,90				
43	LFMPC	C	9,32			9,32	9,32	
44	TADB	C	0,83			0,83	0,83	
45	CCS	C	8,90			8,90	8,90	
46	CA	C	6,97			6,97	6,97	
47	ESC	B	9,47		9,47		9,47	
48	MCAS	C	8,09			8,09	8,09	
49	VIS	A	8,48	8,48				
50	ZPGS	A	2,60	2,60				
51	FBO	C	7,36			7,36	7,36	
52	KCM	C	7,94			7,94	7,94	
53	FMDS	A	8,84	8,84				
54	JLAS	A	9,12	9,12				
55	CFM	B	6,90		6,90		6,90	
56	FTL	C	7,79			7,79	7,79	
57	DMN	B	8,61		8,61		8,61	
58	MDT	B	8,32		8,32		8,32	
59	IJL	B	6,87		6,87		6,87	
60	JBS	B	4,27		4,27		4,27	
			6,28	6,01	4,21	6,68	6,50	4,14
			(0,18;11,80)	(0,63;9,12)	(0,18;9,47)	(0,78;11,80)	(0,18;11,80)	(0,67;9,91)

PCR, proteína C reativa;

Medidas de tendência central e dispersão expressas, ao final, em mediana, e limites inferior e superior

## ANEXO 7 - Dados individuais relativos ao nível plasmático da IL-6 na condição basal

Número	Paciente	Grupo	IL-6 (pg/mL)					Controle
			Total	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupos B e C	
1	FRS	C	1,29			1,29	1,29	0,51
2	JCS	C	4,09			4,09	4,09	1,11
3	RKE	C	5,77			5,77	5,77	0,77
4	RM	C	1,98			1,98	1,98	0,31
5	MNKR	C	1,29			1,29	1,29	1,07
6	MSPL	C	1,64			1,64	1,64	0,47
7	AI	C	10,55			10,55	10,55	0,64
8	PAMB	C	2,53			2,53	2,53	0,91
9	MACOA	C	1,45			1,45	1,45	1,20
10	SAVS	C	2,53			2,53	2,53	0,51
11	RSR	C	0,69			0,69	0,69	0,35
12	TCMS	C	0,80			0,80	0,80	0,91
13	LNR	C	1,08			1,08	1,08	0,90
14	MNKR	C	2,01			2,01	2,01	0,87
15	ARS	B	1,07		1,07		1,07	1,04
16	JNA	B	2,90		2,90		2,90	1,12
17	AKD	A	7,52	7,52				1,06
18	DED	A	1,68	1,68				0,90
19	CAS	B	0,79		0,79		0,79	6,57
20	ZRF	B	2,51		2,51		2,51	0,72
21	ANS	A	0,75	0,75				0,86
22	RPTF	A	1,38	1,38				0,43
23	AVNS	A	1,97	1,97				0,82
24	EBM	A	1,12	1,12				5,09
25	DGM	B	0,95		0,95		0,95	0,37
26	DCS	B	10,58		10,58		10,58	1,50
27	CASJ	A	0,83	0,83				0,79
28	CABS	A	1,22	1,22				1,34
29	AF	B	1,83		1,83		1,83	7,93
30	DPS	B	4,59		4,59		4,59	1,13
31	CBMS	C	3,02			3,02	3,02	0,52
32	OLJ	C	2,27			2,27	2,27	0,29
33	CCC	B	0,68		0,68		0,68	8,48
34	NBS	B	1,40		1,40		1,40	0,36
35	ACS	C	2,97			2,97	2,97	8,02
36	JLSC	C	7,14			7,14	7,14	
37	APMN	B	0,37		0,37		0,37	
38	GDN	C	1,10			1,10	1,10	
39	DVS	B	1,51		1,51		1,51	
40	EBS	C	0,71			0,71	0,71	
41	JAN	A	1,49	1,49				
42	MCS	A	1,91	1,91				
43	LFMPC	C	1,15			1,15	1,15	
44	TADB	C	1,56			1,56	1,56	
45	CCS	C	1,25			1,25	1,25	
46	CA	C	1,06			1,06	1,06	
47	ESC	B	2,43		2,43		2,43	
48	MCAS	C	1,11			1,11	1,11	
49	VIS	A	1,60	1,60				
50	ZPGS	A	3,14	3,14				
51	FBO	C	1,33			1,33	1,33	
52	KCM	C	1,08			1,08	1,08	
53	FMDS	A	0,40	0,40		0,40		
54	JLAS	A	1,81	1,81				
55	CFM	B	0,78		0,78		0,78	
56	FTL	C	1,93			1,93	1,93	
57	DMN	B	6,15		6,15		6,15	
58	MDT	B	0,59		0,59		0,59	
59	IJL	B	0,77		0,77		0,77	
60	JBS	B	1,44		1,44		1,44	
			1,47 (0,37;10,6)	1,54 (0,40;7,52)	1,42 (0,37;10,58)	1,51 (0,69;10,55)	1,44 (0,37;10,58)	0,90 (0,29;8,48)

IL-6, interleucina-6;

Medidas de tendência central e dispersão expressas, ao final, em mediana, e limites inferior e superior



### ANEXO 8 - Dados individuais relativos ao nível plasmático da IL-10 na condição basal

Número	Paciente	Grupo	IL-10 (pg/mL)					Controle
			Total	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupos B e C	
1	FRS	C	1,36			1,36	1,36	0,78
2	JCS	C	0,53			0,53	0,53	0,81
3	RKE	C	1,98			1,98	1,98	2,18
4	RM	C	2,56			2,56	2,56	1,19
5	MNKR	C	2,37			2,37	2,37	2,58
6	MSPL	C	1,40			1,40	1,40	0,36
7	AI	C	1,96			1,96	1,96	1,20
8	PAMB	C	1,14			1,14	1,14	0,61
9	MACOA	C	1,73			1,73	1,73	1,69
10	SAVS	C	4,29			4,29	4,29	2,32
11	RSR	C	1,40			1,40	1,40	2,01
12	TCMS	C	2,88			2,88	2,88	1,57
13	LNR	C	4,49			4,49	4,49	2,37
14	MNKR	C	2,85			2,85	2,85	0,95
15	ARS	B	6,22		6,22		6,22	1,82
16	JNA	B	5,29		5,29		5,29	1,62
17	AKD	A	3,06	3,06				1,02
18	DED	A	3,18	3,18				2,37
19	CAS	B	1,03		1,03		1,03	0,03
20	ZRF	B	3,16		3,16		3,16	0,36
21	ANS	A	2,09	2,09				0,27
22	RPTF	A	3,97	3,97				2,31
23	AVNS	A	2,08	2,08				0,93
24	EBM	A	2,10	2,10				0,38
25	DGM	B	1,21		1,21		1,21	0,46
26	DCS	B	1,38		1,38		1,38	0,21
27	CASJ	A	1,54	1,54				0,12
28	CABS	A	5,97	5,97				0,54
29	AF	B	1,22		1,22		1,22	0,10
30	DPS	B	2,69		2,69		2,69	0,15
31	CBMS	C	1,48			1,48	1,48	3,32
32	OLJ	C	1,15			1,15	1,15	0,003
33	CCC	B	4,06		4,06		4,06	
34	NBS	B	3,39		3,39		3,39	
35	ACS	C	3,42			3,42	3,42	
36	JLSC	C	5,94			5,94	5,94	
37	APMN	B	1,16		1,16		1,16	
38	GDN	C	4,13			4,13	4,13	
39	DVS	B	1,93		1,93		1,93	
40	EBS	C	1,95			1,95	1,95	
41	JAN	A	1,25	1,25				
42	MCS	A	3,13	3,13				
43	LFMPC	C	0,50			0,50	0,50	
44	TADB	C	3,05			3,05	3,05	
45	CCS	C	0,96			0,96	0,96	
46	CA	C	0,79			0,79	0,79	
47	ESC	B	0,59		0,59		0,59	
48	MCAS	C	0,73			0,73	0,73	
49	VIS	A	1,00	1,00				
50	ZPGS	A	1,62	1,62				
51	FBO	C	0,88			0,88	0,88	
52	KCM	C	1,04			1,04	1,04	
53	FMDS	A	0,04	0,04				
54	JLAS	A	1,50	1,50				
55	CFM	B	0,04		0,04		0,04	
56	FTL	C	3,72			3,72	3,72	
57	DMN	B	5,89		5,89		5,89	
58	MDT	B	11,88		11,88		11,88	
59	IJL	B	2,18		2,18		2,18	
60	JBS	B	1,66		1,66		1,66	
			1,95	2,09	2,06	1,84	1,94	0,94
			(0,04;11,9)	(0,04;5,97)	(0,04;11,88)	(0,50;5,94)	(0,04;11,88)	(0,003;3,32)

IL-10, interleucina-10;

Medidas de tendência central e dispersão expressas, ao final, em mediana, e limites inferior e superior

**Anexo 9 - Dados individuais relativos ao nível plasmático do vWF:Ag nas condições pré-tratamento, 30, 90 e 180 dias, nos grupos placebo e rosuvastatina**

Placebo				Estatina			
vWF:Ag (U/dL)				vWF:Ag (U/dL)			
Pré-tratamento	30 dias	90 dias	180 dias	Pré-tratamento	30 dias	90 dias	180 dias
145,53	176,17	202,04	166,31	146,01	136,23	143,08	119,04
102,49	120,85	102,87	98,82	146,51	130,34	121,76	127,03
112,89	145,93	218,26	132,55	137,02	147,18	109,36	108,76
124,33	131,46	137,91	117,88	116,56	125,43	118,47	118,56
177,48	199,52	199,24	212,53	145,70	175,88	171,41	169,02
81,96	92,19	88,03	90,24	138,02	141,53	142,58	146,30
137,41	133,80	153,30	133,03	134,93	133,89	138,55	117,88
125,19	144,92	115,59	115,43	138,59	117,74	92,02	89,92
120,51	111,73	114,75	122,46	72,27	81,83	79,46	63,16
119,77	130,95	137,42	131,18	94,81	130,58	85,96	80,43
135,45	123,48	120,87	119,00	152,17	165,02	164,36	171,21
86,10	78,89	93,03	83,60	127,76	115,97	102,51	89,68
111,36	97,62	107,21	126,95	94,07	59,72	62,21	103,91
122,49	111,28	112,94	107,46	79,22	94,60	90,21	93,79
123,05	125,17	116,58	126,01	120,98	129,77	132,68	123,39
140,60	131,48	134,21	129,99	133,05	125,00	120,85	134,07
132,21	119,37	129,61	152,24	118,14	125,49	129,77	112,64
103,39	111,67	105,88	84,69	146,92	138,68	134,14	141,50
94,29	109,58	114,04	111,56	114,74	92,28	104,75	114,12
108,96	117,31	125,84	111,20	112,74	118,90	112,98	108,58
124,84	124,18	115,03	124,10	89,26	86,91	80,14	91,03
127,11	123,89	124,50	123,50	113,98	125,61	116,44	121,41
158,74	152,16	165,41	149,24	122,06	117,88	118,06	137,18
150,52	150,43	134,70	135,43	146,51	130,68	136,11	121,56
147,90	154,62	145,95	148,19	119,76	111,42	117,36	112,27
111,69	142,27	130,61	123,78	128,55	133,50	133,09	143,51
153,73	154,07	165,80	169,81	133,05	131,74	157,99	134,96
72,50	57,84	82,02	28,00	152,02	148,96	160,98	151,03
109,74	117,38	125,78	103,34	104,86	105,82	109,54	114,89
98,30	119,34	115,13	134,06	89,84	80,31	105,72	92,40
122,02 (23,79)	126,98 (27,50)	131,15 (32,30)	123,75 (31,92)	122,34 (22,35)	121,96 (25,07)	119,75 (26,56)	118,44 (24,92)

vWF:Ag, fator de von Willebrand;

Medidas de tendência central e dispersão expressas, ao final, em média e desvio padrão.

**ANEXO 10 - Dados individuais relativos ao nível plasmático do t-PA nas condições pré-tratamento, 30, 90 e 180 dias, nos grupos placebo e rosuvastatina**

Placebo				Estatina			
t-PA (ng/mL)				t-PA (ng/mL)			
Pré-tratamento	30 dias	90 dias	180 dias	Pré-tratamento	30 dias	90 dias	180 dias
12,92	10,76	10,97	9,77	18,24	14,41	17,47	13,71
7,19	7,64	5,46	8,52	9,51	9,77	6,99	8,91
11,75	9,76	14,93	12,83	5,55	6,75	5,14	7,91
10,16	9,05	8,43	8,04	10,92	10,18	7,77	10,18
23,93	21,80	15,40	25,56	11,28	12,30	8,33	12,34
12,18	12,13	8,63	5,76	6,21	8,13	4,82	5,50
9,07	8,62	6,41	5,78	8,22	11,78	9,18	9,33
3,96	4,79	3,49	4,19	7,42	6,78	4,02	2,63
11,90	14,80	18,53	15,30	12,22	12,87	9,49	11,77
3,01	10,41	10,70	9,53	4,70	4,97	6,24	4,90
6,25	5,82	6,02	6,08	3,93	3,85	4,64	4,48
4,62	5,21	4,38	4,81	8,93	7,85	8,62	9,72
6,55	6,31	7,44	7,49	4,49	4,83	5,10	4,67
5,32	5,36	4,89	5,07	5,41	4,35	4,91	4,86
12,01	10,20	6,08	8,97	6,23	5,66	5,64	7,21
7,01	7,04	7,98	8,02	16,15	14,61	13,02	13,57
10,02	10,59	11,82	16,64	5,56	5,22	6,58	6,19
10,43	14,45	14,80	15,65	18,55	12,31	21,05	16,35
7,04	7,03	7,41	7,43	10,06	10,76	9,16	9,82
6,92	8,46	7,78	9,21	7,26	8,18	6,71	7,23
9,35	6,79	10,19	8,63	4,61	4,92	5,24	6,24
13,87	14,98	17,77	13,16	6,94	6,88	8,15	7,98
11,68	13,24	15,15	12,77	7,02	7,15	7,15	9,10
8,95	8,16	7,75	6,90	6,69	5,70	7,41	6,61
5,30	8,59	6,20	8,73	3,61	3,78	4,06	3,57
5,56	8,10	6,87	5,32	5,81	6,17	5,84	7,79
8,42	9,50	13,12	10,37	7,70	6,19	8,83	6,04
8,71	6,73	8,24	7,67	6,32	5,55	7,13	7,09
10,65	8,31	9,18	8,72	8,44	6,42	8,41	6,07
5,31	5,08	4,64	5,34	6,24	5,33	5,34	4,65
9,00 (4,04)	9,32 (3,70)	9,36 (4,12)	9,41 (4,50)	8,14 (3,89)	7,79 (3,20)	7,75 (3,73)	7,88 (3,26)

t-PA, ativador do plasminogênio tecidual;

Medidas de tendência central e dispersão expressas, ao final, em média e desvio padrão.

**ANEXO 11 - Dados individuais relativos ao nível plasmático do PAI-1 nas condições pré-tratamento, 30, 90 e 180 dias, nos grupos placebo e rosuvastatina**

Placebo				Estatina			
PAI-1 (ng/mL)				PAI-1 (ng/mL)			
Pré-tratamento	30 dias	90 dias	180 dias	Pré-tratamento	30 dias	90 dias	180 dias
43,49	27,58	43,40	30,76	60,60	72,24	58,19	45,09
23,80	27,33	54,80	38,53	29,31	18,73	27,20	24,74
34,42	43,78	46,57	43,92	28,27	16,72	11,08	35,57
31,14	34,37	27,80	25,31	37,21	43,84	35,45	55,55
134,71	119,64	90,97	164,86	43,56	72,35	57,10	55,51
49,69	51,93	36,82	23,29	23,86	51,64	18,77	17,54
30,22	41,14	14,77	15,89	41,96	94,52	100,28	113,14
17,41	24,86	25,44	16,48	14,97	18,34	9,94	6,94
69,82	119,72	76,08	58,05	103,28	65,39	55,54	40,22
11,18	35,27	51,54	35,27	12,68	12,25	24,66	15,33
17,00	7,05	8,61	13,26	9,85	39,18	9,97	5,35
17,45	17,54	15,05	19,73	81,32	47,98	53,57	57,04
42,68	13,72	29,37	25,09	24,60	17,36	39,82	16,66
18,75	20,96	19,86	19,64	20,76	11,02	20,06	10,36
69,05	41,41	22,88	35,97	51,72	46,05	48,78	74,49
24,08	19,40	27,49	17,43	32,63	34,60	30,29	35,61
9,69	15,81	8,13	16,28	27,08	18,30	18,22	15,25
9,88	11,61	7,46	13,19	54,80	41,28	43,85	27,29
22,53	19,78	19,76	19,49	20,55	18,54	17,11	12,62
22,85	25,39	19,10	21,57	10,71	24,73	9,27	15,83
16,15	12,41	31,38	12,62	12,76	13,31	13,24	13,85
45,55	104,36	91,06	48,50	17,33	30,07	22,53	28,26
42,93	29,53	54,82	73,10	20,99	28,70	39,05	28,69
19,69	30,32	11,24	18,64	31,98	31,32	27,10	22,43
9,74	14,99	9,56	11,01	39,20	24,03	18,01	31,89
24,15	26,12	15,69	23,37	13,54	11,47	9,43	13,89
67,44	73,56	95,99	69,84	13,28	8,15	11,67	7,44
28,64	33,24	28,96	23,32	24,46	17,99	18,39	14,22
18,31	18,05	45,33	12,22	18,75	18,41	21,43	22,03
15,41	12,73	16,76	13,60	17,87	17,19	44,07	12,00
23,94 (9,69;134,71)	26,73 (7,05; 119,72)	27,64 (7,46; 95,99)	22,43 (11,01;164,86)	24,53 (9,85; 103,28)	24,38 (8,15; 94,52)	23,60 (9,27; 100,28)	22,23 (5,35; 113,14)

PAI-1, inibidor do ativador do plasminogênio;

Medidas de tendência central e dispersão expressas, ao final, em mediana, e limites inferior e superior.

**ANEXO 12 - Dados individuais relativos ao nível plasmático da selectina P nas condições pré-tratamento, 30, 90 e 180 dias, nos grupos placebo e rosuvastatina**

Placebo				Estatina			
Selectina-P (ng/mL)				Selectina-P (ng/mL)			
Pré-tratamento	30 dias	90 dias	180 dias	Pré-tratamento	30 dias	90 dias	180 dias
76,00	81,79	69,01	64,36	62,81	47,29	54,09	53,24
85,33	79,65	81,61	80,18	83,36	75,88	63,59	66,83
50,19	47,23	61,69	50,42	32,99	34,15	26,75	26,40
81,76	74,10	79,78	67,16	79,65	63,90	61,89	69,53
91,61	96,30	70,07	95,50	29,16	34,84	26,69	25,22
33,65	35,17	31,85	31,15	47,83	42,54	42,73	40,90
23,42	18,70	23,99	16,79	57,56	47,25	62,39	45,50
62,55	59,81	62,22	48,56	75,06	52,68	56,18	47,78
41,22	55,89	39,25	32,89	46,17	54,62	38,44	35,42
14,18	18,68	21,76	17,01	24,37	26,82	24,47	20,35
30,23	30,42	30,67	28,58	22,02	20,87	19,26	30,40
41,98	37,73	35,62	34,99	40,02	29,40	29,53	26,21
23,63	26,25	30,30	28,16	28,87	25,31	17,77	19,93
13,68	22,41	17,17	24,95	42,56	45,49	50,55	45,65
36,19	30,64	20,44	35,11	49,58	47,49	37,22	46,46
136,94	140,79	139,53	135,22	51,90	48,55	41,12	40,56
54,42	51,20	52,43	52,43	37,72	37,88	33,38	33,95
35,37	38,68	42,55	42,62	45,78	38,15	36,60	37,46
45,75	48,64	47,79	47,88	25,41	32,67	27,24	32,96
32,82	37,72	35,93	36,22	19,26	19,24	17,25	18,26
36,65	31,84	54,99	47,07	46,59	52,09	40,74	50,85
37,60	44,78	57,54	41,03	49,93	45,27	40,99	41,35
51,68	62,76	63,13	61,86	18,75	17,49	17,92	25,45
42,38	41,05	51,97	55,08	21,13	21,74	20,49	27,94
40,57	43,94	51,16	46,29	24,89	34,43	35,71	27,30
43,87	54,85	44,25	42,66	43,90	41,07	39,36	43,27
18,29	19,06	18,77	16,05	31,99	30,72	24,71	26,76
48,40	62,46	62,13	57,37	15,53	13,77	11,66	14,10
29,85	34,91	33,96	24,06	20,19	21,98	24,90	22,15
10,71	13,27	11,48	10,56	23,05	23,75	21,55	19,66
45,70 (26,81)	48,02 (26,86)	48,10 (25,67)	45,74 (25,64)	39,93 (18,50)	37,58 (14,57)	34,84 (14,60)	35,39 (13,88)

Medidas de tendência central e dispersão expressas, ao final, em média e desvio padrão.

**ANEXO 13 - Dados individuais relativos ao nível plasmático do TNF- $\alpha$   
nas condições pré-tratamento, 30, 90 e 180 dias, nos  
grupos placebo e rosuvastatina**

Placebo				Estatina			
TNF- $\alpha$ (pg/mL)				TNF- $\alpha$ (pg/mL)			
Pré-tratamento	30 dias	90 dias	180 dias	Pré-tratamento	30 dias	90 dias	180 dias
0,71	1,62	1,23	3,64	1,22	2,13	2,47	2,23
0,69	1,04	0,79	1,06	1,07	0,87	0,89	1,18
0,84	0,76	1,28	0,74	1,44	1,70	1,71	2,01
1,15	0,91	0,98	0,97	1,19	1,20	1,29	1,91
1,31	1,11	1,30	1,87	2,07	1,52	2,56	1,19
0,67	0,88	0,70	0,92	0,29	0,40	0,68	0,52
0,39	0,46	0,46	0,51	0,84	1,04	1,10	0,99
0,31	0,32	0,35	0,47	0,81	0,35	0,77	0,36
0,63	0,56	0,76	0,65	1,94	1,91	2,11	3,14
1,62	1,40	1,38	1,12	0,31	0,45	0,45	0,43
0,72	0,72	0,72	0,60	0,62	0,51	0,80	0,62
0,72	0,76	1,36	0,68	1,64	1,28	5,22	1,96
5,25	5,39	5,40	6,29	1,38	1,67	1,52	1,50
4,79	5,01	4,78	5,24	3,55	1,09	0,85	1,02
5,61	5,51	2,95	4,19	1,80	2,20	1,76	1,81
0,36	0,10	0,01	0,37	0,56	0,48	0,44	0,37
0,36	0,45	0,56	0,38	0,54	0,49	0,42	0,63
1,09	0,99	0,82	1,25	0,41	0,43	0,33	0,32
0,30	0,28	0,40	0,48	1,02	1,08	1,10	1,12
0,29	0,27	0,38	0,46	0,18	0,24	0,18	0,27
0,20	0,20	0,18	0,30	0,23	0,22	0,16	0,29
0,44	0,39	0,28	0,31	0,44	0,50	0,39	0,39
0,55	0,61	0,22	0,28	0,18	0,20	0,17	0,15
0,12	0,18	0,07	0,13	0,12	0,16	0,42	0,35
0,87	0,87	0,77	0,94	0,72	0,94	1,79	0,67
0,11	0,21	0,14	0,18	0,19	0,26	0,09	0,09
0,76	1,25	0,51	0,82	1,45	1,38	1,58	0,91
1,47	1,21	1,09	1,18	1,29	1,24	0,97	1,00
2,15	2,46	2,38	1,51	0,43	0,38	1,03	0,43
1,07	1,33	1,27	0,94	5,54	4,34	8,41	5,43
0,71 (0,11; 5,61)	0,82 (0,10; 5,51)	0,77 (0,01; 5,40)	0,78 (0,13; 6,29)	0,82 (0,12; 5,54)	0,91 (0,16; 4,34)	0,93 (0,09; 8,41)	0,79 (0,09; 5,43)

TNF- $\alpha$ , fator de necrose tumoral

Medidas de tendência central e dispersão expressas, ao final, em mediana, e limites inferior e superior

**ANEXO 14 - Dados individuais relativos ao nível plasmático da PCR  
nas condições pré-tratamento, 30, 90 e 180 dias, nos  
grupos placebo e rosuvastatina**

Placebo				Estatina			
PCR (mcg/mL)				PCR (mcg/mL)			
Pré-tratamento	30 dias	90 dias	180 dias	Pré-tratamento	30 dias	90 dias	180 dias
2,83	2,15	5,31	5,57	11,80	11,42	12,93	11,17
6,44	10,33	5,53	2,99	5,87	4,48	10,46	3,45
10,95	11,94	18,16	10,94	6,57	6,04	8,68	8,13
1,76	0,33	2,20	1,23	1,88	1,70	1,20	1,81
2,25	2,19	4,31	3,44	1,34	0,24	0,46	0,14
0,78	3,32	0,68	1,04	8,00	11,89	8,55	5,72
1,55	3,32	0,59	0,87	3,86	1,70	2,40	7,05
2,21	1,47	1,10	2,51	0,97	0,64	0,64	0,22
6,12	10,81	10,13	5,21	6,72	5,04	2,71	7,58
8,17	1,77	3,79	1,68	0,36	0,38	0,09	0,08
5,56	4,08	4,04	3,49	2,68	3,16	4,74	5,81
1,21	0,62	0,52	0,63	7,25	1,44	2,19	1,29
0,18	0,18	0,33	0,21	1,42	0,83	1,37	0,87
3,99	1,87	1,72	2,72	0,63	0,37	3,10	0,28
2,47	4,22	7,93	2,38	8,88	10,95	10,07	7,89
9,23	9,72	9,16	9,84	10,14	9,87	9,87	9,88
9,13	9,96	9,33	9,21	2,09	8,39	2,70	1,31
5,51	3,89	4,76	6,71	9,70	7,57	7,27	10,56
6,79	8,21	8,57	10,40	2,89	6,57	3,32	5,96
4,15	4,47	5,99	9,41	1,62	1,53	1,35	0,95
6,53	7,94	7,63	6,65	5,90	4,94	4,95	4,62
9,32	9,48	9,18	7,30	0,83	1,09	0,65	0,65
6,97	5,84	6,99	4,74	8,90	5,06	5,40	5,60
9,47	6,84	6,43	8,41	8,09	3,91	4,05	6,92
8,48	8,03	8,51	9,84	2,60	2,43	8,79	5,18
7,36	6,02	8,65	8,79	7,94	9,00	8,05	7,83
8,84	9,41	9,56	9,43	9,12	7,89	8,07	7,40
7,79	4,27	5,86	9,39	6,90	4,14	3,12	2,70
8,32	6,82	8,16	7,39	8,61	9,06	9,15	9,12
4,27	4,82	8,90	7,65	6,87	7,59	8,80	9,39
6,28 (0,18; 10,95)	4,64 (0,18; 11,94)	6,21 (0,33; 18,16)	6,11 (0,21; 10,94)	6,23 (0,36; 11,80)	4,71 (0,24; 11,89)	4,39 (0,09; 12,93)	5,66 (0,08; 11,17)

PCR, proteína C reativa;

Medidas de tendência central e dispersão expressas, ao final, em mediana, e limites inferior e superior

**ANEXO 15 - Dados individuais relativos ao nível plasmático da IL-6 nas condições pré-tratamento, 30, 90 e 180 dias, nos grupos placebo e rosuvastatina**

Placebo				Estatina			
IL-6 (pg/mL)				IL-6 (pg/mL)			
Pré-tratamento	30 dias	90 dias	180 dias	Pré-tratamento	30 dias	90 dias	180 dias
1,29	1,80	1,05	4,21	4,09	1,87	1,89	2,12
5,77	9,75	9,60	9,26	1,98	2,23	5,73	3,02
1,29	1,93	5,05	1,46	1,64	7,00	3,28	2,01
2,53	2,42	2,95	2,29	10,55	8,83	4,04	11,26
2,53	1,93	1,24	1,58	1,45	2,82	1,97	0,89
0,80	2,04	1,67	1,19	0,69	2,59	0,90	0,84
2,01	0,54	0,49	0,99	1,08	1,99	0,89	0,76
1,07	0,72	0,87	1,16	2,90	3,13	1,78	0,96
1,68	10,95	1,45	1,03	7,52	6,17	5,92	7,07
2,51	0,59	8,67	0,60	0,79	1,21	0,53	0,30
1,38	1,84	1,20	1,10	0,75	0,75	0,83	1,54
1,12	1,02	0,59	0,81	1,97	1,45	1,93	1,39
10,58	7,20	6,34	7,20	0,95	0,31	2,32	1,07
1,22	0,56	0,52	1,19	0,83	0,73	1,23	1,96
4,59	3,03	3,38	3,04	1,83	2,64	2,22	4,39
2,27	1,77	2,22	1,08	3,02	5,51	3,02	2,12
1,40	1,45	4,48	1,76	0,68	1,51	6,12	0,50
2,97	1,73	2,13	2,82	7,14	3,81	4,30	9,46
1,10	0,95	1,24	2,57	0,37	0,60	0,35	1,50
1,51	1,44	1,22	2,32	0,71	0,90	0,30	0,57
1,49	1,74	2,48	3,27	1,91	1,34	1,31	1,35
1,15	0,95	1,22	0,53	1,56	1,43	1,48	1,03
1,06	1,19	0,78	1,79	1,25	0,98	1,27	2,34
2,43	0,63	0,32	0,49	1,11	0,51	0,61	2,43
1,60	2,87	1,90	6,04	3,14	3,27	8,00	3,80
1,33	2,03	1,93	1,29	1,08	1,67	1,08	0,82
0,40	1,99	7,12	3,25	1,81	0,97	2,80	1,03
1,93	0,80	1,91	2,19	0,78	0,56	1,14	1,56
0,59	0,20	0,13	0,44	6,15	2,13	1,61	1,82
1,44	1,44	2,22	3,71	0,77	1,04	3,81	1,97
1,46 (0,40; 10,58)	1,74 (0,20; 10,95)	1,79 (0,13; 9,60)	1,67 (0,44; 9,26)	1,51 (0,37; 10,55)	1,59 (0,31; 8,83)	1,84 (0,30; 8,00)	1,55 (0,30; 11,26)

IL-6, interleucina 6;

Medidas de tendência central e dispersão expressas, ao final, mediana, e limites inferior e superior



**ANEXO 16 - Dados individuais relativos ao nível plasmático da IL-10  
nas condições pré-tratamento, 30, 90 e 180 dias, nos  
grupos placebo e rosuvastatina**

Placebo				Estatina			
IL-10 (pg/mL)				IL-10 (pg/mL)			
Pré-tratamento	30 dias	90 dias	180 dias	Pré-tratamento	30 dias	90 dias	180 dias
1,36	3,01	1,00	1,10	0,53	0,54	0,60	0,01
1,98	1,44	2,40	1,73	2,56	1,38	0,92	0,91
2,37	5,01	4,01	1,76	1,40	3,36	1,93	2,26
1,14	1,38	1,47	1,98	1,96	2,65	2,43	4,08
4,29	4,78	4,08	4,33	1,73	2,26	2,68	1,82
2,88	2,30	2,88	4,78	1,40	2,27	2,08	2,56
2,85	4,95	2,46	3,62	4,49	4,66	7,19	3,39
6,22	4,63	8,03	6,10	5,29	7,13	5,56	3,76
3,18	3,17	1,93	3,69	3,06	2,63	3,06	3,56
3,16	1,58	2,81	2,63	1,03	1,14	1,74	1,73
3,97	3,22	3,93	3,81	2,09	3,28	2,21	2,19
2,10	1,99	2,41	2,47	2,08	2,23	2,84	2,77
1,38	1,50	1,81	2,11	1,21	0,63	0,97	0,68
5,97	8,19	7,29	9,93	1,54	1,36	1,58	3,38
2,69	2,83	2,09	2,88	1,22	1,22	1,08	1,25
1,15	1,18	1,13	0,82	1,48	1,51	1,25	0,61
3,39	1,81	2,08	2,91	4,06	1,96	3,13	8,43
3,42	7,86	5,70	5,41	5,94	1,81	1,51	2,61
4,13	3,97	4,20	5,67	1,16	1,54	1,66	2,03
1,93	1,77	1,81	2,04	1,95	6,68	1,22	1,46
1,25	1,58	1,49	1,92	3,13	3,15	3,54	3,70
0,50	0,47	0,37	0,32	3,05	1,40	0,64	0,74
0,79	2,22	0,53	0,63	0,96	0,29	0,26	0,31
0,59	0,43	0,46	0,66	0,73	0,90	0,74	1,00
1,00	1,46	0,97	1,31	1,62	1,60	3,20	1,52
0,88	1,02	1,24	1,16	1,04	0,74	1,23	0,75
0,04	0,96	0,34	0,73	1,50	1,52	1,14	1,12
3,72	0,90	1,27	1,17	0,04	1,11	1,14	0,29
11,88	4,99	1,90	1,81	5,89	1,12	0,20	0,10
1,66	3,41	4,16	2,65	2,18	2,43	3,77	1,74
2,23 (0,04; 11,88)	2,10 (0,43; 8,19)	2,00 (0,34; 8,03)	2,08 (0,32; 9,93)	1,67 (0,04; 5,94)	1,57 (0,29; 7,13)	1,62 (0,20; 7,19)	1,73 (0,01; 8,43)

IL-10, interleucina 10;

Medidas de tendência central e dispersão expressas, ao final, mediana, e limites inferior e superior

## **8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

1. Rich S, Dantzker DR, Ayres SM, et al. Primary pulmonary hypertension: a national prospective study. *Ann Int Med.* 1987;107:216-23.
2. Barst RJ, McGoon M, Torbicki A, et al. Diagnosis and differential assessment of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 2004;43: Suppl.12, 40S–47S.
3. Simonneau G, Robbins IM, Beghetti M, et al. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 2009; 54:S43-S54.
4. Cecchi F, Sgalambro A, Baldi M, et al. Microvascular dysfunction, myocardial ischemia, and progression to heart failure in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Cardiovasc Transl Res.* 2009; 2:452-61.
5. Czernichow S, Greenfield JR, Galan P, et al. Macrovascular and microvascular dysfunction in the metabolic syndrome. *Hypertens Res.* 2010;33:293-7.
6. Wong WT, Wong SL, Tian XY, Huang Y. Endothelial dysfunction: the common consequence in diabetes and hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2010;55(4):300-7.
7. Malyszko J. Mechanism of endothelial dysfunction in chronic kidney disease. *Clin Chim Acta.* 2010;411(19-20):1412-20.
8. Sitia S, Tomasoni L, Atzeni F, Ambrosio G, Cordiano C, Catapano A, Tramontana S, Perticone F, Naccarato P, Camici P, Picano E, Cortigiani L, Bevilacqua M, Milazzo L, Cusi D, Barlassina C, Sarzi-

- Puttini P, Turiel M. From endothelial dysfunction to atherosclerosis. *Autoimmun Rev.* 2010;9(12):830-4.
9. Budhiraja R, Tuder RM, Hassoun PM. Endothelial Dysfunction in Pulmonary Hypertension. *Circulation.* 2004;109:159-65.
  10. Thompson K, Rabinovitch M. Exogenous leukocyte and endogenous elastases can mediate mitogenic activity in pulmonary artery smooth muscle cells by release of extracellularmatrix bound basic fibroblast growth factor. *J. Cell. Physiol* 1996. 166:495–505.
  11. Rostagno C, Prisco D, Abbate R, Poggesi L. Pulmonary hypertension associated with long-standing thrombocytosis. *Chest* 1991; 99: 1303-5.
  12. Hassoun PM, Mouthon L, Barberà JA, et al. Inflammation, growth factors, and pulmonary vascular remodeling. *J Am Coll Cardiol.* 2009;54(1 Suppl):S10-9.
  13. Hoepfer MM, Sosada M, Fabel H. Plasma coagulation profiles in patients with severe primary pulmonary hypertension. *Eur Respir J.* 1998;12:1446-9.
  14. Badesch DB, Tapson VF, McGoon MD, et al. Continuous intravenous epoprostenol for pulmonary hypertension due to scleroderma spectrum of disease. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med.* 2000;132:425-34.
  15. Launay D, Mouthon L, Hachulla E, et al. Prevalence and characteristics of moderate to severe pulmonary hypertension in

- systemic sclerosis with and without interstitial lung disease. *J Rheumatol.* 2007;34:1005-11.
16. Lapa MS, Ferreira EV, Jardim C, Martins B do C, Arakaki JS, Souza R. Clinical characteristics of pulmonary hypertension patients in two reference centers in the city of Sao Paulo. *Rev Assoc Med Bras.* 2006;52:139-43.
  17. Loyd JE, Butler MG, Foroud TM, Conneally PM, Phillips JA 3rd, Newman JH. Genetic anticipation and abnormal gender ratio at birth in familial primary pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995; 152:93-7.
  18. Cogan JD, Pauciulo MW, Batchman AP, et al. High frequency of BMPR2 exonic deletions/duplications in familial pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;174:590-8.
  19. Aldred MA, Vijaykrishnan J, James V, et al. BMPR2 gene rearrangements account for a significant proportion of mutations in familial and idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Hum Mutat.* 2006;27:212-3.
  20. Humbert M, Sitbon O, Chaouat A, et al. Pulmonary arterial hypertension in France: results from a national registry. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;173:1023-30.
  21. D'Alonzo GE, Barst RJ, Ayres SM, et al. Survival in patients with primary pulmonary hypertension. Results from a national prospective registry. *Ann Intern Med.* 1991;115:343-9.

22. Widlitz A, Barst RJ. Pulmonary arterial hypertension in children. *Eur Respir J*. 2003; 21: 155-76.
23. Lapa M, Dias B, Jardim C, et al. Cardiopulmonary manifestations of hepatosplenic schistosomiasis. *Circulation*. 2009;119:1518-23.
24. Galie N, Manes A, Palazzini M, et al. Management of pulmonary arterial hypertension associated with congenital systemic-to-pulmonary shunts and Eisenmenger's syndrome. *Drugs*. 2008;68:1049–66.
25. Lopes AA, Bandeira AP, Flores PC, Santana MV. Pulmonary Hypertension in Latin America Pulmonary Vascular Disease: The Global Perspective. *Chest*. 2010;137(Suppl 6):78S–88S.
26. Gillespie MN, Rippetoe PE, Haven CA, et al. Polyamines and epidermal growth factor in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Am Rev Respir Dis*. 1989;140: 1463-6.
27. Mullershausen F, Russwurm M, Koesling D, Friebe A. In vivo reconstitution of the negative feedback in nitric oxide/cGMP signaling: role of phosphodiesterase type 5 phosphorylation. *Mol Biol Cell*. 2004;15:4023-30.
28. 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.
29. Xu W, Kaneko FT, Zheng S, et al. Increased arginase II and decreased NO synthesis in endothelial cells of patients with pulmonary arterial hypertension. *FASEB J*. 2004;18:1746-8.

30. Pullamsetti S, Kiss L, Ghofrani HA, et al. Increased levels and reduced catabolism of asymmetric and symmetric dimethylarginines in pulmonary hypertension. *FASEB J*. 2005;19:1175-7.
31. Vane JR, Anggard EE, Botting RM. Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med*. 1990;323:27-36.
32. Tuder RM, Cool CD, Geraci MW, et al. Prostacyclin synthase expression is decreased in lungs from patients with severe pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;159:1925-32.
33. Hervé P, Launay JM, Scrobahaci ML, et al. Increased plasma serotonin in primary pulmonary hypertension. *Am J Med*. 1995; 99:249-54.
34. Christman BW, McPherson CD, Newman JH, et al. An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *N Engl J Med*. 1992; 327:70-5.
35. Weissberg PL, Witchell C, Davenport AP, Hesketh TR, Metcalfe JC. The endothelin peptides ET-1, ET-2, ET-3 and sarafatoxin S6c are comitogenic with platelet derived growth factor for vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*. 1990;83: 257-62.
36. Agui T, Xin X, Cai Y, Sakai T, Matsumoto K. Stimulation of interleukin-6 production by endothelin in rat bone marrow-derived stromal cells. *Blood*. 1994;84: 2531-8.
37. Peifley KA, Winkless JA. Angiotensin II and endothelin-1 increase fibroblast growth factor-2 mRNA expression in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;242: 202-8.

38. Assender JW, Irenius E, Fredholm BB. Endothelin-1 causes a prolonged protein kinase C activation and acts as a co-mitogen in vascular smooth muscle cells. *Acta Physiol Scand*. 1996;157:451-60.
39. Jaffe AB, Hall A. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Ann Rev Cell Dev Biol*. 2005;21:247-69.
40. Lane KB, Machado RD, Pauciulo MW, et al. Heterozygous germline mutations in a TGF- $\beta$  receptor, BMPR2, are the cause of familial primary pulmonary hypertension. The International PPH Consortium. *Nat Genet*. 2000;26:81-4.
41. Yuan XJ, Wang J, Juhaszova M, Gaine SP, Rubin LJ. Attenuated K<sup>+</sup> channel gene transcription in primary pulmonary hypertension. *Lancet*. 1998;351:726-7.
42. Mandegar M, Remillard CV, Yuan JXJ. Ion channels in pulmonary arterial hypertension. *Prog Cardiovasc Dis*. 2002;45:81-114.
43. Deng Z, Morse JH, Slager SL, et al. Familial primary pulmonary hypertension (gene PPH1) is caused by mutations in the bone morphogenetic protein receptor-II gene. *Am J Hum Genet*. 2000;67:737-44.
44. Thomson JR, Machado RD, Pauciulo MW, et al. Sporadic primary pulmonary hypertension is associated with germline mutations encoding BMPR-II, a receptor member of the TGF-beta family. *J Med Genet*. 2000; 37:741-5.
45. Blobel GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor in human disease. *N Engl J Med* 2000; 342: 1350-8.



46. Hogan BLM. Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev.* 1996; 10:1580-94.
47. Morrell NW, Yang X, Upton PD, et al. Altered growth responses of pulmonary artery smooth muscle cells from patients with primary pulmonary hypertension to transforming growth factor-beta (1) and bone morphogenetic proteins. *Circulation.* 2001; 104:790-5.
48. Trembath RC, Thomson JR, Machado RD, et al. Clinical and molecular genetic features of pulmonary hypertension in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *N Engl J Med.* 2001; 345:325-34.
49. Caramuru 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.
50. Lopes AA, Maeda NY, Almeida A, Jaeger R, Ebaid M, Chamone DF. Circulating platelets aggregates indicative of in vivo platelet activation in pulmonary hypertension. *Angiology.* 1993; 44:701-6.
51. Pakala R, Willerson JT, Benedict CR. Mitogenic effect of serotonin on vascular endothelial cells. *Circulation.* 1994; 90:1919-26.
52. Eddahibi S, Fabre V, Boni C, et al. Induction of serotonin transporter by hypoxia in pulmonary vascular smooth muscle – relationship with the mitogenic action of serotonin. *Circ Res.* 1999; 84:329-36.

53. Boulanger C, Hendrickson H, Lorenz RR, Vanhoute PM. Release of different relaxing factors by porcine endothelial cells in culture. *FASEB J.*1998;2: A314.
54. Eddahibi S, Humbert M, Fadel E, et al. Serotonin transporter overexpression is responsible for pulmonary artery smooth muscle hyperplasia in primary pulmonary hypertension. *J Clin Invest.* 2001; 108:1141-50.
55. Eddahibi S, Humbert M, Fadel E, et al. Hyperplasia of pulmonary artery smooth muscle cells is causally related to overexpression of the serotonin transporter in primary pulmonary hypertension. *Chest.* 2002; 121: 97S-8S.
56. Cacoub P, Karmochkine M, Dorent R, et al. Plasma levels of thrombomodulin in pulmonary hypertension. *Am J Med.* 1996; 101: 160-4.
57. Sakamaki F, Kyotani S, Nagaya N, et al. Increased plasma P-selectin and decreased thrombomodulin in pulmonary arterial hypertension were improved by continuous prostacyclin therapy. *Circulation.* 2000; 102:2720-5.
58. Pinsky DJ, Naka Y, Liao H, et al. Hypoxia-induced exocytosis of endothelial cell Weibel-Palade bodies. A mechanism for rapid neutrophil recruitment after cardiac preservation. *J Clin Invest.* 1996; 97(2):493-500.
59. Uchiyama T, Kurabayashi M, Ohyama Y, et al. Hypoxia induces transcription of the plasminogen activator inhibitor-1 gene through

- genistein-sensitive tyrosine kinase pathways in vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20(4):1155-61.
60. Pinsky DJ, Yan SF, Lawson C, et al. Hypoxia and modification of the endothelium: implications for regulation of vascular homeostatic properties. *Semin Cell Biol.* 1995; 6(5):283-94.
61. Caramuru LH, Maeda NY, Bydlowski SD, Lopes AA. Age-dependent likelihood of in situ thrombosis in secondary pulmonary hypertension. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2004; 10: 217-23.
62. Lopes AA, Maeda NY, Gonçalves RC, Bydlowski SD. Endothelial cell dysfunction correlates differentially with survival in primary and secondary pulmonary hypertension. *Am Heart J.* 2000 139: 618-23.
63. Cool CD, Kennedy D, Voelkel NF, Tuder RM. Pathogenesis and evolution of plexiform lesions in pulmonary hypertension associated with scleroderma and human immunodeficiency virus infection. *Human Pathol.* 1997; 28: 434-42.
64. Lesprit P, Godeau B, Authier FJ, et al. Pulmonary hypertension in POEMS syndrome: a new feature mediated by cytokines. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998; 157: 907-11.
65. Humbert M, Monti G, Brenot F, et al. Increased interleukin-1 and interleukin-6 serum concentrations in severe primary pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995;151: 1628-31.
66. Balabanian K, Foussat A, Dorfmueller P, et al. CX<sub>3</sub>C chemokine fractalkine in pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002; 165:1419-25.

67. Katsushi H, Kazufumi N, Hideki F, et al. Epoprostenol therapy decreases elevated circulating levels of monocyte chemoattractant protein-1 in patients with primary pulmonary hypertension. *Circ J*. 2004; 68: 227-31.
68. Dorfmueller P, Zarka V, Durand-Gasselín I, et al. Chemokine RANTES in severe pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002; 165: 534-9.
69. Molet S, Furukawa K, Maghazechi A, Hamid Q, Giaid A. Chemokine and cytokine-induced expression of endothelin-1 and endothelin converting enzyme-1 in endothelial cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2000; 105: 333-8.
70. Isern RA, Yaneva M, Weiner E, et al. Autoantibodies in patients with primary pulmonary hypertension: association with anti-Ku. *Am J Med*. 1992; 93: 307-12.
71. Barst RJ, Flaster ER, Menon A, Fotino M, Morse JH. Evidence for the association of unexplained pulmonary hypertension in children with the major histocompatibility complex. *Circulation*. 1992; 85: 249-58.
72. Wagenvoort CA. Lung biopsy specimens in the evaluation of pulmonary vascular disease. *Chest* 1980; 77: 614-25.
73. Bjornsson J, Edwards WD. Primary pulmonary hypertension: a histopathologic study of 80 cases. *Mayo Clin Proc* 1985; 60: 16-25.
74. Pietra GG, Edwards WD, Kay JM, et al. Histopathology of primary pulmonary hypertension: a qualitative and quantitative study of pulmonary blood vessels from 58 patients in the National Heart, Lung,

and Blood Institute primary pulmonary hypertension registry. *Circulation*. 1989; 80:1198-206.

75. Heath D, Edward JE. The pathology of hypertensive pulmonary vascular disease: a description of six grades of structural changes in the pulmonary arteries with special reference to congenital cardiac septal defects. *Circulation*. 1958; 18:533-47.
76. Liptay MJ, Parks WC, Mecham RP, et al. Neointimal macrophages colocalize with extracellular matrix gene expression in human atherosclerotic pulmonary arteries. *J Clin Invest*. 1993;91:588-94.
77. Pinto RF, Higuchi Mde L, Aiello VD. Decreased numbers of T-lymphocytes and predominance of recently recruited macrophages in the walls of peripheral pulmonary arteries from 26 patients with pulmonary hypertension secondary to congenital cardiac shunts. *Cardiovasc Pathol*. 2004;13:268-75.
78. Brun H, Holmstrom H, Thaulow E, et al. Patients with pulmonary hypertension related to congenital systemic-to-pulmonary shunts are characterized by inflammation involving endothelial cell activation and platelet-mediated inflammation. *Congenit Heart Dis*. 2009; 4:153-9.
79. Hopkins WE, Ochoa LL, Richardson GW, Trulock EP. Comparison of the hemodynamics and survival of adults with severe primary pulmonary hypertension or Eisenmenger syndrome. *J Heart Lung Transplant*. 1996;15:100-5.
80. Perloff JK, Rosove MH, Sietsema KE, et al. Cyanotic congenital heart disease: a multisystem disorder. In: Perloff JK, Child JS (eds).

*Congenital Heart Disease in Adults*. 2<sup>a</sup> edição. Philadelphia: WB Saunders; 1998. pp.199-26.

81. Oechslin EN, Colman JN. Coagulation and anticoagulation of adults with congenital heart disease. *MD Consult Cardiology* 2002. Disponível em: <http://www.mdconsult.com>.
82. Kidd L, Driscoll DJ, Gersony WM, et al. Second natural history study of congenital heart defects. Results of treatment of patients with ventricular septal defects. *Circulation*. 1993, 87(2 Suppl):I38-51.
83. McLaughlin VV, Shillington A, Rich S. Survival in primary pulmonary hypertension: the impact of epoprostenol therapy. *Circulation* 2002; 106:1477-82.
84. Oudiz RJ, Schilz RJ, Barst RJ, et al. Treprostinil, a prostacyclin analogue, in pulmonary arterial hypertension associated with connective tissue disease. *Chest*. 2004; 126: 420-7.
85. Olschewski H, Simonneau G, Galiè N, et al. Inhaled iloprost for severe pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 2002; 347: 322–329
86. Barst RJ, McGoon M, McLaughlin V, et al. Beraprost Therapy for Pulmonary Arterial Hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41:2119-25.
87. Rubin LJ, Badesch DB, Barst RJ, et al. Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 2002; 346:896-903.
88. Galiè N, Beguetti M, Gatzoulis MA, et al. Bosentan therapy in patients with Eisenmenger syndrome: a multicenter, double-blind, randomized, placebo controlled study. *Circulation* 2006; 114:48-54.

89. McLaughlin VV. Survival in patients with pulmonary arterial hypertension treated with first-line bosentan. *Eur J Clin Invest* 2006; 36 Suppl 3:10-5.
90. Langleben D, Brock T, Dixon R, et al. STRIDE-1: effects of the selective ET(A) receptor antagonist, sitaxsentan sodium, in a patient population with pulmonary arterial hypertension that meets traditional inclusion criteria of previous pulmonary arterial hypertension trials. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2004;44 Suppl 1:S80-4.
91. Galié N, Badesch D, Oudiz R, et al. Ambrisentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2005;46:529-35.
92. Wharton, J, Strange, JW, Moller, GMO, et al. Antiproliferative Effects of Phosphodiesterase Type 5 Inhibition in Human Pulmonary Artery Cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172:105-13.
93. Galiè N, Ghofrani HA, Torbicki A, et al. Sildenafil citrate therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 2005. 353:2148-57.
94. Barreto AC, Franchi SM, Castro CRP, Lopes AA. One-year follow-up of the effects of sildenafil on pulmonary arterial hypertension and veno-occlusive disease. *Braz J Med Biol Res* 2005; 38:185-95.
95. Franchi SM, Barreto AC, Cícero C, et al. Two-year follow-up of pulmonary arterial hypertension patients treated with sildenafil. *Arq Bras Cardiol*. 2010; 94:671-7.
96. Galiè N, Brundage BH, Ghofrani A, et al. Tadalafil therapy for pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2009;119: 2894-903.

97. Moreno-Vinasco L, Gomberg-Maitland M, Maitland ML, et al. Genomic assessment of a multikinase inhibitor orafenib, in a rodent model of pulmonary hypertension. *Physiol Genomics* 2008;33:278-91.
98. Schermuly RT, Dony E, Ghofrani HA, et al. Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition. *J Clin Invest* 2005;115:2811-21.
99. Ghofrani HA, Seeger W, Grimminger F. Imatinib for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 2005;353:1412-3.
100. Ishikura K, Yamada N, Ito M, et al. Beneficial acute effects of rho-kinase inhibitor in patients with pulmonary arterial hypertension. *Circ J*. 2006; 70: 174-8.
101. Grimminger F, Weimann G, Frey R, et al. First acute haemodynamic study of soluble guanylate cyclase stimulator riociguat in pulmonary hypertension. *Eur Respir J*. 2009; 33:785-92.
102. Kawut S, Horn E, Berekashvili K, et al. Selective serotonin reuptake inhibitor use and outcomes in pulmonary arterial hypertension. *Pulm Pharmacol Ther*. 2006; 19: 370-4.
103. Voelkel NF, Quaife RA, Leinwand LA, et al. Right ventricular function and failure: report of a National Heart, Lung, and Blood Institute working group on cellular and molecular mechanisms of right heart failure. *Circulation*. 2006; 114: 1883-91.
104. McMurtry MS, Bonnet S, Wu X, et al. Dichloroacetate prevents and reverses pulmonary hypertension by inducing pulmonary artery smooth muscle cell apoptosis. *Circ Res*. 2004; 95:830-40.



105. Nishimura T, Vaszar LT, Faul JL, et al. Simvastatin rescues rats from fatal pulmonary hypertension by inducing apoptosis of neointimal smooth muscle cells. *Circulation*. 2003;108:1640-5.
106. Girgis RE, Ma SF, Ye S, et al. Differential gene expression in chronic hypoxic pulmonary hypertension: effect of simvastatin treatment. *Chest* 2005;128:579S.
107. Girgis RE, Mozammel S, Champion HC, et al. Regression of chronic hypoxic pulmonary hypertension by simvastatin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007;292:L1105-10.
108. Kao PN. Simvastatin treatment of pulmonary hypertension: an observational case series. *Chest* 2005;127:1446-52.
109. Wilkins MR, Ali O, Bradlow W, et al.. Simvastatin as a treatment for pulmonary hypertension trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 181: 1106–13.
110. Quarck R, Nawrot T, Meyns B, et al. C-reactive protein: a new predictor of adverse outcome in pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2009; 53:1211-8.
111. Kuhn KP, Byrne DW, Arbogast PG, et al. Outcome in 91 consecutive patients with pulmonary arterial hypertension receiving epoprostenol. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167:580-6.
112. Miyamoto S, Nagaya N, Satoh T, et al. Clinical correlates and prognostic significance of six-minute walk test in patients with primary pulmonary hypertension: comparison with cardiopulmonary exercise testing. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:487-92.

113. Sitbon O, Humbert M, Nunes H, et al. Long-term intravenous epoprostenol infusion in primary pulmonary hypertension: prognostic factors and survival. *J Am Coll Cardiol* 2002; 40:780-8.
114. Wensel R, Opitz CF, Anker SD, et al. Assessment of survival in patients with primary pulmonary hypertension. *Circulation* 2002; 106: 319-24.
115. Opitz CF, Wensel R, Winkler J, et al. Clinical efficacy and survival with first-line inhaled iloprost therapy in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Eur Heart J* 2005; 26: 1895-902.
116. Badesch DB, Champion HC, Sanchez MAG, et al. Diagnosis and Assessment of Pulmonary Arterial Hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2009;54:S55–66.
117. Barst RJ, Rubin LJ, Long WA, et al. A comparison of continuous intravenous epoprostenol (prostacyclin) with conventional therapy for primary pulmonary hypertension. The Primary Pulmonary Hypertension Study Group. *N Engl J Med* 1996; 334:296–302.
118. Forfia PR, Fisher MR, Mathai SC, et al. Tricuspid annular displacement predicts survival in pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174:1034–41.
119. Yap LB, Mukerjee D, Timms PM, et al. Natriuretic peptides, respiratory disease, and the right heart. *Chest* 2004; 126: 1330-6.
120. Nagaya N, Nishikimi T, Uematsu M, et al. Plasma brain natriuretic peptide as a prognostic indicator in patients with primary pulmonary hypertension. *Circulation* 2000;102: 865-70.

121. Andreassen AK, Wergeland R, Simonsen S, et al. N-terminal pro-B-type natriuretic peptide as an indicator of disease severity in a heterogeneous group of patients with chronic precapillary pulmonary hypertension. *Am J Cardiol* 2006; 98: 525-9.
122. Torbicki A, Kurzyna M, Kuca P, et al. Detectable serum cardiac troponin T as a marker of poor prognosis among patients with chronic precapillary pulmonary hypertension. *Circulation* 2003; 108: 844-8.
123. Nagaya N, Uematsu M, Satoh T, et al. Serum uric acid levels correlate with the severity and the mortality of primary pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 487-492.
124. Jakob G, Mair J, Vorderwinkler KP, et al. Clinical significance of urinary cyclic guanosine monophosphate in diagnosis of heart failure. *Clin Chem* 1994;40:96–100.
125. Bogdan M, Humbert M, Francoual J, et al. Urinary cGMP concentrations in severe primary pulmonary hypertension. *Thorax* 1998; 53: 1059-62.
126. Montani D, Souza R, Binkert C, et al. Endothelin-1/ endothelin-3 ratio: a potential prognostic factor of pulmonary arterial hypertension. *Chest* 2007; 131: 101-8.
127. Shitrit D, Bendayan D, Bar-Gil-Shitrit A, et al. Significance of a plasma D-dimer test in patients with primary pulmonary hypertension. *Chest* 2002; 122: 1674-8.

128. Shitrit D, Bendayan D, Rudensky B, et al. Elevation of ELISA D-dimer levels in patients with primary pulmonary hypertension. *Respiration* 2002; 69: 327-9.
129. Kawut, SM, Horn, EM, Berekashvili, KK, et al. von Willebrand Factor independently predicts long-term survival in patients with pulmonary arterial hypertension. *Chest* 2005;128;2355-62.
130. Lopes AA, Maeda NY. Circulating von Willebrand factor antigen as a predictor of short-term prognosis in pulmonary hypertension. *Chest* 1998; 114: 1276-82.
131. Lopes AA, Maeda NY, Bydlowski SP. Abnormalities in circulating von Willebrand factor and survival in pulmonary hypertension. *Am J Med.* 1998;105:21-6.
132. Park MH, Scott RL, Uber PA, et al. Usefulness of B-type natriuretic peptide as a predictor of treatment outcome in pulmonary arterial hypertension. *Congest Heart Fail* 2004; 10: 221-5.
133. Ozkan M, Dweik RA, Laskowski D, Arroliga AC, Erzurum SC. High levels of nitric oxide in individuals with pulmonary hypertension receiving epoprostenol therapy. *Lung* 2001; 179: 233-43.
134. Friedman R, Mears JG, 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.

135. Rich S. Primary pulmonary hypertension: executive summary from the World Symposium on Primary Pulmonary Hypertension. Evian, France: World Health Organization, 1998.
136. ATS Committee on Proficiency Standards for Clinical Pulmonary Function Laboratories. ATS statement: guidelines for the six-minute walk test. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 111-7.
137. Hamilton AL, Killian KJ, Summers E et al. Symptom intensity and subjective limitation to exercise in patients with cardiorespiratory disorders. *Chest* 1996; 110: 1255-63.
138. 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.
139. Hiremath J, Thanikachalam S, Parikh K, et al. Exercise improvement and plasma biomarker changes with intravenous treprostinil therapy for pulmonary arterial hypertension: a placebo-controlled trial. *J Heart Lung Transplant*. 2010;29:137-49.
140. Kao PN. Simvastatin treatment of pulmonary hypertension: an observational case series. *Chest* 2005;127:1446-52.
141. Shyamsundar M, McKeown ST, O'Kane CM, et al. Simvastatin decreases lipopolysaccharide-induced pulmonary inflammation in healthy volunteers. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;179:1107-14.

142. Wilkins MR, Ali O, Bradlow W, Wharton J, et al. Simvastatin as a treatment for pulmonary hypertension trial. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;181:1106-13.
143. Kobayashi J, Wigle D, Childs T, et al. Serum-induced vascular smooth muscle cell elastolytic activity through tyrosine kinase intracellular signalling. *J Cell Physiol* 1994; 160:121-31.
144. Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, et al. Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1993; 328:1732-9.
145. Miyauchi T, Yorikane R, Sakai S, et al. Contribution of endogenous endothelin-1 to the progression of cardiopulmonary alterations in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circ Res* 1993; 73:887-97.
146. Bauer M, Wilkens H, Langer F, et al. Selective upregulation of endothelin B receptor gene expression in severe pulmonary hypertension. *Circulation*. 2002;105:1034-6.
147. Huber K, Beckmann R, Frank H, et al. Fibrinogen, t-PA, and PAI-1 plasma levels in patients with pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;150:929.
148. Yan S-F, Zou Y-S, Gao Y et al. Tissue factor transcription driven by Egr-1 in a critical mechanism of murine pulmonary fibrin deposition in hypoxia. *Proc Natl Acad Sci*. 1998 95:8298-303.

149. Collados MT, Velázquez B, Borbolla JR, et al. Endothelin-1 and functional tissue factor: a possible relationship with severity in primary pulmonary hypertension *Heart Vessels*. 2003, 18:12-7.
150. Tuder RM, Groves B, Badesch DB, Voelkel NF. Exuberant endothelial cell growth and elements of inflammation are present in plexiform lesions of pulmonary hypertension. *Am J Pathol*. 1994; 144: 275-85.
151. Humbert M, Monti G, Brenot F, Emilie D, et al. Serum IL-1, IL-6 and TNF- $\alpha$  in primary pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149: A747.
152. Cella G, Bellotto F, Tona F, et al. Plasma markers of endothelial dysfunction in pulmonary hypertension. *Chest*. 2001;120:1226-30.
153. Sungprem K, Khongphatthanayothin A, Kiattisanpipop P, Chotivitayatarakorn P, Poovorawan Y, Lertsapcharoen P. Serum level of soluble intercellular adhesion molecule-1 correlates with pulmonary arterial pressure in children with congenital heart disease. *Pediatr Cardiol*. 2009; 30:472-6.
154. Smadja DM, Mauge L, Sanchez O, et al. Distinct patterns of circulating endothelial cells in pulmonary hypertension. *Eur Respir J*. 2010 Apr 22.
155. Tuder RM, Voelkel NF. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induction in primary pulmonary hypertension. *J Cell Biochem* 1994; 18A: 330.
156. Humbert M, Monti G, Fartoukh M, et al. Platelet-derived growth factor expression in primary pulmonary hypertension: comparison of HIV

- seropositive and HIV seronegative patients. *Eur Respir J* 1998; 11: 554-9.
157. Merklinger SL, Jones PL, Martinez EC, Rabinovitch M. Epidermal growth factor receptor blockade mediates smooth muscle cell apoptosis and improves survival in rats with pulmonary hypertension. *Circulation*. 2005;112:423-31.
158. Arcot SS, Fagerland JA, Lipke DW et al. Basic fibroblast growth factor alterations during development of monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Growth Factors* 1995; 12:121-30.
159. Welsh CH, Hassel KL, Badesh DB et al. Coagulation and fibrinolytic profiles in patients with severe pulmonary hypertension. *Chest* 1996; 110:710-7.
160. Caramuru LH, Lopes AA, Maeda NY, Aiello VD, Filho CC. Long-term behavior of endothelial and coagulation markers in Eisenmenger syndrome. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2006;12:175-83.
161. Veyradier A, Nishikubo T, Humbert M, et al. Improvement of von Willebrand factor proteolysis after prostacyclin infusion in severe pulmonary arterial hypertension. *Circulation*. 2000;102:2460-2.
162. Langleben D, Barst RJ, Badesch D, et al. Continuous infusion of epoprostenol improves the net balance between pulmonary endothelin-1 clearance and release in primary pulmonary hypertension. *Circulation*. 1999;99:3266-71.
163. Eddahibi S, Humbert M, Sediame S, et al. Imbalance between platelet vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor in



- pulmonary hypertension: effect of prostacyclin therapy. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;162:1493-9.
164. Sakamaki F, Kyotani S, Nagaya N, et al. Increased plasma P-selectin and decreased thrombomodulin in pulmonary arterial hypertension were improved by continuous prostacyclin therapy. *Circulation.* 2000;102: 2720-5.
165. Daley E, Emson C, Guignabert C, et al. Pulmonary arterial remodeling induced by a Th2 immune response. *J Exp Med.* 2008;205:361-72.
166. Ichikawa H, Flores S, Kvietys PR, et al. Molecular mechanisms of anoxia/reoxygenation-induced neutrophil adherence to cultured endothelial cells. *Circ Res.* 1997;81:922-31.
167. Shreeniwas R, Koga S, Karakurum M, et al. 1992. Hypoxia mediated induction of endothelial cell interleukin-1 alpha: an autocrine mechanism promoting expression of leukocyte adhesion molecules on the vessel surface. *J. Clin. Invest.* 90:2333-9.
168. Karakurum M, Shreeniwas R, Chen J, et al. Hypoxic induction of interleukin-8 gene expression in human endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 1994;93:1564-70.
169. Damert A, Ikeda E, Risau W. Activator-protein-1 binding potentiates the hypoxia -inducible-factor-1-mediated hypoxia- induced transcriptional activation of vascular endothelial growth factor expression in C6 glioma cells. *Biochem J.* 1997; 327: 419-23.

170. Milhoan KA, Lane TA, Bloor CM. Hypoxia induces endothelial cells to increase their adherence for neutrophils: role of PAF. *Am. J. Physiol.* 1992;263:H956–H962.
171. O'Rourke JF, Pugh CW, Bartlett SM, Ratcliffe PJ. Identification of hypoxically inducible mRNAs in HeLa cells using differential-display PCR. Role of hypoxia-inducible factor-1. *Eur J Biochem.* 1996;241:403-10.
172. Ogawa S, Clauss M, Kuwabara K, et al. Hypoxia induces endothelial cell synthesis of membrane-associated proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991; 88:9897-901.
173. Ogawa S, Gerlach H, Esposito C, Pasagian-Macaulay A, Brett J, Stern D. Hypoxia modulates the barrier and coagulant function of cultured bovine endothelium. Increased monolayer permeability and induction of procoagulant properties. *J Clin Invest.* 1990;85:1090-8.
174. Lowenstein CJ, Morrell CN , Yamakuchi M. Regulation of Weibel–Palade Body Exocytosis. *Trends CardiovascMed.* 2005;15:302-8.
175. Raoul W, Wagner-Ballon O, Saber G, et al. Effects of bone marrow-derived cells on monocrotaline- and hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice. *Respir Res.* 2007;30:8.
176. Zhao YD, Courtman DW, Deng Y, Kugathasan L, Zhang Q, Stewart DJ. Rescue of monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension using bone marrow-derived endothelial-like progenitor cells: efficacy of combined cell and eNOS gene therapy in established disease. *Circ Res* 2005;96:442–50.

177. Sawamura F, Kato M, Fujita K, Nakazawa T, Beardsworth A. Tadalafil, a long-acting inhibitor of PDE5, improves pulmonary hemodynamics and survival rate of monocrotaline-induced pulmonary artery hypertension in rats. *J Pharmacol Sci.* 2009;111:235-43.
178. Damås JK, Otterdal K, Yndestad A, et al. Soluble CD40 ligand in pulmonary arterial hypertension: possible pathogenic role of the interaction between platelets and endothelial cells. *Circulation.* 2004;110:999-1005.
179. Cella G, Vianello F, Cozzi F, et al. Effect of bosentan on plasma markers of endothelial cell activity in patients with secondary pulmonary hypertension related to connective tissue diseases. *J Rheumatol.* 2009;36:760-7.
180. Tay EL, Papaphylactou M, Diller GP, et al. Quality of life and functional capacity can be improved in patients with Eisenmenger syndrome with oral sildenafil therapy. *Int J Cardiol.* 2010 Mar 19.
181. Dimopoulos K, Inuzuka R, Goletto S, et al. Improved survival among patients with Eisenmenger syndrome receiving advanced therapy for pulmonary arterial hypertension. *Circulation.* 2010;121:20-5.
182. Zavoico GB, Ewenstein BM, Schafer AI, Pober JS. IL-1 and related cytokines enhance thrombin-stimulated PGI<sub>2</sub> production in cultured endothelial cells without affecting thrombin-stimulated von Willebrand factor secretion or platelet-activating factor biosynthesis. *J Immunol.* 1989;142:3993-9.

183. Ribes JA, Francis CW, Wagner DD. Fibrin induces release of von Willebrand factor from endothelial cells. *J Clin Invest.* 1987;79:117-23.
184. Paleolog EM, Crossman DC, McVey JH, Pearson JD. Differential regulation by cytokines of constitutive and stimulated secretion of von Willebrand factor from endothelial cells. *Blood.* 1990;75:688-95.
185. Schouten M, Wiersinga WJ, Levi M, van der Poll T. Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis. *J Leukoc Biol.* 2008;83:536-45.
186. Chaouat A, Weitzenblum E, Higenbottam T. The role of thrombosis in severe pulmonary hypertension. *Eur Respir J.* 1996;9:356-63.
187. 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.

**Apêndice**

---

Anexo D

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

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

(Instruções para preenchimento no verso)

**I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL**

1. NOME DO PACIENTE : .....
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : .M F
- DATA NASCIMENTO: ...../...../.....
- ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....
- BAIRRO: ..... CIDADE .....
- CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....
2. RESPONSÁVEL LEGAL .....
- NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE : ..... SEXO: M F
- DATA NASCIMENTO: ...../...../.....
- ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....
- BAIRRO: ..... CIDADE: .....
- CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....).....

**II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA**

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Estudo dos efeitos do uso crônico de estatina sobre marcadores de disfunção endotelial e de inflamação em portadores de hipertensão arterial pulmonar

PESQUISADOR: Prof. Dr. Antonio Augusto Barbosa Lopes

CARGO/FUNÇÃO: Diretor de Unidade .. INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº CRM 34.143.

UNIDADE DO HCFMUSP: Unidade Clínica de Cardiologia Pediátrica e Cardiopatias Congênicas do Adulto

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO                      RISCO MÍNIMO **X**                      RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO                      RISCO MAIOR

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 24 meses

### **III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:**

1. justificativa e os objetivos da pesquisa ; 2. procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais; 3. desconfortos e riscos esperados; 4. benefícios que poderão ser obtidos; 5. procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo.
  1. A pesquisa que estamos realizando e convidando você a participar, tem como objetivo o tratamento da hipertensão pulmonar. Nesta doença os vasos sanguíneos dentro dos seus pulmões podem sofrer estreitamentos e até oclusão. O medicamento que está sendo testado não é novo, encontra-se amplamente disponível nas farmácias e é bastante utilizado em pacientes com aterosclerose. Esse medicamento tem por finalidade “proteger” a parte interna dos seus vasos sanguíneos, tentando prevenir a obstrução dos mesmos.
  2. Para avaliar se o medicamento está sendo benéfico para você, nós realizaremos exames simples, como o teste de seis minutos de caminhada em um corredor, e exames de sangue.
  3. Os eventuais sintomas que você vier a apresentar como dores musculares e eventuais alterações nos exames de sangue, serão monitorizados por nós a cada 30 dias ou em intervalos menores se necessário. É importante lembrar que para qualquer dúvida ou necessidade de atendimento fora dos dias de consulta, sempre haverá uma equipe de plantão em nossa Unidade orientada e capacitada para lhe dar assistência durante as 24 horas, todos os dias.
  4. O efeito de que está sendo esperado deste tratamento poderá não ser percebido por você em curto prazo. Este efeito talvez seja detectado apenas nos exames de sangue. Entretanto, a melhora dos resultados nesses exames, indicará que um efeito benéfico, protetor, poderá ser esperado em sua evolução a longo prazo. Neste caso, o tratamento será continuado, mesmo após o término da pesquisa.
  5. É importante esclarecer a você que nos primeiros seis meses, você poderá estar recebendo o remédio mesmo, ou um comprimido chamado placebo (é um comprimido que não contém medicamento). Somente ao final de seis meses, os pacientes que tomaram o remédio verdadeiro e os pacientes que tomaram o placebo serão comparados e informados se houve efeito da medicação. Se o efeito for benéfico, a partir de seis meses, todos os pacientes passarão a receber o medicamento verdadeiro. Mesmo aqueles que nos primeiros seis meses tomaram o placebo.
  6. Caso você não queira participar desta pesquisa, você continuará dentro do seu esquema de tratamento habitual, fazendo uso dos medicamentos com os quais você já está acostumado (por exemplo anticoagulantes).
-

#### **IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:**

1. acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.
  2. liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.
  3. salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.
  4. disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.
  5. viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.
- 

#### **V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.**

Alessandra Costa Barreto, Sônia MeiKen Franchi , Antônio Augusto B. Lopes

Telefones: 2ª a 6ª feira, 3069-5409, falar com Sra. Rute

Fora de horário comercial: PS – InCor / emergência , 3069-5273 (falar com plantonista da Cardiopediatria).

#### **VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:**

---

#### **VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO**

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo,                                  de                                  de 20                                  .

---

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

---

assinatura do pesquisador  
(carimbo ou nome Legível)



## PRODUÇÃO CIENTÍFICA DECORRENTE DO TRABALHO

**Barreto AC**, Lopes AA, Maeda NY, Cícero C, Soares RPS, Bydlowski SP.

**P3868 : Low-dose rosuvastatin for pulmonary arterial hypertension. A randomized, placebo-controlled study.** European Heart Journal (2007) 28 (Abstract Supplement), 632-633.

Maeda NY, Lopes AA, **Barreto AC**, Soares RPS. **Abstract 2102: Increased Th2 Cytokine Response In Pulmonary Arterial Hypertension Associated With Congenital Heart Disease.** Circulation. 2007;116:II\_456.

Maeda NY, **Barreto AC**, Bydlowski SP, Lopes AA. **P4478 : Plasma von Willebrand factor antigen as an independent risk factor for death in pulmonary arterial hypertension associated with congenital heart disease.** European Heart Journal (2010) 31 (Abstract Supplement), 755.

**Barreto AC**, Maeda NY, Soares RPS, Cícero C, Lopes AA. **Rosuvastatin and vascular dysfunction markers in pulmonary arterial hypertension: a placebo-controlled study.** Braz J Med Biol Res 2008; 41:657-663.

Prêmio “Professor Luiz Vênere Decourt” – Melhor Pesquisa Aplicada.  
**Barreto AC**, Cícero C, Maeda NY, Lopes AA. **Uso de Rosuvastatina em pacientes com hipertensão arterial pulmonar: estudo randomizado, controlado por placebo.** XXIX Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo 2008.

**XXIX CONGRESSO DA SOCIEDADE DE  
CARDIOLOGIA DO ESTADO DE SÃO PAULO**

01, 02 e 03 de Maio de 2008 - São Paulo/SP

CONFERIDO A:

ALESSANDRA COSTA BARRETO; CRISTINA CÍCERO; NAIR Y. MAEDA; ANTÔNIO AUGUSTO B. LOPES;

NA QUALIDADE DE AUTORES (AS) DO TRABALHO:

**USO DE ROSUVASTATINA EM PACIENTES COM HIPERTENSÃO ARTERIAL  
PULMONAR: ESTUDO RANDOMIZADO, CONTROLADO POR PLACEBO**

GANHADOR DO PRÊMIO MELHOR PESQUISA APLICADA LUIZ VENERÉ DECOURT

São Paulo, 03 de Maio de 2008.

*[Signature]*  
DR. MÓACIR FERNANDES CODOY  
Presidente do XXIX Congresso da SOCESP

*[Signature]*  
DR. ARI TIMÉRMAN  
Presidente da SOCESP

*[Signature]*  
DR. VALTER CORREIA DE LIMA  
Coordenador Científico do  
XXIX Congresso da SOCESP

XXIX  
CONGRESSO  
DA SOCIEDADE  
DE CARDIOLOGIA  
DO ESTADO DE  
SÃO PAULO

SOCESP

BiOLAB  
CÁRDIO

© CMA / Protocolo 10397 / Cardiologia - 15 pontos / Cardiologia Ped.áfrica - 5 pontos / Ergometria - 10 pontos / Hemodinâmica e cardiologia intervencionista - 10 pontos / Ecocardiografia - 10 pontos. [www.cma-cap.org.br](http://www.cma-cap.org.br)

# Rosuvastatin and vascular dysfunction markers in pulmonary arterial hypertension: a placebo-controlled study

A.C. Barreto<sup>1</sup>, N.Y. Maeda<sup>2</sup>, R.P.S. Soares<sup>2</sup>, C. Cícero<sup>1</sup> and A.A. Lopes<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Cardiologia Pediátrica e Cardiopatias Congênitas do Adulto, Instituto do Coração,  
<sup>2</sup>LIM-31, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

Correspondence to: A.A. Lopes, Departamento de Cardiologia Pediátrica e Cardiopatias Congênitas do Adulto, InCor, HC, FMUSP, Av. Dr. Eneas de Carvalho Aguiar, 44, 05403-000 São Paulo, SP, Brasil  
Fax: +55-11-3069-5409. E-mail: aablopes@usp.br

We investigated whether chronic rosuvastatin administration could improve the abnormalities of the circulating levels of vascular dysfunction markers in pulmonary arterial hypertension (PAH). Sixty patients, aged 13 to 60 years, with idiopathic (N = 14) or congenital heart disease-associated PAH (N = 46) were equally but randomly assigned to rosuvastatin treatment (10 mg a day, orally) or placebo for 6 months in a blind fashion. Plasma levels of P-selectin, tissue-plasminogen activator and its inhibitor as well as von Willebrand factor antigen were measured by enzyme-linked immunoassay before and after 1, 3, and 6 months of treatment. Baseline levels of biomarkers were elevated (68, 16, 45 and 46% increase relative to controls, for P-selectin, von Willebrand factor antigen, tissue-plasminogen activator and its inhibitor, respectively;  $P < 0.001$ ). P-selectin values at baseline, 1, 3, and 6 months were  $39.9 \pm 18.5$ ,  $37.6 \pm 14.6$ ,  $34.8 \pm 14.6$ , and  $35.4 \pm 13.9$  ng/mL, respectively, for the rosuvastatin group and  $45.7 \pm 26.8$ ,  $48.0 \pm 26.9$ ,  $48.1 \pm 25.7$ , and  $45.7 \pm 25.6$  ng/mL for the placebo group. The P-selectin level was lower in the rosuvastatin group compared with placebo throughout treatment ( $P = 0.037$ , general linear model). A trend was observed towards a decrease in tissue-plasminogen activator in the statin group (16% reduction,  $P = 0.094$ ), with no significant changes in the other markers. Since P-selectin is crucial in inflammation and thrombosis, its reduction by rosuvastatin is potentially relevant in the pathophysiological scenario of PAH.

Key words: Pulmonary hypertension; Statins; Endothelial dysfunction; P-selectin; Tissue-plasminogen activator and inhibitor; von Willebrand factor

Research supported by FAPESP (#05/50320-5).

Received January 22, 2008. Accepted August 14, 2008

## Introduction

The treatment of pulmonary arterial hypertension (PAH) has changed in the last decades with the development of new drugs, including prostanoids, endothelin antagonists and phosphodiesterase inhibitors (1-7). Most clinical studies have demonstrated beneficial effects of these drugs on physical capacity, quality of life, hemodynamics, and survival. In the clinical setting, these agents were initially proposed as vasodilators, but experimental data suggest that they may also act on vessel walls. However, the effects of drugs on circulating levels of vascular dysfunction

markers and other biomarkers have been explored to a lesser extent, mostly for prostacyclin administration (8-11).

Vascular dysfunction (involving endothelial cells, platelets and leukocytes) is an important event in PAH (12). Altered circulating levels of endothelial markers have been observed in association with increased risk of thrombosis and decreased survival (13-15). Therefore, the improvement of vascular dysfunction with drug therapy might have an impact on the risk of thrombotic complications and mortality in these patients. Statins are among the drugs that have been proposed in this context. They are capable

of reversing experimental pulmonary hypertension, an effect that may be related to over-expression or protection of endothelial nitric oxide synthase (16,17) and/or changes in the expression of several other genes associated with inflammatory, proliferative and apoptotic mechanisms (18), including the bone morphogenetic protein type II receptor gene in human lung microvascular endothelial cells (19).

The present study was planned to investigate the effects of chronic statin administration versus placebo on the circulating levels of vascular dysfunction markers in patients with either idiopathic PAH or that associated with congenital heart disease. We also measured the 6-min walked distance and resting as well as postexercise peripheral oxygen saturation as exploratory clinical variables. Since a direct vasodilator effect of the drug was not expected, all patients with class III symptoms were assigned to vasodilator therapy before they entered the study.

## Material and Methods

### Study population

Adolescents and adults with PAH, either idiopathic or associated with congenital heart disease, in the absence or presence of hypoxemia (resting SpO<sub>2</sub> of  $\geq 90$  or  $< 90\%$ , respectively) were enrolled. They were receiving medical care at the Heart Institute, São Paulo, Brazil, as outpatients with stable clinical conditions (functional class II or III, New York Heart Association). A mean pulmonary arterial pressure of  $> 30$  mmHg at rest was necessary for inclusion. Patients with an angio CT showing extensive thrombotic lesions in the pulmonary arteries were excluded. All patients with class III symptoms were started on vasodilator therapy (oral sildenafil, 20-40 mg, three times a day) 1-2 months before entering the study. For patients with stable class II symptoms, vasodilator therapy was considered after completion of the present study. The majority of patients were on chronic anticoagulant therapy with warfarin, and some were using diuretics and/or digoxin. We planned not to change baseline treatment during the study period, unless clearly necessary in case of clinical deterioration. All subjects with congenital heart disease had increased pulmonary vascular resistance and were considered to be unsuitable for surgical correction. Those with abnormal peripheral oxygen saturation were continuously monitored in terms of hydration, hematocrit level, iron stores, hyperviscosity symptoms, thrombotic or bleeding episodes and need for hemodilution. The study protocol was approved by the Scientific Committee of the Heart Institute, and the Ethics Committee of the Hospital of Clinics, School of Medicine, University of São Paulo. Written informed consent was obtained from all patients (or

their parents in case of adolescents) before inclusion in the study.

### Randomization and study design

Despite the controversy about having variables under control prior to randomization, for this specific study we opted to ensure absolute group homogeneity regarding four clinical variables. Thus, having met the inclusion criteria, patients were consecutively organized into pairs according to age (difference  $< 10$  years), diagnosis (idiopathic or congenital heart disease-associated PAH), resting peripheral oxygen saturation ( $< 80$ ,  $80-89$ ,  $\geq 90\%$ ) and use of vasodilator drugs. In each pair, 1 patient was randomly assigned to placebo and the other to rosuvastatin treatment, 10 mg/day, single oral dose (nested case-control randomized study). Randomization was carried out using a pre-established computer-based sequence. The operator was completely separated from patient care. Patients were maintained on treatment in a double-blind fashion for 6 months, and the treatment code was opened when the last patient completed the follow-up period.

### Clinical and laboratory measurements

Demographic data were collected before treatment was begun. The functional class, 6-min walked distance and resting as well as postexercise (6-min walk) peripheral oxygen saturation were recorded before and during treatment (1, 3, and 6 months). For safety purposes, the circulating levels of creatinine phosphokinase and hepatic enzymes (alanine, aspartate aminotransferases and  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase) were determined at the same times.

Plasma levels of vascular dysfunction markers were measured before treatment and 1, 3, and 6 months after treatment using commercially available high-sensitivity enzyme-linked immunosorbent assay kits purchased from Diagnostica Stago, France, for tissue-plasminogen activator (t-PA), plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), and von Willebrand factor antigen (vWF:Ag) or from R&D Systems Inc., USA, for P-selectin. Determinations were carried out in duplicate. Intra-assay variation and differences between duplicates were always less than 5%. A control plasma from our laboratory was run in parallel in all assays. Corrections between assays (between kits) were never necessary. Final results were obtained after normalization for the hematocrit level.

A control group was selected, with the same age range as the patients. The group consisted of 30 healthy volunteers, mostly blood donors. For inclusion, a brief questionnaire was applied in order to exclude acute or chronic illness, in particular diabetes, hypertension and other cardiovascular disorders. Only non-smokers were enrolled. A

negative history for thrombophilia and/or deep vein thrombosis was an inclusion requirement.

### Statistical analysis

Variables were tested for closeness to the normal distribution, and results are reported as means and standard deviation (or standard error of the mean if specifically indicated) or if not a normal distribution as median and range. Baseline data were analyzed using the Student *t*-test. The overall treatment effects on the biomarkers were analyzed using a general linear model with two factors (type of treatment and time), and repeated measures for one of them (time). Thus, the study was primarily designed to analyze the effect of the drug compared with placebo during the entire 6-month period, not just at 6 months. PAI-1 values were analyzed after logarithmic transformation. In all tests, 0.05 was considered to be the level of significance. Statistical analysis was carried out using the SPSS statistical software, version 14.0 (SPSS Inc., USA).

### Results

Sixty patients (36 females) were enrolled (N = 30 each for placebo and statin groups), with age ranging from 13 to 60 years (median 33 years) and mean pulmonary arterial pressure of  $53 \pm 16$  mmHg. These patients were in functional class II (N = 50) or III (N = 10), and the disease was either idiopathic (N = 14) or associated with congenital heart defects in the absence (N = 18) or presence (N = 28) of hypoxemia. All subjects in functional class III had idiopathic pulmonary arterial hypertension and were on vasodilator therapy.

When all of the 60 class II or III patients on placebo or drug were analyzed before treatment, the circulating levels of the four biomarkers were higher ( $P < 0.001$ ) when compared with healthy controls (Table 1). Before treatment, placebo and statin groups were similar in terms of age, 6-min walked distance, peripheral oxygen saturation, and plasma levels of all four biomarkers (Table 2).

The effects of rosuvastatin treatment on the biomarkers are shown in Figures 1 and 2. The P-selectin level was significantly lower in the statin (filled circles) compared with placebo (open circles) at all times during treatment ( $P = 0.037$ ). The placebo group P-selectin levels at 1, 3, and 6 months were  $48.0 \pm 26.9$ ,  $48.1 \pm 25.7$ , and  $45.7 \pm 25.6$  ng/mL, respectively, and for the statin group, they were  $37.6 \pm 14.6$ ,  $34.8 \pm 14.6$ , and  $35.4 \pm 13.9$  ng/mL compared to healthy controls,  $25.5 \pm 10.3$  ng/mL and normal value reported by the kit manufacturer,  $29.0 \pm 11.0$  ng/mL. No significant effects of rosuvastatin were observed for PAI-1 or von Willebrand factor, except for a trend towards a

decrease in t-PA levels ( $P = 0.094$ ; Figure 1). There were no statistical differences between patient subgroups (idiopathic versus congenital heart disease-associated PAH and hypoxemic versus non-hypoxemic subjects).

In both placebo and rosuvastatin groups, no increase in the 6-min walked distance was observed from baseline to 6 months. In the specific diagnostic subgroup of hypoxemic patients with congenital heart disease (N = 28), 8 of 14 patients on placebo, but only 1 of 14 patients on rosuvastatin had a decrease in postexertional peripheral oxygen saturation at 6 months compared with pretreatment data ( $P = 0.013$ , Fisher exact test; Figure 3).

All patients completed the study, and the following events were observed: clinical deterioration requiring combined vasodilator therapy (1 patient, placebo group); he-

**Table 1.** Plasma levels of biomarkers in patients (N = 60) and controls (N = 30) before treatment.

	Controls	Patients
P-selectin (ng/mL)	25.5 ± 10.3	42.8 ± 23.0*
t-PA (ng/mL)	5.91 ± 1.71	8.57 ± 3.95*
vWF:Ag (U/dL)	105 ± 25	122 ± 23*
PAI-1 (ng/mL)	16.5 (5.2-42.9)	24.1 (9.7-134.7)*

Data are reported as mean ± SD, except for PAI-1 (median and range). t-PA = tissue-type plasminogen activator; vWF:Ag = von Willebrand factor antigen; PAI-1 = plasminogen activator inhibitor-1.

\* $P < 0.001$  (Student *t*-test).

**Table 2.** Placebo and rosuvastatin groups (N = 30 each) before treatment.

	Placebo	Rosuvastatin
Age (years)	33.7 ± 11.1	34.6 ± 12.3
6MWD (m)	415 ± 110	416 ± 103
Rest SpO <sub>2</sub> (%)	91 ± 4%	90 ± 6%
6MW SpO <sub>2</sub> (%)	78 ± 12%	74 ± 17%
P-selectin (ng/mL)	45.7 ± 26.8	39.9 ± 18.5
t-PA (ng/mL)	9.00 ± 4.04	8.14 ± 3.38
vWF:Ag (U/dL)	122 ± 24	122 ± 22
PAI-1 (ng/mL)	23.9 (9.7-134.7)	24.5 (9.8-103.3)

Data are reported as mean ± SD, except for PAI-1 (median and range). 6MWD = 6-min walked distance; SpO<sub>2</sub> = peripheral oxygen saturation; 6MW SpO<sub>2</sub> = postexertional (6-min walk) peripheral oxygen saturation; t-PA = tissue-type plasminogen activator; vWF:Ag = von Willebrand factor antigen; PAI-1 = plasminogen activator inhibitor-1. There were no statistically significant differences between groups for any of the parameters (Student *t*-test).

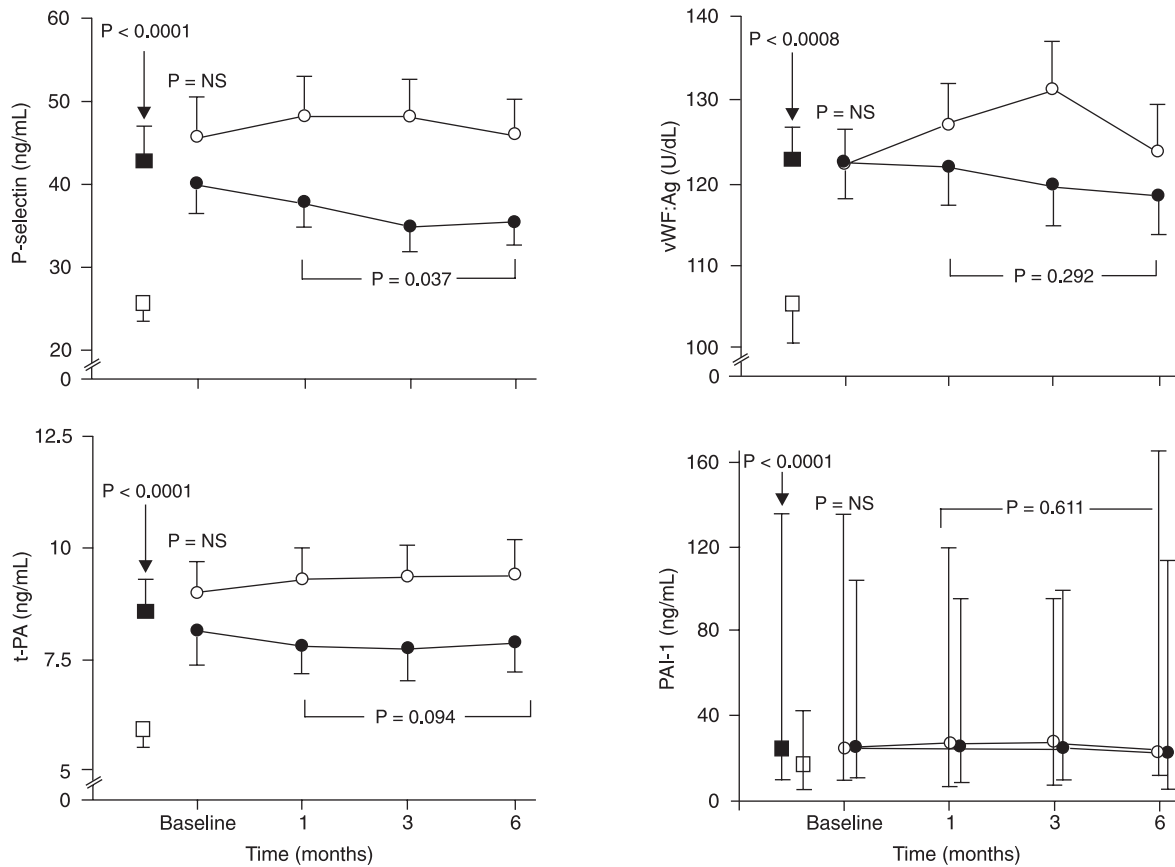
moptysis (1 patient, statin group); syncope at 6 months during the walk test (1 patient, placebo group); insomnia (3 patients, statin group); skeletal muscle pain (2 patients, 1 from statin group, with transient creatinine phosphokinase elevation above three times normal level);  $\gamma$ -glutamyl-transpeptidase elevation above three times normal (1 patient, placebo group).

## Discussion

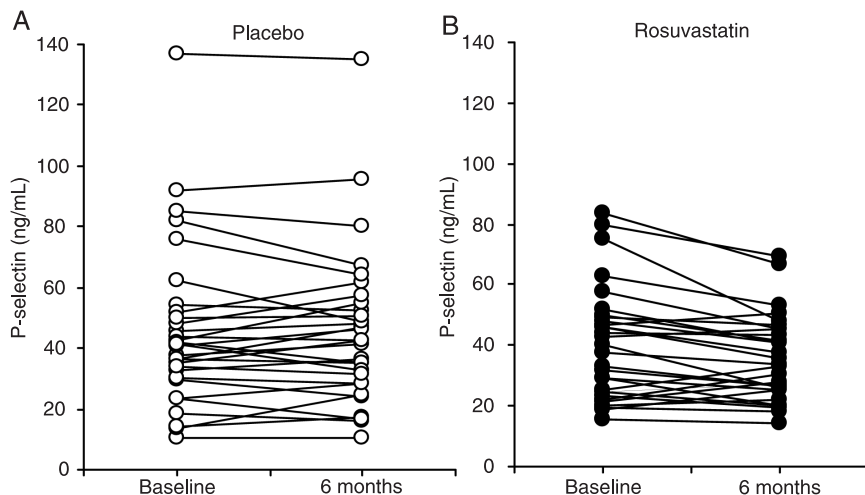
In this placebo-controlled study, chronic oral administration of rosuvastatin to PAH patients resulted in a statistically significant decrease in the circulating level of P-selectin for an average of 10% and a trend towards a

decrease in t-PA level in patients with PAH ( $P = 0.094$ , general linear model). The plasma levels of the other markers of vascular dysfunction, vWF:Ag, tissue-plasminogen activator, and its inhibitor did not change with statin treatment but were significantly higher than in healthy subjects.

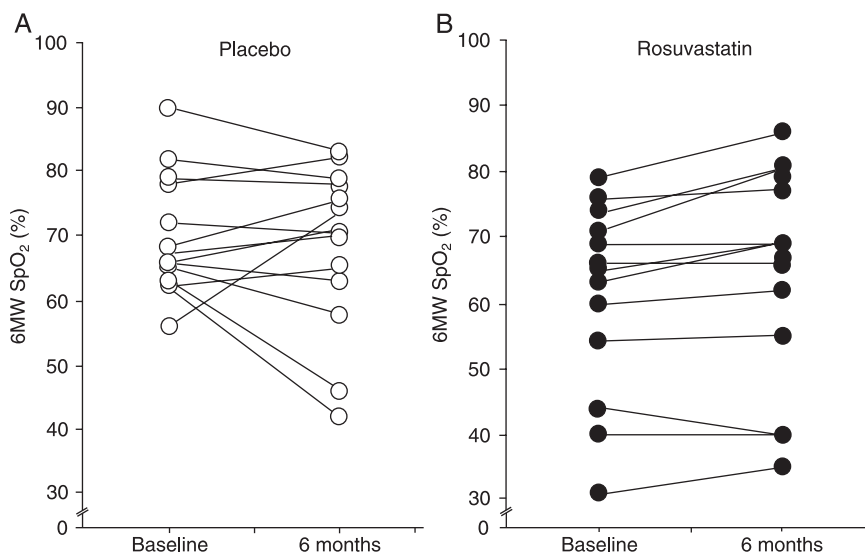
Only 1 patient presented transient elevation of plasma creatinine phosphokinase level associated with skeletal muscle pain attributable to rosuvastatin treatment. While analyzing the options in terms of selecting the statin that could be used in the present study, rosuvastatin was chosen because it is a third-generation hydrophilic statin, relatively well tolerated at daily doses of 10 to 40 mg, and metabolized via cytochrome p450 (CYP) 2C9 and does not



**Figure 1.** Treatment-related behavior of endothelial markers in patients with pulmonary arterial hypertension. Before treatment with rosuvastatin (10 mg/day), plasma levels of all four biomarkers were significantly higher ( $P$  values in the upper left side of the panels, Student  $t$ -test) in patients (closed square) compared with controls (open square). Rosuvastatin ( $N = 30$ , closed circles) induced a significant decrease in the circulating level of P-selectin compared with placebo ( $N = 30$ , open circles), with no significant effect on the other markers.  $P$  values in the right side of the panels correspond to the analysis of the entire period of treatment (general linear model for two factors). Results are reported as mean  $\pm$  SEM for P-selectin, tissue-plasminogen activator (t-PA), and von Willebrand factor antigen (vWF:Ag), and as median value and range for plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1).



**Figure 2.** Plasma P-selectin levels in patients with pulmonary arterial hypertension. The results observed at baseline and 6 months of treatment with placebo (A, N = 30, open circles) or rosuvastatin (B, N = 30, closed circles) are shown ( $P = 0.0041$  and  $P = 0.9744$  for rosuvastatin and placebo groups, respectively, Student *t*-test).



**Figure 3.** Postexercise (6-min walk) peripheral oxygen saturation (6MW SpO<sub>2</sub>) in individual patients with pulmonary hypertension associated with congenital heart disease and hypoxemia at rest. The results obtained at baseline and 6 months of treatment with placebo (A, N = 14, open circles) or rosuvastatin (B, N = 14, closed circles) are shown. Deterioration occurred to a lesser extent in the rosuvastatin group compared with patients on placebo. The mean  $\pm$  SD values of 6MW SpO<sub>2</sub> at baseline and 6 months, respectively, were  $70 \pm 9$  and  $68 \pm 13\%$  for the placebo group ( $P = 0.6106$ , Student *t*-test), and  $61 \pm 14$  and  $64 \pm 16\%$  for the statin group ( $P = 0.0129$ , Student *t*-test).

interact with many drugs that use the CYP 3A4 pathway (20-22).

Beneficial effects of statins have been reported in experimental pulmonary hypertension, particularly in hypoxic conditions (23-25). These effects may be related, in part, to protection of endothelial cell nitric oxide synthase (26), but changes in the expression of several genes associated with inflammation, cell proliferation and apoptosis have been reported (18,19).

Two of the four biomarkers investigated in this study are adhesion molecules (P-selectin and von Willebrand factor), while the others (t-PA and PAI-1) are a serine-

protease and its inhibitor primarily involved in the fibrinolytic process. Although plasma levels of all four markers were elevated at baseline, only P-selectin was significantly reduced by rosuvastatin treatment compared with placebo. The graphs shown in Figure 1 demonstrate differences in the distributions of the plasma markers, with a great variability of PAI-1 values, followed by vWF:Ag, and less variable values of P-selectin and t-PA.

P-selectin and von Willebrand factor originate from both platelets and endothelial cells. Endothelial P-selectin and von Willebrand factor are stored within the Weibel-Palade bodies and released by a number of stimuli includ-

ing hypoxia (27). Released molecules may circulate or become attached to the plasma membrane. While von Willebrand factor is involved in platelet adhesion and aggregation, P-selectin plays a pivotal role in leukocyte movement slowing down (particularly polymorphonuclear cell rolling) at the endothelial surface. Indeed, exocytosis of endothelial cell Weibel-Palade bodies has been shown to cause rapid neutrophil recruitment, an event that is inhibited in the presence of a blocking antibody to P-selectin (28). Also, interactions between these adhesion molecules are expected to occur *in vivo*, as P-selectin appears to anchor von Willebrand factor multimers to the endothelial cell membrane (29). Thus, if we assume that circulating (soluble) P-selectin reflects the amount of membrane-bound molecules attributable to endothelial dysfunction and/or platelet activation (10,30), lowered plasma level as a result of rosuvastatin treatment might be associated with diminished interactions of leukocytes and platelets with the endothelium, an important therapeutic goal to be achieved in this disease.

In view of the lipid lowering action of rosuvastatin and the known proinflammatory properties of LDL cholesterol, one could argue that the observed statin effect on P-selectin could be indirect, via LDL cholesterol reduction. This is an obvious limitation of the study, since we did not address this point specifically. However, lipid lowering, if this was the case, would not be a definite proof in favor of an indirect effect of rosuvastatin.

In this study, rosuvastatin treatment appeared to be associated with some protection against deterioration in postexertional peripheral oxygen saturation in hypoxemic patients. Also, when all patients were analyzed as a whole, there was a mild improvement of 15 m over placebo in terms of the 6-min walked distance. However, since the study was not designed and not powered to examine these effects, we decided to report them just as exploratory clinical findings that could stimulate future investigation. Statins are unlikely to substitute for any of the currently used drugs for PAH, but may have a place as adjunct therapy if further observations support their recommendation.

## References

1. Barst RJ, Rubin LJ, Long WA, McGoon MD, Rich S, Badesch DB, et al. A comparison of continuous intravenous epoprostenol (prostacyclin) with conventional therapy for primary pulmonary hypertension. The Primary Pulmonary Hypertension Study Group. *N Engl J Med* 1996; 334: 296-302.
2. Galie N, Humbert M, Vachiery JL, Vizza CD, Kneussl M, Manes A, et al. Effects of beraprost sodium, an oral prostacyclin analogue, in patients with pulmonary arterial hypertension: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39: 1496-1502.
3. Olschewski H, Simonneau G, Galie N, Higenbottam T, Naeije R, Rubin LJ, et al. Inhaled iloprost for severe pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 2002; 347: 322-329.
4. Rubin LJ, Badesch DB, Barst RJ, Galie N, Black CM, Keogh A, et al. Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 2002; 346: 896-903.
5. Simonneau G, Barst RJ, Galie N, Naeije R, Rich S, Bourge RC, et al. Continuous subcutaneous infusion of treprostinil, a prostacyclin analogue, in patients with pulmonary arterial hypertension: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 800-804.
6. Barst RJ, Langleben D, Frost A, Horn EM, Oudiz R, Shapiro S, et al. Sildenafil therapy for pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169: 441-447.
7. Galie N, Ghofrani HA, Torbicki A, Barst RJ, Rubin LJ, Badesch D, et al. Sildenafil citrate therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 2005; 353: 2148-2157.
8. Boyer-Neumann C, Brenot F, Wolf M, Peynaud-Debayle E, Duroux P, Meyer D, et al. Continuous infusion of prostacyclin decreases plasma levels of t-PA and PAI-1 in primary pulmonary hypertension. *Thromb Haemost* 1995; 73: 735-736.
9. Friedman R, Mears JG, Barst RJ. Continuous infusion of prostacyclin normalizes plasma markers of endothelial cell injury and platelet aggregation in primary pulmonary hypertension. *Circulation* 1997; 96: 2782-2784.
10. Sakamaki F, Kyotani S, Nagaya N, Sato N, Oya H, Satoh T, et al. Increased plasma P-selectin and decreased thrombomodulin in pulmonary arterial hypertension were improved by continuous prostacyclin therapy. *Circulation* 2000; 102: 2720-2725.
11. Veyradier A, Nishikubo T, Humbert M, Wolf M, Sitbon O, Simonneau G, et al. Improvement of von Willebrand factor proteolysis after prostacyclin infusion in severe pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2000; 102: 2460-2462.
12. Budhiraja R, Tuder RM, Hassoun PM. Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension. *Circulation* 2004; 109: 159-165.
13. Galie N, Grigioni F, Bacchi-Reggiani L, Ussia GP, Parlangeli R, Catanzariti P, et al. Relationship of endothelin-1 to survival in patients with primary pulmonary hypertension. *Eur J Clin Invest* 1996; 26 (Suppl 1): A48 (Abstract).
14. Lopes AA, Maeda NY, Goncalves RC, Bydlowski SP. Endothelial cell dysfunction correlates differentially with survival in primary and secondary pulmonary hypertension. *Am Heart J* 2000; 139: 618-623.
15. Kawut SM, Horn EM, Berekashvili KK, Widlitz AC, Rosenzweig EB, Barst RJ. von Willebrand factor independently predicts long-term survival in patients with pulmonary arterial hypertension. *Chest* 2005; 128: 2355-2362.
16. Murata T, Kinoshita K, Hori M, Kuwahara M, Tsubone H,



- Karaki H, et al. Statin protects endothelial nitric oxide synthase activity in hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 2335-2342.
17. Guerard P, Rakotoniaina Z, Goirand F, Rochette L, Dumas M, Lirussi F, et al. The HMG-CoA reductase inhibitor, pravastatin, prevents the development of monocrotaline-induced pulmonary hypertension in the rat through reduction of endothelial cell apoptosis and overexpression of eNOS. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2006; 373: 401-414.
  18. Nishimura T, Vaszar LT, Faul JL, Zhao G, Berry GJ, Shi L, et al. Simvastatin rescues rats from fatal pulmonary hypertension by inducing apoptosis of neointimal smooth muscle cells. *Circulation* 2003; 108: 1640-1645.
  19. Hu H, Sung A, Zhao G, Shi L, Qiu D, Nishimura T, et al. Simvastatin enhances bone morphogenetic protein receptor type II expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 339: 59-64.
  20. Olsson AG, McTaggart F, Raza A. Rosuvastatin: a highly effective new HMG-CoA reductase inhibitor. *Cardiovasc Drug Rev* 2002; 20: 303-328.
  21. Rosenson RS. Rosuvastatin: a new inhibitor of HMG-coA reductase for the treatment of dyslipidemia. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2003; 1: 495-505.
  22. Cheng JW. Rosuvastatin in the management of hyperlipidemia. *Clin Ther* 2004; 26: 1368-1387.
  23. Girgis RE, Li D, Zhan X, Garcia JG, Tudor RM, Hassoun PM, et al. Attenuation of chronic hypoxic pulmonary hypertension by simvastatin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 285: H938-H945.
  24. Girgis RE, Mozammel S, Champion HC, Li D, Peng X, Shimoda L, et al. Regression of chronic hypoxic pulmonary hypertension by simvastatin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 292: L1105-L1110.
  25. Souza-Costa DC, Figueiredo-Lopes L, Alves-Filho JC, Semprini MC, Gerlach RF, Cunha FQ, et al. Protective effects of atorvastatin in rat models of acute pulmonary embolism: involvement of matrix metalloproteinase-9. *Crit Care Med* 2007; 35: 239-245.
  26. Laufs U, Fata VL, Liao JK. Inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase blocks hypoxia-mediated down-regulation of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1997; 272: 31725-31729.
  27. 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.
  28. Pinsky DJ, Naka Y, Liao H, Oz MC, Wagner DD, Mayadas TN, et al. 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.
  29. Padilla A, Moake JL, Bernardo A, Ball C, Wang Y, Arya M, et al. P-selectin anchors newly released ultralarge von Willebrand factor multimers to the endothelial cell surface. *Blood* 2004; 103: 2150-2156.
  30. Davi G, Romano M, Mezzetti A, Procopio A, Iacobelli S, Antidormi T, et al. Increased levels of soluble P-selectin in hypercholesterolemic patients. *Circulation* 1998; 97: 953-957.