

**Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul**  
**Faculdade De Medicina**  
**Curso De Pós-Graduação em Ciências da Saúde:**  
**Cardiologia e Cardiovasculares**

**Perfil dos níveis plasmáticos de endotelina-1 em  
lactentes submetidos à cirurgia cardíaca com  
circulação extracorpórea**

**Dissertação de Mestrado**

**Aluna: Lisiane Dalle Mulle**  
**Orientadora: Silvana Molossi**

**Porto Alegre, março de 2002.**

## ÍNDICE

Abreviaturas .....	3
I – Introdução .....	4
1. Introdução à Cardiopatia Congênita .....	4
1.1 Correção Cirúrgica .....	5
1.2 Circulação Extracorpórea .....	6
2. Reação Inflamatória Sistêmica Pós-Circulação Extracorpórea .....	7
2.1 Mediadores Inflamatórios .....	9
2.1.1 Citocinas .....	9
2.1.2 Mediadores de Adesão Celular .....	11
2.2 Substâncias Vasoativas .....	14
2.2.1 Óxido Nítrico .....	15
2.2.2 Endotelinas .....	16
2.2.2.1 Endotelina-1 .....	17
3. Aspectos Clínicos no Pós-Operatório .....	23
4. Racionalização do Presente Estudo .....	24
II – Hipótese .....	26
III – Objetivos .....	27
IV - Referências Bibliográficas .....	28 – 38
Artigo em Inglês .....	40 - 67

## **Abreviaturas**

<b>IBGE</b>	Instituto Brasileiro de Geografia Estatística
<b>CEC</b>	circulação extracorpórea
<b>LPS</b>	lipopolissacáride
<b>LBP</b>	proteína ligadora do LPS
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	fator de necrose tumoral alfa
<b>NO</b>	óxido nítrico
<b>IL(s)</b>	interleucina(s)
<b>C3a</b>	complemento 3a
<b>C5a</b>	complemento 5a
<b>EDRF</b>	fator relaxante derivado do endotélio
<b>EDCF</b>	fator de contração derivado do endotélio
<b>cGMP</b>	3'5'monofosfato cíclico de guanósina
<b>ET</b>	endotelina
<b>cAMP</b>	3'5'monofosfato cíclico de adenosina

Nota: várias siglas foram mantidas conforme a língua inglesa por serem assim conhecidas universalmente.

## **I - Introdução**

### **1 - Introdução à Cardiopatia Congênita**

Estima-se que em cada mil recém-nascidos vivos, oito apresentam cardiopatia congênita, sendo que um terço destas crianças irão se tornar criticamente doentes durante o primeiro ano de vida e necessitarão de tratamento cirúrgico (1). Dados fornecidos pelo censo realizado no Estado do Rio Grande do Sul, a cargo do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) em 1991, revelam um total de 926 a 2000 nascidos-vivo portadores de cardiopatia congênita (IBGE, censo 1991). Em 1996, para uma população de 9,6 milhões de habitantes no nosso Estado, estima-se que aproximadamente 1000 nascidos-vivo apresentaram cardiopatia ao nascimento (IBGE, censo 1996). A cirurgia para correção definitiva de cardiopatia congênita tem um impacto significativo na redução da mortalidade causada pelo defeito e nas conseqüências determinadas pela própria cardiopatia no que se refere ao desenvolvimento de outros órgãos e sistemas (1).

No passado, devido ao alto risco da cirurgia cardíaca, a maioria dos recém-nascidos e lactentes criticamente doentes era submetida a um primeiro estágio terapêutico, o qual incluía um procedimento cirúrgico paliativo. Mais recentemente, as cirurgias para a correção definitiva da cardiopatia tornaram-se o procedimento de escolha na maior parte das instituições, envolvendo os primeiros meses de vida e o período neonatal (2-4). As cardiopatias congênitas mais freqüentes que necessitam de intervenção cirúrgica ainda no primeiro ano de vida são: comunicação interventricular, comunicação interatrial, tetralogia de Fallot, transposição dos grandes vasos, defeito do septo átrio-ventricular, coarctação da aorta (5).

## **1.1 – Correção Cirúrgica**

As anormalidades cognitivas e psicomotoras possivelmente desenvolvidas pelas crianças com cardiopatia congênita estão associadas diretamente com hipoxemia crônica, alterações hemodinâmicas e/ou insuficiência cardíaca refratária, podendo ser reduzidas ou eliminadas com a correção definitiva precoce (6). O tratamento cirúrgico da cardiopatia previne as mudanças deletérias que ocorreriam no período pós-natal, permitindo crescimento e desenvolvimento normais de áreas particularmente essenciais, como o cérebro (7).

O desenvolvimento de hipertensão pulmonar e sua associação com reatividade pulmonar aumentada são comuns na doença cardíaca congênita com fluxo sanguíneo pulmonar aumentado. O reparo cirúrgico precoce das cardiopatias que apresentam esta evolução tem reduzido a incidência de doença vascular pulmonar irreversível. As crianças com alterações vasculares pulmonares, por sua vez, apresentam uma maior morbidade no período pós-operatório, secundária a elevações na resistência vascular pulmonar e a própria reatividade vascular pulmonar aumentada imediatamente após a circulação extracorpórea (CEC) (8). Desta forma, o impacto da correção precoce tende a diminuir tais efeitos deletérios à circulação pulmonar, determinando o curso pós-operatório destas crianças.

Nos últimos anos, a cirurgia cardíaca com CEC para correção definitiva de cardiopatia congênita em recém-nascidos e lactentes tem sido uma estratégia efetiva e segura. Esta abordagem se tornou possível com o desenvolvimento de técnicas adequadas, possibilitando assim a abordagem cirúrgica corretiva para pacientes de baixo peso e com idade precoce (9,10).

## 1.2 - Circulação Extracorpórea

O termo CEC é geralmente usado para descrever uma técnica através da qual as funções cardíacas e pulmonares do paciente são transferidas para um sistema mecânico, sendo mantidas durante a execução de cirurgia cardíaca ou pulmonar (11). O suporte da CEC para a realização de cirurgia cardíaca foi inicialmente usado com sucesso no início da década de 50, sendo associado com uma morbi-mortalidade bastante elevada (12). Atualmente, com o desenvolvimento de novas técnicas e a melhora dos equipamentos empregados, a cirurgia cardíaca com CEC tornou-se mais segura, sendo realizada rotineiramente em pacientes pediátricos (13).

Durante a CEC, os pacientes pediátricos são submetidos a vários extremos biológicos: baixa pressão de perfusão, fluxo sanguíneo não-pulsátil, hemodiluição, hipotermia (profunda ou não: 15 a 32°C) e extremos no pH sanguíneo (14,15). Por isso, muitas manifestações clínicas e complicações após a cirurgia cardíaca podem ser atribuídas a CEC e não ao procedimento propriamente dito (16,17). A hipotermia profunda se faz necessária na CEC por ocasião do uso de fluxo não-pulsátil, além da necessidade de redução na velocidade de fluxo perfusional para minimizar o retorno sanguíneo para o coração e ainda, pode ser empregada em situações que requeiram preservação da função do órgão durante a cirurgia cardíaca, minimizando a isquemia tecidual através da redução no metabolismo celular (15,18,19).

Mudanças fisiológicas podem ocorrer durante e após a CEC relacionadas ao circuito e oxigenador não endotelizado empregados, hipotermia dos tecidos, grau de hemodiluição, perfusão não-pulsátil, idade do paciente, viabilidade do miocárdio pré-operatório, tempo de isquemia (tempo de clampeamento aórtico), tempo de parada circulatória, tipo de anestesia e presença de resposta inflamatória exagerada em crianças pequenas. Estes efeitos são

decorrentes da liberação de um grande número de metabólitos e substâncias hormonais, incluindo catecolaminas, cortisol, hormônio do crescimento, prostaglandina, complemento, citocinas, glicose, insulina,  $\beta$ -endorfinas e outras substâncias que caracterizam a resposta inflamatória sistêmica que ocorre durante a CEC (20,21).

## **2 - Reação Inflamatória Sistêmica Pós-Circulação Extracorpórea**

A CEC e a cirurgia cardíaca ativam a resposta inflamatória sistêmica, a qual é caracterizada por alterações nas funções cardiovascular e pulmonar. A resposta inflamatória sistêmica pode ser iniciada ainda durante a cirurgia cardíaca por inúmeros processos, tais como o contato do sangue com a superfície não endotelizada do aparato da CEC, o desenvolvimento de lesão isquêmica e de reperfusão e a presença de endotoxemia (19,22). O grau e a duração da resposta inflamatória também é influenciado por vários fatores, incluindo agentes farmacológicos usados para atenuar a resposta inflamatória, a composição da solução de preenchimento do circuito (*priming*), o uso de pressão pulsátil, o uso de filtração mecânica, o tipo de oxigenador, o tipo de circuito da CEC e a temperatura de perfusão (22).

Durante a CEC, tem sido observado um aumento da concentração plasmática de endotoxina, um lipopolissacáride (LPS) associado à membrana celular de microorganismos gram-negativos (23). A redução no fluxo sanguíneo esplâncnico tem sido observada durante a CEC e pode estar associada com a subsequente translocação de endotoxinas através da parede do intestino isquêmico, promovendo ativação da resposta inflamatória sistêmica (24,25). A presença de endotoxina, por sua vez, está associada com o desenvolvimento de acidemia, redução da resistência vascular sistêmica e depressão da

função ventricular (26). A endotoxina é um potente ativador da cascata inflamatória sistêmica levando a produção de citocinas, complemento e ativação dos neutrófilos (27). O mecanismo sugerido através do qual a endotoxina ativa a cascata inflamatória envolve a ligação da porção lipídica da endotoxina à proteína ligadora do LPS (LBP), que está normalmente no sangue. Este complexo endotoxina-LBP é mil vezes mais potente que o LPS sozinho na indução da liberação do fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$  pelos macrófagos. A ligação do complexo endotoxina-LBP aos receptores dos macrófagos CD14 causa ativação da proteína quinase e inicia a produção de TNF- $\alpha$  (28,29) (Fig 1).

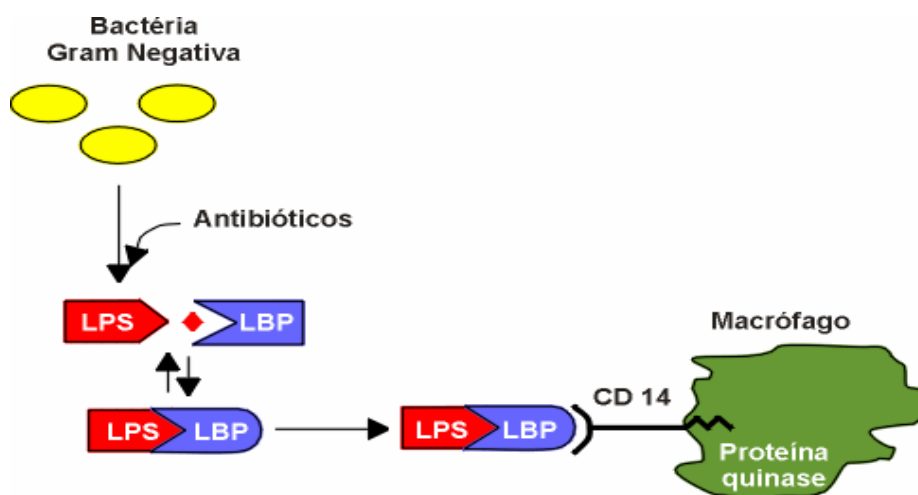


Figura 1 – Fase de indução da síntese de citocinas. Após o tratamento com antibióticos, a LPS é liberada da bactéria e se liga a LBP para formar o complexo LPS-LBP. Este complexo se liga a molécula CD14 na membrana do macrófago e ativa a proteína quinase. LPS: lipopolissacarídeo, LBP: proteína ligadora do LPS. Hall, Smith and Rocker. *Anesth Analg* 1997;85:766-782.

Uma vez iniciado o processo da resposta inflamatória sistêmica, este será mantido através de vários mediadores, incluindo citocinas e mediadores da adesão celular, e substâncias vasoativas, como óxido nítrico (NO) e endotelinas, entre outros (22,30-32).



## **2.1 – Mediadores Inflamatórios**

### **2.1.1 - Citocinas**

Muitas citocinas têm sido identificadas na resposta inflamatória sistêmica, tais como o TNF- $\alpha$ , as interleucinas (ILs), interferon e vários fatores de crescimento. As citocinas são proteínas de baixo peso molecular, que lembram hormônios, geradas nos tecidos sob uma variedade de circunstâncias, agindo como mensageiras intercelulares na resposta da ativação celular. Diferentemente dos hormônios, as citocinas têm efeitos biológicos múltiplos e são produzidas em resposta a estímulos externos. As manifestações clínicas decorrentes da liberação de citocinas incluem febre, redução do nível de consciência, instabilidade hemodinâmica e depressão do miocárdio. Todas estas alterações são encontradas no pós-operatório de uma cirurgia cardíaca com CEC. As citocinas mais freqüentemente liberadas durante e após a CEC são TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e IL-8, entre outras (33-36) (Fig 2).

O TNF- $\alpha$  é produzido por monócitos e fagócitos mononucleares, sendo o mais precoce e importante mediador liberado na resposta inflamatória sistêmica (37). Um aumento nos níveis de TNF- $\alpha$  tem sido observado em associação com o uso de CEC, apresentando um pico em 2 horas e, novamente, 18 a 24 horas após a CEC. Os níveis de TNF- $\alpha$  aumentam mais rapidamente que as outras citocinas pós-CEC, indicando seu papel como importante desencadeador da resposta inflamatória (38,39).



hematopoiéticos (43). Vários estudos têm demonstrado um aumento nos níveis de IL-6 2 horas após a cirurgia cardíaca com CEC, sendo o seu pico ao redor de 4 horas e permanecendo elevada 24 horas após a CEC (43,44).

A IL-8 também é produzida pelos monócitos, células endoteliais, macrófagos e fibroblastos como resultado da sua estimulação pelo TNF- $\alpha$ , IL-1 e endotoxina. A importância da IL-8 na resposta inflamatória reside no seu efeito sobre os neutrófilos, induzindo a quimiotaxia e ativação destas células. O pico da IL-8 precede ou coincide com o pico da IL-6 (45,46). Antonelli e colaboradores observaram um aumento nos níveis séricos de IL-8 pós-cirurgia cardíaca com CEC e uma correlação positiva destes níveis com o tempo de clampeamento aórtico (43).

### **2.1.2 - Mediadores da Adesão Celular**

O envolvimento dos neutrófilos e células endoteliais na reação inflamatória ocorre através da ativação destas células. Entende-se por “ativação” a aquisição de uma nova função pelas células que são estimuladas a sintetizar um número maior de certas proteínas. Em resposta a esta ativação, os neutrófilos e as células endoteliais ganham a habilidade de aderir um ao outro através da liberação de proteínas receptoras, conhecidas como ligandinas (*ligands*). Subseqüentemente, os neutrófilos migram através da camada de células endoteliais, liberando toxinas que destroem as células endoteliais e os tecidos adjacentes. Os mediadores inflamatórios humorais exercem um papel importante na iniciação e manutenção destas interações celulares neutrófilo-endotélio (47).

Os neutrófilos circulam como células não-aderentes no sangue e na linfa. Uma vez estimulados, aderem firmemente à superfície endotelial e migram como células aderentes

nos tecidos em direção ao sítio inflamatório, atravessando a parede do vaso. Esta migração de neutrófilos depende de interações com o endotélio e com a matriz extracelular. As moléculas de adesão são especializadas na regulação destas interações e podem ser expressas constitutivamente na superfície celular ou podem ser induzidas por diferentes estímulos. Devido a características específicas de cada proteína, as moléculas de adesão são agrupadas em três grandes famílias: família das imunoglobulinas, das integrinas e das selectinas (48-50).

O processo de adesão pode ser dividido em três etapas. Num primeiro momento, a célula circulante aproxima-se da parede do vaso e rola sobre o endotélio. Numa segunda etapa, o leucócito em contato com o vaso, sofre a ação de substâncias solúveis liberadas no local (quimiocinas) e passa a expressar moléculas ativadas que irão determinar uma ligação mais intensa na superfície endotelial. Só então o leucócito é capaz de migrar através do vaso em direção ao tecido (50,51). O primeiro estágio no processo de adesão, conhecido como rolamento, é regulado pelas citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) e endotoxinas; envolve a expressão de moléculas de adesão conhecidas como selectinas. O segundo estágio da adesão é mediado por receptores de superfície expressos nos neutrófilos e células endoteliais, pertencentes às famílias das integrinas e das imunoglobulinas (52). O terceiro estágio envolve a ligação firme com as células endoteliais e a sua migração através da barreira endotelial com a conseqüente liberação de enzimas intracelulares por parte dos neutrófilos, tais como a elastase e mieloperoxidase (22,53). Estudos recentes têm demonstrado a ativação dos neutrófilos e a redução nos níveis séricos das moléculas de adesão durante e após a cirurgia cardíaca com CEC, sugerindo que estes fatores tenham uma contribuição na resposta inflamatória sistêmica pós-CEC (54,55) (Fig. 3 e Fig. 4).

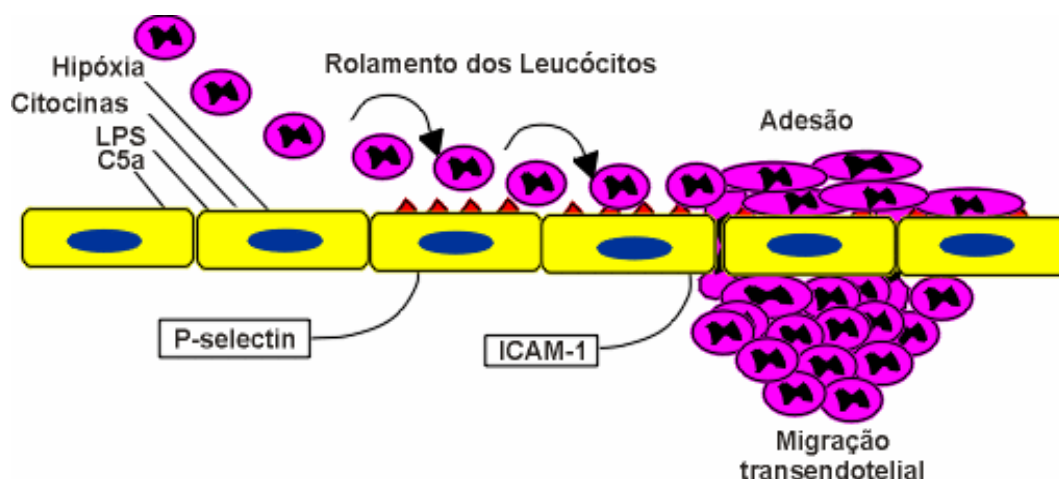


Figura 3 – A adesão dos neutrófilos é um processo de várias etapas que envolve o contato inicial entre os neutrófilos e os membros das famílias das selectinas expressas no endotélio ativado. Esta ligação de baixa afinidade resulta no rolamento dos leucócitos. À medida que isto ocorre, os neutrófilos tornam-se ativados e ocorre uma ligação forte entre as integrinas na superfície dos leucócitos (CD11/18) e as moléculas de adesão no endotélio (ICAM: molécula de adesão intracelular). LPS: lipopolissacáride. Boyle e col. *Ann Thorac Surg* 1997;63:277-284.

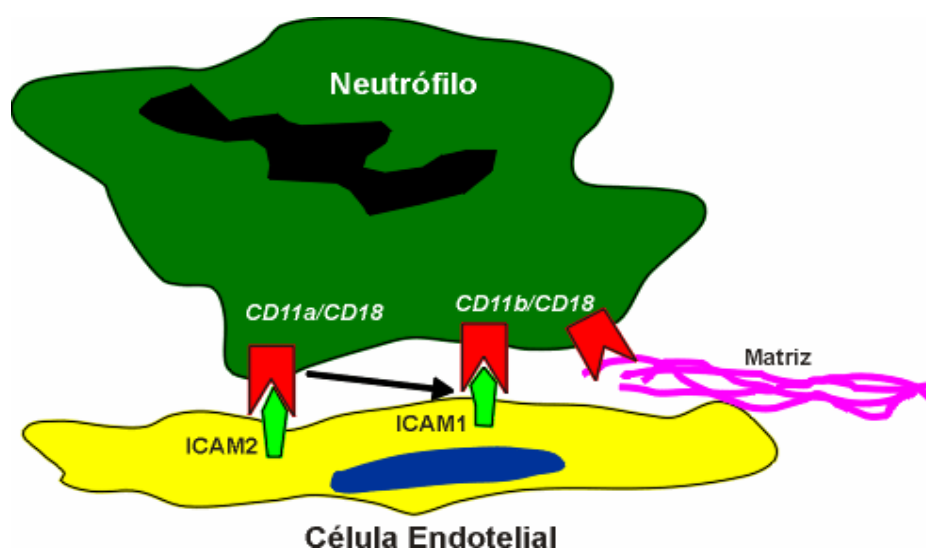


Figura 4 – O neutrófilo CD11a/CD18 adere à ICAM1 e ICAM2 nas células endoteliais. CD11b/CD18 também adere à ICAM1, e possivelmente aos elementos da matriz extracelular (ICAM: molécula de adesão intracelular). Elliot and Finn. *Ann Thorac Surg* 1993;56:1503-8.

## 2.2 – Substâncias Vasoativas

O endotélio vascular tem sido reconhecido como uma unidade funcional importante envolvida na regulação do tônus muscular vascular. Esta unidade altamente metabólica sintetiza diversas substâncias vasoativas que provocam relaxamento ou contração das células musculares lisas vasculares. As células endoteliais, sob a ação da bradicinina e acetilcolina, secretam fatores relaxantes derivados do endotélio (EDRF) que promovem relaxamento das células musculares lisas, sendo o NO conhecido como o maior vasodilatador endotelial. As substâncias vasoconstritoras produzidas pelas células endoteliais são designadas fatores de contração derivados do endotélio (EDCF) e incluem; as endotelinas, os fatores produzidos pela via da ciclooxigenase (tromboxano  $A_2$ , prostaglandina  $E_2$  e ânions do superóxido) e possivelmente, a angiotensina II. O NO ativa a guanilatociclase solúvel induzindo a formação de 3'-5'-monofosfato de guanosina cíclico (cGMP). Nas células musculares lisas, o cGMP provoca o relaxamento, enquanto nas células endoteliais inibe a produção de endotelina. Essa inibição manifesta-se, particularmente, em relação à geração de endotelina estimulada pela trombina e pela angiotensina II (56). Desta forma, o endotélio vascular modula o tônus da musculatura vascular lisa através da liberação simultânea de fatores relaxantes do endotélio (NO) e fatores constritores do endotélio (endotelina) (Fig 5).

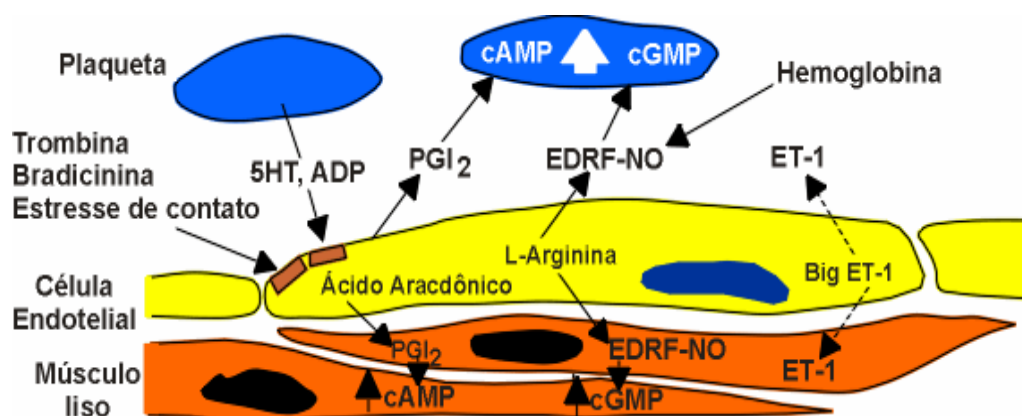


Figura 5 – Geração de Prostaciclina ( $PGI_2$ ), Fator de relaxante derivado do endotélio (EDRF-NO) e Endotelina-1 (ET-1) nas células endoteliais. A estimulação de receptores nas células endoteliais pela serotonina (5HT) ou pelo difosfato de adenosina (ADP) liberada pelas plaquetas, pela trombina, pela bradicinina ou pelo estresse de contato leva a liberação de mediadores vasoativos. Vane e col. N Engl J Med 1990;323(1):27-36.

### 2.2.1 - Óxido Nítrico

O óxido nítrico é sintetizado a partir da L-arginina sob ação da enzima óxido nítrico sintetase. Através da influência de citocinas ( $TNF\alpha$  e  $IL-1\beta$ ) e endotoxinas ocorre a estimulação da óxido nítrico sintetase, levando a um aumento da produção e liberação de NO. A ação do óxido nítrico promove o relaxamento da musculatura vascular lisa (hipotensão), depressão miocárdica (efeito inotrópico negativo) e lesão pulmonar, sendo todos esses eventos observados após a cirurgia cardíaca (57,58). O NO inibe a adesão dos neutrófilos às células endoteliais e inibe a agregação plaquetária. Pode ainda, ter um papel na lesão de isquemia-reperfusão (59). Foi observado um aumento na concentração plasmática de NO durante e após a CEC, bem como níveis elevados de óxido nítrico sintetase nos pulmões pós-CEC (60,61).

A liberação basal de NO pelas células endoteliais ocorre de forma contínua, o que mantém a vasculatura em estado basal relaxado. Uma falha na liberação contínua de NO pode contribuir para o desenvolvimento de hipertensão pulmonar e sistêmica (62). O NO

tem um papel fundamental no pós-operatório de cirurgia cardíaca representado pela sua ação vasodilatadora pulmonar. Conseqüentemente, o uso de NO inalatório, com a finalidade de reduzir a pressão nas artérias pulmonares e a resistência vascular pulmonar, tem representado uma estratégia terapêutica fundamental no manejo de pacientes com hipertensão pulmonar após cirurgia cardíaca (63,64) e na Síndrome da Hipertensão Pulmonar Persistente do recém-nascido (65).

### **2.2.2 - Endotelinas**

A endotelina é um peptídeo vasoconstritor e vasopressor potente do endotélio produzido pelas células endoteliais que só foi identificado por Yanagisawa e colaboradores em 1988. Foi postulado que esta atividade vasoconstritora esteja relacionada à presença do íon cálcio extracelular e não seja dependente das ações  $\alpha$ -adrenérgica, colinérgica, serotoninérgica ou de neurotransmissores histamínicos (66).

A endotelina é um peptídeo composto de 21 aminoácidos existente no ser humano em três isoformas: endotelina-1 (ET-1), endotelina-2 (ET-2) e endotelina-3 (ET-3). A endotelina é produzida em uma variedade de tecidos e células, mas a expressão de suas isoformas é tecido-específica. As células endoteliais são os principais sítios de geração da ET-1, sendo também produzida pelo coração (miócitos), rins, sistema nervoso central e células musculares lisas vasculares da aorta humana. A ET-2 é produzida predominantemente dentro dos rins e intestino, e em menor quantidade no miocárdio, placenta, útero e células endoteliais. Esta molécula tem uma ação vasoconstritora similar àquela da ET-1, enquanto a ET-3 apresenta reduzida ação vasoconstritora. A ET-3 é encontrada em altas concentrações no cérebro, regulando funções importantes nos



neurônios e astrócitos, também sendo encontrada no trato gastrointestinal, pulmões e rins, mas não estando presente nas células endoteliais (67-70).

### 2.2.2.1 – Endotelina-1

As células endoteliais sintetizam um precursor, a pré-pró-endotelina, polipeptídeo com 212 aminoácidos, que sofre clivagem proteolítica gerando uma forma intermediária inativa, conhecida como pró-endotelina ou *big-endotelina*, esta última é composta por 38 aminoácidos que, por ação da enzima conversora da endotelina, dá origem ao peptídeo ativo endotelina (Fig. 6). A importância fisiológica da conversão da pró-ET-1 para ET-1 é devido ao maior efeito vasoconstritor da ET-1, quando comparada com a pró-ET-1, enquanto a pré-pró-ET-1, por sua vez, não apresenta qualquer ação vasoconstritora. A ET-1 atua em receptores específicos das células musculares lisas vasculares e ativa canais de cálcio dependentes de voltagem por meio de proteínas  $G_i$ , aumentando o influxo de cálcio extracelular. O aumento de cálcio intracelular induz a contração da musculatura vascular lisa (71).

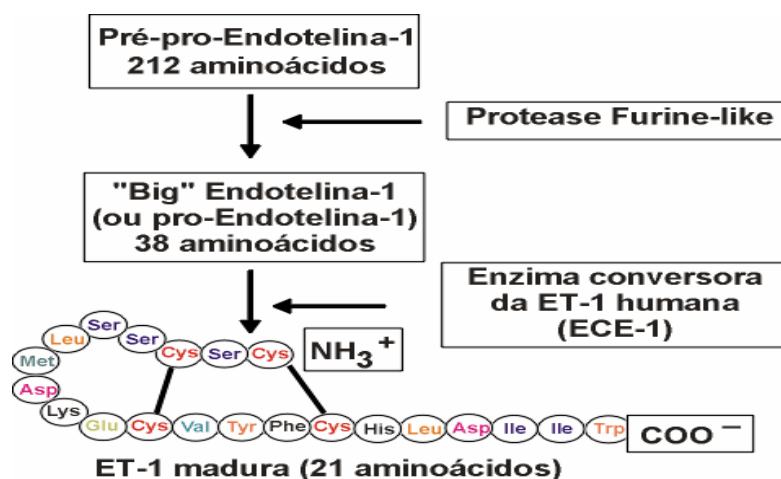


Figura 6 – Representação esquemática da biossíntese da ET-1 (endotelina-1) em seres humanos. Cesari e col. Am Heart J 1996;132:1236-1243.

Normalmente, os níveis circulantes de ET-1 são relativamente baixos, sugerindo que em condições fisiológicas a ET-1 seja pouca produzida, devido à ausência de estímulos e/ou a presença de mecanismos inibitórios potentes. Sabe-se também, que a maior parte da ET-1 é liberada abluminalmente, ou seja, diretamente nas células musculares lisas e não na luz dos vasos, atuando mais como agente parácrino (local) do que como hormônio endócrino circulante (72).

A ET-1 circulante tem uma relevância fisiopatológica bastante significativa. Foram detectados níveis plasmáticos elevados de ET-1 em diferentes condições patológicas, tais como insuficiência cardíaca, aterosclerose coronariana, infarto do miocárdio, angina instável, re-estenose pós angioplastia coronariana percutânea, sepse, hipertensão pulmonar crônica, hipertensão arterial sistêmica, hipertensão pulmonar e cardiopatia congênita, insuficiência renal, entre outros. Tais achados sugerem que o aumento nos níveis de ET-1 circulante possa ser um marcador da doença (68,73-77).

A remoção da ET-1 da circulação é muito rápida. Em estudo experimental, após uma injeção intravenosa do peptídeo radio-iodinado em um rato, a meia-vida biológica foi de aproximadamente uma hora (78). A remoção da ET-1 pode ser influenciada por doença renal com aumento da meia-vida biológica e dos níveis plasmáticos da mesma. Foi observado que durante a insuficiência renal crônica em humanos ocorre elevação nos níveis plasmáticos de ET-1 sem nenhuma modificação na concentração do seu precursor pró-ET-1 (79).

Os efeitos biológicos da ET-1 são mediados por receptores específicos. São descritos três tipos de receptores para as endotelinas: ET-A, ET-B e ET-C. Os receptores ET-A estão predominantemente nas células musculares lisas, ligam-se preferencialmente à ET-1 e são responsáveis pela potente vasoconstrição. Os receptores ET-B encontram-se nas

células endoteliais e apresentam afinidades similares a três isoformas de endotelina. A ativação dos receptores ET-B induz a liberação de NO e prostaciclina e explica a vasodilatação transitória causada pela aplicação intraluminal de endotelina. Ambos receptores, ET-A e ET-B, expressam-se em outros tecidos, como pulmões, coração, cérebro, rins e glândulas adrenais (71). O ET-C está presente nas células de vários tecidos de animais, porém não em tecido humano. Este receptor é específico para a ET-3 (69).

A expressão dos receptores das endotelinas é regulada por diversos fatores. Hipóxia e ciclosporina estimulam a produção de ET-1 nas células endoteliais, bem como a expressão dos receptores ET-A nas células musculares lisas vasculares. Os fatores de crescimento epidermal, fator de crescimento do fibroblasto, 3'-5'-monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) e estrógenos regulam os receptores ET-A em alguns tecidos, aumentando a sua expressão. O hormônio natriurético tipo C, a angiotensina II, o fator de crescimento dos fibroblastos também estimulam a expressão dos receptores ET-B. Diferentemente, a angiotensina II e o fator de crescimento derivado das plaquetas reduzem a expressão dos receptores ET-A, sendo que o cAMP e catecolaminas apresentam a mesma ação nos receptores ET-B (67).

A estratégia para bloquear os efeitos da ET-1 pode ser realizada através da inibição da sua enzima conversora, que converte *big*-ET-1 em ET-1, ou através do bloqueio dos seus receptores, evitando assim a ação da ET-1. Desta forma, os chamados antagonistas da ET-1 inibem a sua enzima conversora e bloqueiam os receptores ET-A ou ET-A e ET-B simultaneamente. Os antagonistas dos receptores ET-A inibem a vasoconstrição induzida pela ET-1 e podem constituir uma nova classe de fármacos cardiovasculares no tratamento da insuficiência cardíaca, por exemplo. Em humanos, a inibição seletiva do receptor ET-A,

bem como a inibição da enzima conversora da ET-1, podem contribuir para a vasodilatação sistêmica nos pacientes com insuficiência cardíaca congestiva (69,80).

Vários fatores são capazes de estimular a liberação da ET-1 e incluem estresse da bainha da parede do vaso, hipóxia, endotoxina, TNF- $\alpha$ , interferon, adrenalina, angiotensina, trombina, plaquetas ativadas, lipoproteína, radicais livre, ciclosporina e alguns prostanóides. Por outro lado, a produção de ET-1 pode ser inibida por alguns agentes como NO derivado do endotélio, peptídeo natriurético, heparina e prostaglandina, através do aumento nos níveis circulantes de cGMP. A liberação da ET-1 local pode ser esperada durante qualquer resposta inflamatória (69,81).

A ET-1 exerce uma grande variedade de efeitos biológicos em diferentes tecidos. Os efeitos hemodinâmicos são caracterizados por vasodilatação e hipotensão seguida de vasoconstrição potente e conseqüente efeito pressor sustentado. Esse efeito depressor tem sido atribuído à liberação endotelial de NO e prostaciclina, via ativação dos receptores ET-B. Já o efeito vasopressor ocorre via ativação dos receptores ET-A. A ET-1 exerce efeito inotrópico positivo potente. Como o bloqueio dos receptores alfa e beta-adrenérgicos, histamínicos e serotoninérgicos não inibem a ação da endotelina, sugere-se que a ET-1 possa atuar diretamente nos miócitos. A ET-1 ainda é responsável pela atividade cronotrópica positiva. Os níveis plasmáticos de ET-1 encontram-se aumentados em pacientes com choque cardiogênico, infarto agudo do miocárdio, insuficiência cardíaca e hipertensão pulmonar. A ET-1 aumenta a resistência vascular renal, reduz acentuadamente o fluxo plasmático renal e diminui o volume urinário o que causa redução na reabsorção tubular de sódio. Além disso, parece constituir em um importante mediador da hipoperfusão e hipofiltração na injúria renal pós-isquêmica. A ET-1 exerce ainda efeitos neuroendócrinos: aumento dos níveis plasmáticos do fator natriurético atrial, das

catecolaminas, da renina e da aldosterona, também estimulando a produção de NO, prostaciclina, prostaglandina E<sub>2</sub> e tromboxano A<sub>2</sub>. Acredita-se que a síntese aumentada da prostaglandina E<sub>2</sub> e prostaciclina pelas células-alvo constituam um mecanismo de retroalimentação negativo para modular a contração da musculatura lisa pelas endotelinas (62,82-85).

O efeito cardiovascular endógeno da ET-1 é modulado por um balanço entre os efeitos dos receptores ET-A e ET-B. A ativação dos receptores ET-A no músculo vascular liso induz a vasoconstrição e tende a aumentar a pressão sanguínea, enquanto que a ativação do endotélio e dos receptores ET-B renais causam vasodilatação, efeito este atribuído à liberação de prostaciclina e NO, e natriurese, que tende a diminuir a pressão sanguínea (75,86). Kojima e colaboradores observaram que os níveis de ET-1 encontravam-se marcadamente elevados durante os primeiros dias de vida, como também estavam elevados os níveis do fator natriurético atrial, sugerindo que a ET-1 endógena possa agir no sistema renina-angiotensina para regular o tônus vascular e pressão sanguínea durante a vida pós-natal (87). A ação vasoconstritora da ET-1 foi comparada com a ação da adrenalina na ressuscitação cardiorespiratória em estudo experimental com suínos. Neste estudo, Hilwig e colaboradores observaram que a administração de ET-1 associada com adrenalina piorava a evolução pós-ressuscitação, em função da intensa vasoconstrição que a endotelina determina nos tecidos (82).

A hipertensão pulmonar é uma importante causa de morbi-mortalidade após cirurgia cardíaca para correção de cardiopatia congênita (88). Vários estudos têm observado uma grande produção de citocinas e ET-1 pós-cirurgia cardíaca com CEC e sua associação com lesão pulmonar (89). A ET-1 tem um papel na fisiopatologia da hipertensão pulmonar pós-circulação extracorpórea que cursa com reatividade vascular pulmonar aumentada (90-92).

Antoneli e colaboradores não detectaram níveis elevados de ET-1 em lavado broncoalveolar de pacientes submetidos à cirurgia de revascularização do miocárdio. No entanto, estes autores observaram que os níveis mais elevados de ET-1 no leito vascular pulmonar se correlacionavam com o aumento da resistência vascular pulmonar, sugerindo que a CEC possa induzir a síntese e secreção de ET-1 pelas células endoteliais com conseqüente vasoconstrição pulmonar transitória (93,94).

Após a CEC ocorre um aumento nos níveis séricos de ET-1 com pico entre 3 a 6 horas após a CEC, sendo que os pacientes que apresentam fluxo sanguíneo pulmonar aumentado possuem níveis mais elevados do que os pacientes com fluxo normal (95,96). A resposta circulatória pulmonar à CEC com hipotermia é dependente do estado pré-existente na circulação. Em estudo experimental com ovelhas pequenas com hipertensão pulmonar, o uso endovenoso de um antagonista não seletivo do receptor da ET-1 (PD145065) bloqueou completamente o aumento da resistência vascular pulmonar e o aumento na pressão arterial pulmonar pós-CEC com hipotermia. Outro efeito observado foi o bloqueio da resposta vasoconstritora à hipóxia alveolar aguda após a CEC, sugerindo que a ET-1 tenha um papel no aumento da reatividade vascular pulmonar associada com hipertensão pulmonar pós-CEC (90). O uso de bloqueadores da enzima conversora da endotelina durante a CEC com parada circulatória hipotérmica diminui a resposta hipertensiva pulmonar, sugerindo que a endotelina age primariamente como um vasoconstritor pulmonar (97). Bosentan, um antagonista dos receptores da endotelina, pode prevenir a hipertensão pulmonar aguda pós-CEC, com maior efeito na redução da resistência vascular pulmonar e menor efeito na redução da resistência vascular sistêmica, enfatizando a seletividade do bosentan no leito vascular pulmonar (98). Chang e colaboradores também demonstraram que os níveis plasmáticos de ET-1 e a pressão na artéria pulmonar estão sincronicamente elevados nos

pacientes com doença cardíaca valvular, de acordo com a severidade da hipertensão pulmonar. Estes autores sugeriram duas possíveis explicações para os níveis plasmáticos elevados de ET-1 na hipertensão pulmonar: 1- causada por um aumento na taxa metabólica das células endoteliais na circulação pulmonar, e 2- causada pela estase no fluxo da circulação pulmonar decorrente de hipertensão venosa pulmonar (99).

### **3 – Aspectos Clínicos do Período Pós-Operatório**

A cardiopatia congênita com shunt esquerda-direita está frequentemente associada com hipertensão pulmonar que desencadeia anormalidades funcionais e estruturais progressivas no leito vascular pulmonar. A CEC com parada circulatória hipotérmica profunda frequentemente resulta em aumento da resistência vascular pulmonar, particularmente em lactentes e crianças. O aumento na resistência vascular pulmonar é uma causa considerável de morbi-mortalidade em pacientes com função ventricular direita inadequada. A CEC com parada circulatória hipotérmica resulta em lesão ou ativação das células endoteliais, ou ambos, o que leva à alteração no equilíbrio entre vasodilatadores e vasoconstritores derivados do endotélio (93).

A cardiopatia congênita que apresenta fluxo sanguíneo pulmonar aumentado resulta, com frequência, na elevação da resistência vascular pulmonar e da pressão na artéria pulmonar, derivadas de alterações estruturais na camada íntima e da muscularização excessiva dos pequenos vasos pulmonares. O aumento abrupto na resistência vascular pulmonar no período pós-operatório do reparo cirúrgico destes defeitos determina elevação da pós-carga ventricular direita, podendo comprometer significativamente o débito cardíaco. Estas mudanças podem se manifestar como uma crise hipertensiva que ameace a

vida, causando insuficiência cardíaca direita aguda e aumento dramático na resistência da via aérea (96).

A hipertensão pulmonar aguda e a elevada resistência vascular pulmonar, associada à cirurgia cardíaca com CEC, representam potencialmente uma das maiores causas de morbi-mortalidade no período pós-operatório (63). Assim, o desencadeamento de uma resposta inflamatória sistêmica disseminada durante o período trans-operatório com uso de CEC traduzir-se-á, invariavelmente, nos aspectos clínicos observados no período pós-operatório. Tais efeitos irão, por consequência, influenciar na evolução final destas crianças.

#### **4 – Racionalização do Presente Estudo**

Na literatura, já está claramente estabelecido que a cirurgia cardíaca com CEC desencadeia uma resposta inflamatória sistêmica generalizada com a liberação de vários mediadores inflamatórios (22). Entretanto, o papel da ET-1 na circulação sistêmica e pulmonar ainda não está bem claro e necessita ser elucidado. Assim como, a relação direta da ET-1 na patogênese da hipertensão pulmonar durante o pós-operatório de cirurgia cardíaca em lactentes. É de crucial importância esclarecer qual é o perfil da ET-1 e as consequências da sua liberação neste período, especialmente nos lactentes. Correlacionando a ET-1 com o comportamento hemodinâmico e com o funcionamento dos múltiplos órgãos e sistemas no pós-operatório imediato.

Embora vários autores tenham investigado a presença de ET-1 circulante em crianças após cirurgia cardíaca com CEC (93-96), nenhum trabalho apresenta um grupo homogêneo de idade e, particularmente, relacionando a presença deste mediador com o



desfecho. Além disso, permanece escassa a quantidade de informações descrevendo a correlação entre a ET-1 e os indicadores clínicos de prognóstico.

## **II – Hipótese**

Os níveis plasmáticos de ET-1 encontram-se aumentados em lactentes submetidos à cirurgia cardíaca com CEC para correção de defeitos congênitos e se correlacionam com seu desfecho clínico.

### **III – Objetivos**

#### *Geral*

Determinar o perfil dos níveis plasmáticos de ET-1 no pós-operatório cardíaco de lactentes submetidos à cirurgia cardíaca com CEC para correção de defeitos congênitos.

#### *Específicos*

1. Determinar a associação entre níveis plasmáticos de ET-1 e os determinantes clínicos (variáveis hemodinâmicas, lactato plasmático e ocorrência de disfunção de múltiplos órgãos e sistemas).
2. Determinar a associação entre níveis plasmáticos de ET-1 e o desfecho clínico dos pacientes.
3. Comparar os níveis plasmáticos de ET-1 entre os pacientes cianóticos e os não-cianóticos antes e após cirurgia cardíaca com CEC.

#### **IV - Referências Bibliográficas**

1. Castañeda AR, Mayer JE, Jonas RA, e col. The neonatal with critical congenital heart disease: repair- a surgical challenge. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1989;98:869-875.
2. Reddy VM, McElhinney DB, Brook MM, e col. Atrioventricular valve function after single patch repair of complete atrioventricular septal defect in infancy: How early should repair be attempted? *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998;115(5):1032-1040.
3. Pigula FA, Khalil PN, Mayer JE, e col. Repair of tetralogy of Fallot in neonates and young infants. *Circulation* 1999;100(19 Suppl):II-157-161.
4. Thompson LD, McElhinney DB, Reddy M, e col. Neonatal repair of truncus arteriosus: Continuing improvement in outcomes. *Ann Thorac Surg* 2001;72(2):391-395.
5. Moss AJ, Adams FH, Emmanouilides GC, Riemenschneider TA: *Heart Disease in Infants, Children, and Adolescents*. Fourth edition, Baltimore, Williams & Wilkins, 1989.
6. Broonks-Gunn J, Liaw FR, Klebanov PK. Effects of early intervention on cognitive function of low weight preterm infants. *J Pediatr* 1992;120:350-359.
7. Hanley FL, Heinemann MK, Jonas RS e col. Repair of truncus arteriosus in the neonate. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993;105:1047-1056.
8. Burrows FA, Klinck JR, Rabinovitch M, Bohn DJ. Pulmonary hypertension in children perioperative management. *Can Anaesth Soc J* 1986;33:606-628.

9. Shafique T, Sellke FW, Thurer RL, et al. Cardiopulmonary bypass and pulmonary thromboxane generation. *Ann Thorac Surg* 1993;55:724-728.
10. Downing SW, Edmunds Jr LH. Release of vasoactive substances during cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1992;54:1236-1243.
11. Mayer JE. Cardiopulmonary bypass. In: Chang A, Hanley FL, Wernovsky G, Wessel DL (Eds). *Pediatric Cardiac Intensive Care*. Baltimore, Williams & Williams, 1998, pp189-199.
12. Stammers AH. Historical aspects of cardiopulmonary bypass: from antiquity to acceptance. *J Cardiothorac and Vasc Anesth* 1997;11(3):266-274.
13. Lewis FJ, Tanflic M. Closure of atrial septal defects with hypothermia: experimental accomplishments and the report of one successful case. *Surgery*, 1953;33:52-8.
14. Lenn NJ. Plasticity and responses of the immature system to injury. *Semin Perinatol* 1987;11:117-131.
15. Kern F, Greeley W, Ungerleider RM. Cardiopulmonary bypass. In: Nichols DG, Cameron E, Greeley W, Lappe DG, Ungerleider RM, Wetzel RC (Eds). *Critical heart disease in infant and children*. Baltimore, Mosby, 1995, pp497-529.
16. Mills AN, Haworth SG. Great permeability of the neonatal lung. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1991;101:909-16.
17. Finn A, Dreyer WJ. Neutrophil adhesion and inflammatory response induced by cardiopulmonary bypass. *Cardiol Young* 1993;3:244-50.
18. Stayer SA, Steven JM, Nicolson SC, et al. The metabolic effects of surface cooling neonates prior to cardiac surgery. *Anesth Analg* 1994;79:834-839.

19. Serraf A, Robotin M, Bonnet N, e col. Alteration of the neonatal pulmonary physiology after total cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1997; 114:1061-1069.
20. Royston D. The inflammatory response and extracorporeal circulation. *J Cardiothorac and Vasc Anesth* 1997;11(3):341-354.
21. Shirai T, Rao V, Weisel RD, e col. Anterograde and retrograde cardioplegia: alternate or simultaneous? *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996;112:787-796.
22. Hall RI, Smith MS, Rocker G. The systemic inflammatory response to cardiopulmonary bypass: pathophysiological, therapeutic and pharmacological considerations. *Anesth Analg* 1997;85:766-782.
23. Boyle EM, Pohman TH, Johnson MC, Verrier ED. Endothelial cell injury in cardiovascular surgery: the systemic inflammatory response. *Ann Thorac Surg* 1997;63:277-284.
24. Landow L, Phillips DA, Heard SO. Gastric tonometry and venous oximetry in cardiac surgery patients. *Critical Care Med* 1991;19:1226-1233.
25. Landow L, Andersen LW. Splanchnic ischemia and its role in multiple organ failure. *Acta Anaesthesiol Scand* 1994;38:626-639.
26. Velthuis F, Jansen PGM, Oudemans-van Straaten HM. Myocardial performance in elderly patients after cardiopulmonary bypass is suppressed by tumor necrosis factor. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995;110:1663-1669.
27. Smedly LA, Tonnesen MG, Sandhaus RA. Neutrophil-mediated injury to endothelial cells: enhancement by endotoxin and essential role of neutrophil elastase. *J Clin Invest* 1986;77:1233-1243.

28. Schumann RR, Leong SR, Flagg GW. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* 1990;249:1429-1431.
29. Giroir BP. Mediators of septic shock: new approaches for interrupting the endogenous inflammatory cascade. *Crit Care Med* 1993;21:780-789.
30. Hill GE, Whitten CW. The role of the vascular endothelium in inflammatory syndromes, atherogenesis and the propagation of disease. *J Cardiothorac and Vasc Anesth* 1997;11(3):316-321.
31. Wan S, Yim APC. Cytokines in myocardial injury: impact on cardiac surgical approach. *Eur J Cardio-thorac Surg* 1999;16(1):S107-S111.
32. Defraigne JO, Pincemail J, Larbuisson R, et al. Cytokine release and neutrophil activation are not prevented by heparin-coated circuits and aprotinin administration. *Ann Thorac Surg* 2000;69:1084-1091.
33. Miller BE, Levy JH. Inflammatory response to cardiopulmonary bypass. *J Cardiothorac and Vasc Anesth* 1997;11(3):355-366.
34. Hennein HA, Ebba H, Rodriguez JL. Relationship of the proinflammatory cytokines to myocardial ischemia and dysfunction after uncomplicated coronary revascularization. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1994;108:626-635.
35. Butler J, Chong GL, Baigrie RJ, et al. Cytokine responses to cardiopulmonary bypass with membrane and bubble oxygenation. *Ann Thorac Surg* 1992;53:833-838.
36. Ozada T, Yoshihara K, Koyama N, et al. Clinical efficacy of heparin-bonded bypass circuits related to cytokine responses in children. *Ann Thorac Surg* 2000;69:584-590.

37. Blick M, Sherwin AS, Rosenblum M, Gutterman J. Phase I study of recombinant tumor necrosis factor in cancer patients. *Cancer Res* 1987;47:2986-2989.
38. Menasche P, Haydar S, Peynet J, e col. A potential mechanism of vasodilation after warm heart surgery: the temperature-dependent release of cytokines. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1994;107:293-299.
39. Cain BS, Meldrum DR, Dinarello CA, e col. Tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-1 $\beta$  synergistically depress human myocardial function. *Crit Care Med* 1999;27:1309-1318.
40. Kaushansky K, Broudy VC, Harlan JM, Adamson JW. Tumor necrosis factor alpha and tumor necrosis factor beta (Lymphotoxin) stimulate the production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, macrophage colony-stimulating factor and IL-1 in vivo. *J Immunol* 1988;141:3410-3415.
41. Dinarello CA, Gelfand JA, Wolff SM. Anticytokine strategies in the treatment of the systemic inflammatory response syndrome. *JAMA* 1993;269:1829-1835.
42. Haeffner-Cavaillon N, Rousselier N, Ponzio O, e col. Induction of interleukin-1 production in patients undergoing cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1989;98:1100-1106.
43. Antonelli M, Testa G, Tritapepe L, e col. IL-8, IL-6 and ICAM in serum of paediatric patients undergoing cardiopulmonary bypass with and without cardiocirculatory arrest. *J Cardiovasc Surg* 1999;40:803-809.
44. Frering B, Philip I, Dehoux M, e col. Circulating cytokines in patients undergoing normothermic cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1994;108:636-641.



45. Finn A, Naik S, Klein N, e col. Interleukin-8 release and neutrophil degranulation after pediatric cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993;105:234-241.
46. Kawahito K, Kawakami M, Fujiwara T, e col. Interleukin-8 and monocyte chemotactic activating factor responses to cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995;110:99-102.
47. Pober JS, Cotran RS. The role of endothelial cells in inflammation. *Transplantation* 1990;50:537-544.
48. Boldt J, Osmer Ch, Linke LC, e col. Circulating adhesion molecules in pediatric cardiac surgery. *Anesth Analg* 1995; 81:1129-1135.
49. Gillinov AM, Bator JM, Zehr K, e col. Neutrophil adhesion molecule expression during cardiopulmonary bypass with bubble and membrane oxygenators. *Ann Thorac Surg* 1993;56:847-853.
50. Spadafora-Ferreira M, Coelho V, Noronha I, e col. O endotélio vascular na resposta imune. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo* 1996;6(2):146-154.
51. Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 1990;346:425-434.
52. Burns AS, DeGuzman BJ, Newburger JW. P-selectin expression in myocardium of children undergoing cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995;110:924-933.
53. Tönz M, Mihaljevic T, von Segesser LK. Acute lung injury during cardiopulmonary bypass: are the neutrophils responsible? *Chest* 1995;108:1551-1556.
54. Kilbridge PM, Mayer JE, Newburger JW, e col. Induction of intercellular adhesion molecule-1 and E-selectin mRNA in heart and skeletal muscle of pediatric patients

- undergoing cardiopulmonary bypass. *J Thorac and Cardiovasc Surg* 1994;107(5):1183-1192.
55. Cremer J, Martin M, Redl H, e col. Systemic inflammatory response syndrome after cardiac operations. *Ann Thorac Surg* 1996;61:1741-20.
56. Ikemoto Y, Teraguchi M, Takaya J, e col. Plasma levels of nitric oxide products and endothelin in pulmonary hypertension with congenital heart disease. *Acta Paediatr* 1998;87:715-716.
57. Matheis G, Sherman MP, Buckberg GD. Role of L-arginine-nitric oxide pathway in myocardial reoxygenation injury. *Am J Physiol* 1992;262:H616-620.
58. Finkel MS, Oddis CV, Jacob TD, e col. Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide. *Science* 1992;257:387-389.
59. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993;329:2002-2012.
60. Ruvolo G, Greco E, Speziale G, e col. Nitric oxide formation during cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1994;57:1055-1056.
61. Hill GE, Snider S, Galbraith T, e col. Glucocorticoids reduce bronchial epithelial inflammation during cardiopulmonary bypass. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:1791-1795.
62. Vane JR, Änggard EE, Botting RM. Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med* 1990;323(1):27-36.
63. Morris K, Beghetti M, Petros A, Adatia I, Bohn D. Comparison of hyperventilation and inhaled nitric oxide for pulmonary hypertension after repair of congenital heart disease. *Crit Care Med* 2000;28:2974-2978.

64. Bhorade S, Christenson J, O'Connor M, e col. Response to inhaled nitric oxide in patients with acute right heart syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:571-579.
65. Kinsella JP, Abman SH. Inhalational nitric oxide therapy for persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Pediatrics* 1993;91:997-998.
66. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, e col. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988;332:411-415.
67. Levin R. Endothelins. *N Engl J Med* 1995;333:356-363.
68. Krämer BK, Nishida M, Kelly RA, Smith TW. Endothelins: myocardial actions of a new class of cytokines. *Circulation* 1992;85(1):350-356.
69. Giannessi D, Del Ry S, Vitale RL. The role of endothelins and their receptors in heart failure. *Pharmacol Res* 2001;43(2):111-126.
70. Tamamori M, Ito H, Adachi S, e col. Endothelin-3 induces hypertrophy of cardiomyocytes by endothelin-1 mediated mechanism. *J Clin Invest* 1996;97:366-372.
71. Batlouni M. Endotelinas e outros fatores vasoconstritores derivados do endotélio. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo* 1996;6(2):138-145.
72. Frelin C, Guedin D. Why are circulating levels of endothelin-1 so low? *Cardiovasc Res* 1994;28:1613-1622.
73. Mathew V, Hasdai D, Lerman A. The role of endothelin in coronary atherosclerosis. *Mayo Clin Proc* 1996;71:769-777.
74. Vojáček J, Lisý O, Simek S, e col. Local changes in the plasma endothelin level in the coronary artery immediately after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Cardiology* 1997;88:1-5.

75. Kiowski W, Sütsch G, Hunziker P, e col. Evidence for endothelin-1 mediated vasoconstriction in severe chronic heart failure. *Lancet* 1995;346:732-736.
76. Hasdai D, Erez E, Gil-Ad I, e col. Is the heart a source for elevated circulating endothelin levels during aorta-coronary artery bypass grafting surgery in human beings? *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996;112:531-536.
77. Schmeck J, Heller A, Gröschler A, e col. Impact endothelin-1 in endotoxin-induced pulmonary vascular reactions. *Crit Care Med* 2000;28:2851-2857.
78. Koyama H, Tabata T, Nishzawa Y, e col. Plasma endothelin levels in patients with uremia. *Lancet* 1989;33:991-992.
79. Morise Z, Ueda M, Aiura K, e col. Pathophysiologic role of endothelin-1 in renal function in rats with endotoxin shock. *Surgery* 1994;115:199-204.
80. Petrossian E, Parry AJ, Reddy VM, e col. Endothelin receptor blockade prevents the rise in pulmonary vascular resistance after cardiopulmonary bypass in lambs with increased pulmonary blood flow. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999;117:314-323.
81. Curzen NP, Jourdan KB, Mitchell JA. Endothelial modification of pulmonary vascular tone. *Intens Care Med* 1996;22:596-607.
82. Hilwig R, Berg RA, Kern KB, e col. Endothelin-1 vasoconstriction during swine cardiopulmonary resuscitation improves coronary perfusion pressures but worsens postresuscitation outcome. *Circulation* 2000;101:2097-2102.
83. Hasdai D, Holmes D, Garratt KN, e col. Mechanical pressure and stretch release endotheli-1 from human atherosclerotic coronary arteries in vivo. *Circulation* 1997;95:357-362.
84. Cesari M, Pavan E, Sacchetto A, Rossi GP. Endothelin-1: a scientist's curiosity, or a real player in ischemic heart disease? *Am Heart J* 1996;132:1236-1243

85. Miyauchi T, Tomobe Y, Shiba R, e col. Involvement of endothelin in the regulation of human vascular tonus. *Circulation* 1990;81:1874-1880.
86. Haynes WG, Ferro CE, O’Kane K, e col. Systemic endothelin receptor blockade decreases peripheral vascular resistance and blood pressure in man. *Circulation* 1996;93:1860-1870.
87. Kojima T, Isozaki-Fukuda Y, Takedatsu M, e col. Circulating levels of endothelin and atrial natriuretic factor during postnatal life. *Acta Paediatr* 1992;81:676-677.
88. Bando K, Vijayaraghavan P, Turrentine MW, e col. Dynamic changes of endothelin-1, nitric oxide and cyclic GMP in patients with congenital heart disease. *Circulation* 1997;96(II): II-346-II351.
89. . Macdonald PD, Paton RD, Logan RW, e col. Endothelin-1 levels in infants with pulmonary hypertension receiving extracorporeal membrane oxygenation. *J Perinat Med* 1999;27:216-220.
90. Reddy VM, Hendricks-Munoz KD, Rajasinghe H, e col. Post-cardiopulmonary bypass pulmonary hypertension in lambs with increased pulmonary blood flow. A role for endothelin-1. *Circulation* 1997;95:1054-1061.
91. Allen SW, Chatfield BA, Koppenhafer SA, e col. Circulating immunoreactive endothelin-1 in children with pulmonary hypertension. *Am Rev Respir Dis* 1993;148:519-522.
92. Adatia I, Haworth SG. Circulating endothelin in children with congenital heart disease. *Br Heart J* 1993;69:233-236.
93. Antonelli M, Letizia C, Tritapepe L, e col. Extracorporeal circulation does not induce intra-alveolar release of endothelin-1, but only a modest overproduction in pulmonary circulation. *J Cardiovasc Surg* 1999;40:487-494.

94. Hiramatsu T, Imai Y, Takanashi Y, e col. Time course of endothelin-1 and adrenomedullin after the Fontan procedure. *Ann Thorac Surg* 1999;68:169-172.
95. Komai H, Adatia IT, Elliot MJ, e col. Increased plasma levels of endothelin-1 after cardiopulmonary bypass in patients with pulmonary hypertension and congenital heart disease. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993;106:473-8.
96. Knothe C, Boldt J, Schindler E, e col. Endothelin plasma levels during heart surgery: influence on pulmonary artery pressure? *Eur J Cardio-thorac Surg* 1996;10:579-584.
97. Kirshbom PM, Page SO, Jacobs M, e col. Cardiopulmonary bypass and circulatory arrest increase endothelin-1 production and receptor expression in the lung. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1997;113:777-783.
98. Carteaux JP, Roux S, Siaghy M, e col. Acute pulmonary hypertension after cardiopulmonary bypass in pig: the role of endogenous endothelin. *Eur J Cardio-thorac Surg* 1999;15:346-352.
99. Chang H, Wu GJ, Wang SM, e col. Plasma endothelin levels and surgically correctable pulmonary hypertension. *Ann Thorac Surg* 1993;55:450-458.

## **Artigo em Inglês**

## **Endothelin-1 levels in the post-operative period of infants undergoing cardiopulmonary bypass: Correlation with outcome**

Lisiane Dalle Mulle, M.D.; Silvana Molossi Lawrence, M.D., Ph.D; Aline Botta, M.D.; Cláudia Ricachinevsky, M.D.; Aldemir Nogueira, M.D.; Nilton Della Torre, M.D.; Fernando Lucchese, M.D.; Luiz Alfredo Jung, M.D.

From the Divisions of Pediatric Cardiology and Cardiac Surgery and Pediatric Cardiac Intensive Care Unit, Complexo Hospitalar Santa Casa, Porto Alegre, RS, Brazil; and Post-Graduate Programs in Cardiology (LDM, SML, AB) and Pediatrics (SML), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

Address requests for reprints to: Silvana Molossi Lawrence, M.D., Ph.D., Children's Cardiology Associates, 4314 Medical Parkway Suite 200, Austin, TX, 78756. E-mail: [slawrence@cca-austin.com](mailto:slawrence@cca-austin.com)

*Reprints will be ordered.*

Financial support partly provided by FIPE (Hospital de Clinicas de Porto Alegre), and FAPERGS, Porto Alegre, RS, Brazil; and partly provided by personal funds.

**Keywords:** endothelin-1, pediatric heart surgery, inflammatory mediators, congenital heart disease, pediatric critical care, cardiopulmonary bypass



**Abstract**

*Objective:* The use of cardiopulmonary bypass (CPB) elicits an immune-inflammatory cascade, including the release of endothelin-1 (ET-1). The objective of this study was to determine ET-1 levels in infants undergoing cardiac surgery with CPB and correlate them with outcome (discharge or death).

*Design:* Prospective, observational case study.

*Setting:* University hospital, tertiary care referral center.

*Patients:* Thirty-two patients between 1 month and one year of age, admitted to the pediatric cardiac intensive care unit (PICU) following cardiac surgery with CPB. Nine patients had cyanotic heart disease.

*Interventions:* Blood samples were collected from an arterial line at six different time points (TP): 1- induction of anesthesia (baseline), 2- 15 minutes after beginning of CPB, 3- 15 minutes after weaning off CPB, 4- at arrival in PICU, 5- 6 hours after arrival in PICU, 6- 24 hours post-operatively. Endothelin-1 was measured using ELISA after being extracted from stored, frozen plasma. Serum lactate was also measured at all TP.

*Measurements and Main Results:* Levels of ET-1 were increased in all patients at baseline and further enhanced after CPB, being highest at TP 5 ( $p<0.001$ ), and correlated with non-survival ( $p=0.002$ ). Levels remained elevated 24 hours post-operatively. There was also an association between ET-1 and the development of multi-organ system failure ( $p=0.016$ ). A statistical trend was seen when levels in cyanotic and acyanotic patients were analyzed, being ET-1 higher in the latter group ( $p=0.08$ ). Furthermore, a positive correlation was observed between ET-1 and lactate levels at TP 6 ( $r=0.79$ ,  $p<0.05$ ), and also between ET-1 and pulmonary artery pressure (PAP) at TP 4 ( $r=0.64$ ,  $p<0.05$ ).

*Conclusions:* ET-1 levels are increased in infants with congenital heart defects, there is a further increase following CPB, and they are predictive of adverse outcome. Higher levels correlate with increased lactate levels, PAP and, importantly, non-survival in the post-operative period.

## **Introduction**

Pediatric cardiac surgery has developed into an effective and safe therapeutic strategy to correct congenital heart defects in newborns and small infants. This is probably related to several factors, including the development of safe cardiopulmonary bypass (CPB), even in very low weight patients. Nevertheless, the use of extracorporeal circulation elicits an immune-inflammatory reaction that affects all organs and systems (1, 2). A cascade of events follows, leading to activation of leukocytes and endothelial cells and subsequent release of several inflammatory mediators, including cytokines, reactive oxygen species, adhesion molecules, thrombin, eicosanoids and endothelin (ET)-1 (3-6).

Endothelin-1 is the prototype of a family of peptides, consisting of a sequence of 21-aminoacids in its biologically active form and known to be a very powerful vasoconstrictor (7). Formerly believed to be synthesized exclusively by endothelial cells, ET-1 is now known to be released from different cell types, including cardiac myocytes (8). Primarily, it has a function of inducing potent vasoconstrictor effect when bound to ET<sub>A</sub> receptors. It also has mitogenic effects on smooth muscle cells (7, 9).

Increased ET-1 levels have been linked to ischemic heart disease, heart failure, pulmonary hypertension, liver and kidney ischemic-reperfusion injury, and septic shock (10-13). In all cases, elevated ET-1 levels appear to be associated with poor outcome. Cardiopulmonary bypass induces the release of ET-1 and increased levels are seen following cardiac surgery (14, 15). Various studies have also demonstrated increased ET-1 concentrations in plasma of children with congenital heart disease associated with increased pulmonary blood flow and frequently elevated pulmonary artery pressure and resistance (16-18). Furthermore, the interplay between ET-1 and nitric oxide (NO) have been a subject of study by several authors, specifically addressing the possible imbalance in the concentrations of these two vascular mediators as the source of altered vascular tonus (17, 19).

Thus, in the present study, we intended to further unravel the role of ET-1 in infants undergoing heart surgery with CPB for correction of congenital heart defects. Our primary objective was to determine ET-1 levels in the immediate post-operative period and their potential association with outcome. Secondly, to compare ET-1 levels in cyanotic and acyanotic patients.

## **Materials and Methods**

### *Study population*

Patients admitted to the Cardiology Division at Complexo Hospitalar Santa Casa between one month and one year of age, submitted to cardiac surgery with CPB for correction of congenital heart defects, were enrolled in a prospective, observational study during the period of June 1998 and April 1999. Exclusion criteria included patients whose initial proposed surgery was not performed, those who deceased during surgery, and those whose informed consent was not obtained. A total of 32 patients were enrolled in the study. The study protocol was previously approved by the Ethics and Research Committee of Complexo Hospitalar Santa Casa and Hospital de Clinicas de Porto Alegre.

### *Surgical management*

Anesthesia was induced with Fentanyl (10 µg/kg), Midazolam (100-200 µg/kg), and Pancuronium (0.08 mg/kg). Maintenance was done with the same drugs as needed, using Fentanyl and Midazolam in continuous IV infusion. Hydrocortisone (10 mg/kg) was administered at induction of anesthesia and at the beginning of CPB. Conventional CPB was used with one episode of aortic cross-clamping and a single dose of cardioplegia. After heparin (5mg/kg) was given, extracorporeal circulation was instituted at a perfusion flow rate of 2.4 L/m<sup>2</sup>/minute with moderate to deep hypothermia (28°C and 18°C, respectively). Aortic cross-clamp was performed followed by infusion of cold blood cardioplegic solution. The CPB equipment consisted of a nonpulsatile roller pump, Lucchese® (Braile Biomedica, São Paulo, SP, Brasil) 0.25 or 0.50 membrane oxygenator and a Braile® venous cardiotomy reservoir (Braile Biomedica, São Paulo, SP, Brasil). During CPB, the patient's hematocrit level was kept between 19% and 26%. Sodium nitroprusside was infused during the cooling period and discontinued in the rewarming period, when the patient's temperature reached 36°C. During and after the operation, all patients were given packed red blood cells and crystalloid or colloid solution to supplement circulating blood volume. Patients were weaned off bypass and a dopamine solution was initiated at a continuous infusion rate of 5 µg/kg/min. Cefazolin (40 mg/kg) was given as

antibiotic prophylaxis unless the patient was in use of therapeutic antibiotics for any other reason.

#### *Blood sampling*

Blood samples were collected from the arterial line placed in all patients at six different time points (TP): 1) during induction of anesthesia (baseline); 2) 15 minutes after beginning of CPB; 3) 15 minutes after weaning off CPB; 4) at arrival in PICU; 5) 6 hours after arrival in PICU; 6) 24 hours post-operatively. A total of 2 ml of blood was withdrawn at every time point in ethylene diamine tetracetic acid (EDTA) containing vials. The samples were immediately centrifuged and the plasma collected and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until posterior blinded analysis.

#### *Plasma ET-1 and ELISA assay*

Endothelin-1 was initially extracted from stored plasma using acid-ethanol technique (18). ELISA assays were run simultaneously, with samples in duplicate to minimize inter-assay variability. A commercially available ELISA assay for ET-1 was used, with the lower detection limit being a mean of 0.6 pg/ml (0.3 – 0.9 pg/ml) (R&D Systems, Minneapolis, MN).

#### *Variables analyzed*

Variables analyzed in all patients were: age, weight, type of congenital heart defect, CPB and aortic cross clamp time, cooling temperature, use of vasoactive drugs (inotropes, vasodilators), serum lactate levels, development of multiple organ system failure (MOSF), hemodynamic data (mean blood pressure - MBP, central venous pressure - CVP, left atrial pressure - LAP, pulmonary artery pressure - PAP, heart rate - HR, oxygen saturation -  $\text{O}_2\text{sat}$ ), ET-1 levels, and outcome. Multiorgan system failure was defined as failure of two or more organs or systems, such as cardiovascular, respiratory, renal, gastrointestinal, neurological, hematological (as described previously elsewhere) (20).

### *Statistical analysis*

Results are presented as mean  $\pm$  SD for variables with normal distribution. The Student's t test was used to compare quantitative variables between two groups, and the chi square test was applied to compare categorical variables. Analysis of variance (ANOVA) was used to study repeated measures and Pearson's r correlation to study the association between ET-1 levels and other variables. An alpha of 0.05 was considered significant for all variables studied. Data were processed and analyzed using the program Statistics Package for Social Science (SPSS) 8.0.

## **Results**

### *Patient demographics and clinical characteristics*

Thirty-two infants submitted to cardiac surgery with CPB for correction of congenital heart defects were studied. Nineteen (60%) patients were male. The mean age was  $5.8 \pm 2.8$  months and the mean weight was  $5.2 \pm 1.8$  Kg. Twenty-three (72%) patients were acyanotic and 9 (28 %) patients were cyanotic. The different diagnoses in both groups are listed in Table 1. Table 2 displays patients' demographics, type of surgery, outcome and lactate levels individually.

The mean CPB time was  $92.7 \pm 35.3$  minutes, the mean aortic cross-clamp time was  $56.5 \pm 25.1$  minutes, and the mean cooling temperature was  $27.0 \pm 3.0$  °C. All patients used dopamine. In 14 (44%) patients, milrinone was added to dopamine. In 13 (40%) patients, a third vasoactive drug (either an inotrope – adrenaline, isoprenaline; or a vasodilator – nitroprusside, nitroglycerine) was added to dopamine and milrinone. In only 5 (15%) patients was dopamine used as a sole vasoactive drug. Hemodynamic variables are displayed in Table 3.

Nine (28%) patients developed MOSF. From the total of 32 patients, 27 (85%) were discharged home and 5 (15%) died in the post-operative period. Two patients died within 48 hours post-operatively: one following TOF repair (11 mo, 8.9 Kg) from intractable arrhythmia (junctional ectopic tachycardia) leading to RV failure, and another following AVSD repair (2 mo, 2.4 Kg) from pulmonary hypertension leading to low cardiac output syndrome and MSOF. Two patients died following AVSD repair: one (2

mo, 4.5 Kg) 23 days post-operatively and another (4 mo, 2.3 Kg) 34 days post-operatively due to pulmonary hypertension leading to persistent low cardiac output and development of MOSF. Both patients were ventilated for two weeks prior to repair due to intractable heart failure with pulmonary hypertension crisis (episodes with sudden drop in oxygen saturation associated with systemic hypotension that reverted with sedation and hyperventilation). The fifth patient (5 mo, 4 Kg, with Goldenhar syndrome, right renal agenesis and cleft lip/palate) required surgical re-intervention within two weeks post-operatively for atrial patch (superior vena cava syndrome) and left atrioventricular valve (significant insufficiency following primary repair) revision, eventually dying 25 days post-operatively also from persistent low cardiac output, associated with periods of decreased oxygen saturation requiring increase in ventilatory support and development of MOSF.

#### *Plasma levels of ET-1*

The mean ET-1 levels at the different time points are listed in Table 4. These levels were increased in all patients at baseline and further enhanced after CPB, peaking at 6 hours after arrival in PICU (TP 5), with persistent elevation at 24 hours post-operatively (TP 6) ( $p < 0.001$ ) (Fig. 1).

Considering serum lactate levels and plasma concentrations of ET-1, there was no correlation at baseline (TP 1), at arrival in PICU (TP 4) or at 6 hours after arrival in PICU (TP 5). However, there was a strong positive correlation between ET-1 and lactate 24 hours post-operatively (TP 6) ( $r = 0.79$ ,  $p < 0.001$ ) (Fig. 2). Likewise, a positive association was observed between higher ET-1 levels and the development of MOSF ( $p = 0.016$ ).

Analyzing ET-1 levels and hemodynamic variables, a strong positive correlation was demonstrated between ET-1 levels and PAP at arrival in PICU (TP 4) ( $r = 0.64$ ,  $p < 0.05$ ) (Fig. 3A). On the contrary, a negative correlation was observed between ET-1 levels and LAP 15 minutes after coming off bypass (TP 3) ( $r = -0.69$ ,  $p < 0.05$ ) (Fig. 3B). As well, a negative correlation was seen when ET-1 levels were analyzed with  $O_2$ sat at 24 hours post-operatively (TP 6) ( $r = -0.44$ ,  $p < 0.05$ ) (Fig. 3C).

Evaluating ET-1 and outcome using ANOVA, a statistically significant association between higher ET-1 levels and non-survival ( $p = 0.002$ ) was observed in this study. Analyzing the TP individually, the difference was notable in TP 4, 5, and 6 (Fig. 4). When

considering ET-1 levels and the use of vasoactive drugs, the data seemed to relate higher levels with patients who needed dopamine, milrinone and a third drug (specified earlier). Nevertheless, this association did not reach statistical significance ( $p=0.14$ ).

#### *Variables profile in cyanotic and acyanotic patients*

A separate analysis was done comparing acyanotic ( $n=23$ ) and cyanotic ( $n=9$ ) patients. There was no statistically significant difference in ET-1 levels in acyanotic and cyanotic patients at any TP, although a trend could be detected ( $p=0.08$ ) (Fig. 5).

There was also no difference in bypass and aortic cross-clamp time and cooling temperature between acyanotic and cyanotic patients, neither in the outcome of patients in both groups ( $p=0.66$ ). The only statistically significant difference observed between both groups was related to weight. Acyanotic patients had a much lower weight compared to cyanotic patients ( $p=0.001$ ) (Table 5).

## **Discussion**

Although extensive research has been done in the last few years, much remains to be determined on the role of ET-1 and its effects on different systems (21-24). Several investigators have suggested a role for ET-1 in the pathophysiology of pulmonary hypertension; albeit the specific action is difficult to be defined since a variety of different factors alter the vascular structure and response in the lungs (22, 25, 26). Adatia and Haworth (27), for example, did not find an elevation of ET-1 in children with augmented pulmonary blood flow, nor increased excretion of ET-1 in older patients with irreversible pulmonary vascular disease, whereas others had contradictory findings (28, 29).

The data in the current study, taken together, suggest that determination of ET-1 levels in infants submitted to cardiac surgery with CPB may be of value in predicting an adverse outcome in the post-operative period. Moreover, these levels might point out potential complications that further compromise the recovery of these children.

### *Endothelin-1 levels following cardiac surgery*

Several studies have demonstrated an increase in ET-1 following cardiac surgery with CPB (8, 14, 30, 31). In children, specifically, levels of ET-1 have been shown to be elevated in patients with increased pulmonary blood flow and pulmonary hypertension (28, 29). Our data support these findings, since ET-1 levels begin to increase after weaning off CPB, peaking at 6 hours post-operatively, and remaining elevated at 24 hours. The group of patients in this study consisted of infants, therefore a more homogeneous sample than patients previously studied, avoiding conflicting factors such as the neonate with high variability of response in the pulmonary circulation, and older children that may present a less reactive pulmonary vascular bed compared to infants. Moreover, even patients with low pulmonary blood flow (tetralogy of Fallot patients) showed elevation of ET-1 post-CPB, although levels were lower than those observed in patients with elevated pulmonary blood flow (acyanotic patients). Hiramatsu et al. (32) showed increased ET-1 levels post-operatively in patients undergoing Fontan procedure, thus cyanotic patients with low pulmonary blood flow and pulmonary artery pressure, which correlated with increased pulmonary vascular resistance and coincided with lower levels of adrenomedullin, a potent vasodilator peptide.

Another question continues to puzzle investigators: What could it be the origin of ET-1 in these patients? Chang and co-workers (33) showed synchronously elevated plasma ET-1 levels and pulmonary artery pressure in patients with valvular heart disease, and the magnitude of increase in ET-1 levels correlated with the severity of pulmonary hypertension. Both features decreased their measurements soon after surgical correction of the diseased valve in the heart. These authors suggested two explanations for the elevated plasma ET-1 level: 1- caused by an increase in the metabolic rate of endothelial cells in the pulmonary circulation; and 2- caused by flow stasis in the pulmonary circulation after pulmonary venous hypertension.

### Clinical relevance of endothelin-1 and pulmonary hypertension

It remains controversial the actual significance of increased levels of ET-1 and the presence of pulmonary hypertension in children following CPB. Komai and colleagues (28) suggested a predisposition to pulmonary vascular liability and pulmonary hypertensive



crisis in these patients in the post-operative period. We observed, in this study, a positive correlation between ET-1 levels and mean pulmonary artery pressure in patients at arrival in the PICU, and a negative correlation between oxygen saturation and ET-1 levels 24 hours post-operatively. Furthermore, from the five deaths that occurred in this subset of patients, three of them were related to the presence of pulmonary hypertension and they presented high levels of ET-1. Contrarily, Knothe et al. (30) did not find a correlation between high ET-1 levels and increased pulmonary artery pressure in adults in the ICU after surgery with CPB, though these patients with pulmonary hypertension pre-operatively correlated with increased ET-1 levels measured at the beginning and after CPB. Our patients were not submitted to cardiac catheterization before surgery, since no clinical indication existed. Thus, we did not have pre-operative pulmonary artery pressure values to compare to the post-operative period. However, some patients did have clinical presentation of pulmonary hypertension crisis even pre-operatively. Patients in the acyanotic group presented with unrestricted lesions allowing similar ventricular pressures in the right and left sides, as judged by echocardiography, except one patient with ASD and another with mitral valve stenosis. In the latter, pulmonary venous hypertension was likely to be present as judged by the clinical findings of heart failure. The negative correlation observed between ET-1 levels and left atrial pressure 15 minutes after CPB might be related to a transient vasodilatory effect in the systemic vasculature, but such finding did not persist thereafter. No other specific correlation could be established between ET-1 levels and other hemodynamic variables studied.

Many questions regarding the behavior and specific effects of ET-1 related to pulmonary blood flow, pressure and resistance also remain unanswered. Vincent et al. (18), evaluating a cohort of patients during cardiac catheterization that were classified based on the presence or absence of increased pulmonary blood flow, observed increased ET-1 levels in the first group but not necessarily related to increased pulmonary pressure. However, Hiramatsu and co-workers (32) showed increased levels in patients following a Fontan procedure, reflecting a group of patients with low pulmonary blood flow and pressure. In the present study, comparing the ET-1 data in acyanotic and cyanotic patients, the latter displayed lower values specifically during the first 24 hours post-operatively, showing a trend but not a significant difference statistically, perhaps related to a smaller

number of patients in the cyanotic group. Bando and colleagues (17) studied a group of patients, also following cardiac surgery for congenital heart defects, and suggested different pathophysiologic explanations for increased pulmonary pressure in high flow/high pressure patients, including high levels of ET-1, inadequate NO production, and/or impaired responses to NO.

#### *Endothelin-1 and inflammation*

The inflammatory role that ET-1 appears to have in different clinical scenarios continues to be intriguing, since this peptide is known to have mitogenic properties and interact with other inflammatory mediators (7, 10, 12, 34). In this study, a significant association was achieved comparing ET-1 levels and development of MOSF. Furthermore, three of the five patients who eventually died developed MOSF associated with persistent low output syndrome and/or pulmonary hypertension. Similarly, a strong positive correlation was observed analyzing ET-1 levels and lactate levels 24 hours post-operatively. Our group and others have demonstrated high lactate values related to poor outcome in infants following congenital heart surgery (35-38). It is conceivable to suspect that not only can the pulmonary vasculature be affected by ET-1, but also this peptide may have broader effects in other systems contributing to unleashed inflammatory cascade and leading to poor clinical outcome in such patients. McGowan Jr et al. (39) have demonstrated elevated ET-1 levels in neonates following arterial switch repair for transposition of the great arteries. Also, by isolating blood-perfused neonatal pig hearts, these authors showed vasoconstrictor effects in coronary arteries due to both ET-1 and ET-1 associated with norepinephrine, which were counteracted by nitroglycerine. These findings suggested ET-1 as a factor inducing coronary vasoconstriction following CPB in patients undergoing arterial switch operations, and the potential benefit for the use of nitroglycerine in the post-operative period.

Plotting the data on ET-1 values with outcome, a significant association between higher levels of ET-1 and non-survival was appreciated. To our knowledge, this is the first time increased circulating ET-1 has been linked to outcome in children following cardiac surgery for congenital heart defects. While the exact mechanism by which ET-1 might have contributed to this finding has not been elucidated, and this constitutes a limitation in

our study, the knowledge of the data presented may enlighten possible venues for future investigations. The importance of that being related to disclosure of better ways to treat our patients and, perhaps, avoid untoward interactions translated into clinical syndromes. Clearly, ET-1 has a biological role in these patients with increased circulating levels. Gianessi and co-workers (40) demonstrated high density of endothelin binding sites (receptors) in the hearts of infants and children. Bando et al. (41) published interesting data regarding the use of modified (dilutional) ultrafiltration following cardiac surgery in children and its effect on removing ET-1 from the circulating blood volume, consequently decreasing the pulmonary/systemic pressure ratio post-operatively and representing a possible adjunct to prevent pulmonary hypertension after cardiac surgery. Experimental studies have been addressing the use of endothelin receptor blockers or antagonists to minimize ET-1 vasoconstrictor and/or inflammatory effects and this may be, in the near future, another tool available to decrease the effects of ischemia/reperfusion injury, to treat heart failure, and to manipulate the pulmonary vascular reactivity in the post-operative period of children with congenital heart defects (42-44).

#### *Limitations of the present study*

The limited number of patients bearing cyanotic lesions may have prevented statistical power to determine a difference in ET-1 behavior compared to acyanotic lesions. The association between ET-1 levels and NO-related molecules expression was not investigated in this study. Thus, we cannot comment on the dynamics of these molecules together in this setting. Neither can we discuss on the effect of exogenously administered NO to patients presenting with pulmonary hypertension in the post-operative period, since this resource was not available in our service at the time the investigation was conducted. Mortality was very high in this subset of patients, although three had Down's syndrome and another had Goldenhar syndrome and multiple associated malformations, who presented with failure to thrive and intractable heart failure, requiring mechanical ventilation prior to AVSD repair. These undoubtedly constitute a challenging group of patients to manage.

**Conclusions**

The data presented is consistent with increased ET-1 levels following cardiac surgery with CPB in infants with congenital heart defects. The elevation in circulating ET-1 correlated with non-survival in these patients. Acyanotic patients seemed to have higher levels compared to cyanotic patients. The outlined study contributes to the understanding of ET-1 role in the post-operative period of children submitted to cardiac surgery. The specific pathway by which ET-1 exerts its effects remains to be determined.

**Acknowledgements**

We are very thankful to Dr. Jarbas Oliveira for helpful assistance in the laboratory, to Dr. Mário Wagner for statistical guidance, and to Dr. Nadine Clausell for thoughtful comments and review of the manuscript.

## References

1. Shafique T, Sellke FW, Thurer RL, et al: Cardiopulmonary bypass and pulmonary thromboxane generation. *Ann Thorac Surg* 1993; 55:724-728
2. Downing SW, Edmunds Jr LH: Release of vasoactive substances during cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1992; 54:1236-1243
3. Levy JH, Kelly AB: Inflammation and cardiopulmonary bypass. *Can J Anaesth* 1993; 40:1009-1015
4. Hashimoto K, Miyamoto H, Suzuki K, et al: Evidence of organ damage after cardiopulmonary bypass. The role of elastase and vasoactive mediators. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1992; 104:666-673
5. Millar AB, Armstrong L, van der Linden, et al: Cytokine production and hemofiltration in children undergoing cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1993; 56:1499-1502
6. Finn A, Naik S, Klein N, et al: Interleukin-8 release and neutrophil degranulation after pediatric cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993; 105:234-241
7. Cesari M, Pavan E, Sacchetto A, et al: Endothelin-1: A Scientist's curiosity, or a real player in ischemic heart disease? *Am Heart J* 1996; 132:1236-1243
8. Hasdai D, Erez E, Gil-Ad I, et al: Is the heart a source for elevated circulating endothelin levels during aorta-coronary artery bypass grafting surgery in human beings? *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996; 112:531-536
9. Hasdai D, Holmes Jr. DR, Garratt KN, et al: Mechanical pressure and stretch release endothelin-1 from human atherosclerotic coronary arteries *in vivo*. *Circulation* 1997; 95:357-362
10. Mathew V, Hasdai D, Lerman A: The role of endothelin in coronary atherosclerosis. *Mayo Clin Proc* 1996; 71:769-777
11. Lerman A, Kubo SH, Tschumperlin LK, et al: Plasma endothelin concentrations in humans with end-stage heart failure and after heart transplantation. *J Am Coll Cardiol* 1992; 20:849-853
12. Brauner JS, Rohde LE, Clausell N: Circulating endothelin-1 and tumor necrosis factor- $\alpha$ : Early predictors of mortality in patients with septic shock. *Intensive Care Med* 2000; 26:305-313

13. Black SM, Bekker JM, Johengen MJ, et al: Altered regulation of the ET-1 cascade in lambs with increased pulmonary blood flow and pulmonary hypertension. *Pediatr Res* 2000; 47:97-106
14. Hynynen M, Saijonmaa O, Tikkanen I, et al: Increased plasma endothelin immunoreactivity during cardiopulmonary bypass: A preliminary observation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1992; 103:1024-1025
15. Lundblad R, Moen O, Fosse E: Endothelin-1 and neutrophil activation during heparin-coated cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1997; 63:1361-1367
16. Ishikawa S, Miyauchi T, Sakai S, et al: Elevated levels of plasma endothelin-1 in young patients with pulmonary hypertension caused by congenital heart disease are decreased after successful surgical repair. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995; 110:272-273
17. Bando K, Vijayaraghavan P, Turrentine MW, et al: Dynamic changes of endothelin-1, nitric oxide, and cyclic GMP in patients with congenital heart disease. *Circulation* 1997; 96[suppl II]:II-346-II-351
18. Vincent JA, Ross RD, Kassab J, et al: Relation of elevated plasma endothelin in congenital heart disease to increased pulmonary blood flow. *Am J Cardiol* 1993; 71:1204-1207
19. Christou H, Adatia I, Van Marter LJ, et al: Effect of inhaled nitric oxide on endothelin-1 and cyclic guanosine 5'-monophosphate plasma concentrations in newborn infants with persistent pulmonary hypertension. *J Pediatr* 1997; 130(4):603-611
20. Wilkinson JD, Pollack MM, Glass NL, et al: Mortality associated with multiple organ system failure and sepsis in the pediatric intensive care unit. *J Pediatr* 1987; 111:324-328
21. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, et al: A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988; 332:411-415
22. Allen SW, Chatfield BA, Koppenhafer SA, et al: Circulating immunoreactive endothelin-1 in children with pulmonary hypertension. *Am Rev Resp Dis* 1993; 148:519-522
23. Randall MD. Vascular activities of the endothelins. *Pharmacol Ther* 1991; 50:73-93

24. Yang Z, Richard V, von Segesser L, et al: Threshold concentrations of endothelin-1 potentiate contractions to norepinephrine and serotonin in human arteries. *Circulation* 1990; 82:188-195
25. Vijay P, Szekely L, Sharp TG, et al: Adrenomedullin in patients at high risk for pulmonary hypertension. *Ann Thorac Surg* 1998; 66:500-505
26. Rabinovitch M: Pathophysiology of pulmonary hypertension. *In: Allen HD, Gutgesell HP, Clark EB, Driscoll DJ (Eds). Moss and Adams' Heart disease in infants, children, and adolescents. Sixth Edition. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2001, pp 1311-1346*
27. Adataia I, Haworth SG: Circulating endothelin in children with congenital heart disease. *Br Heart J* 1993; 69:233-236
28. Komai H, Adataia IT, Elliott MJ, et al: Increased plasma levels of endothelin-1 after cardiopulmonary bypass in patients with pulmonary hypertension and congenital heart disease. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993; 106:473-478
29. Hiramatsu T, Imai Y, Takanashi Y, et al: Time course of endothelin-1 and nitrate anion levels after cardiopulmonary bypass in congenital heart defects. *Ann Thorac Surg* 1997; 63:648-652
30. Knothe C, Boldt J, Schindler E, et al: Endothelin plasma levels during heart surgery: Influence on pulmonary artery pressure? *Eur J Cardio-thorac Surg* 1996; 10:579-584
31. Kirshbom PM, Page SO, Jacobs MT, et al: Cardiopulmonary bypass and circulatory arrest increase endothelin-1 production and receptor expression in the lung. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1997; 113:777-783
32. Hiramatsu T, Imai Y, Takanashi Y, et al: Time course of endothelin-1 and adrenomedullin after the Fontan procedure. *Ann Thorac Surg* 1999; 68:169-172
33. Chang H, Wu GJ, Wang SM, et al: Plasma endothelin levels and surgically correctable pulmonary hypertension. *Ann Thorac Surg* 1993; 55:450-458
34. Matsumori A, Sasayama S: The role of inflammatory mediators in the failing heart: Immunomodulation of cytokines in experimental models of heart failure. *Heart Fail Rev* 2001; 6(2):129-136

35. Dalle Mulle L, Ricachinevsky C, Santos C, et al: Serum lactate positively correlates with outcome in pediatric heart surgery. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31(5-Suppl C):342C
36. Hatherill M, McIntyre AG, Wattie M, et al: Early hyperlactatemia in critically ill children. *Intensive Care Med* 2000; 26(3):314-318
37. Siegel LB, Dalton HJ, Hertzog JH, et al: Initial post-operative serum lactate levels predict survival in children after open-heart surgery. *Intensive Care Med* 1996; 22:1418-1423
38. Charpie JR, Dekeon MK, Goldberg CS, et al: Serial blood lactate measurements predict early outcome after neonatal repair or palliation for complex congenital heart disease. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000; 120:73-80
39. McGowan Jr FX, Davis PJ, Siewers RD, et al: Coronary vasoconstriction mediated by endothelin-1 in neonates. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995; 109:88-98
40. Giannessi D, Del Ry S, Andreassi, M: High density of endothelin binding sites in the hearts of infants and children. *Life Sci* 1999; 64(8):697-705
41. Bando K, Vijay P, Turrentine MW, et al: Dilutional and modified ultrafiltration reduces pulmonary hypertension after operations for congenital heart disease: A prospective, randomized study. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998; 115:517-527
42. Hiramatsu T, Forbess J, Miura T, et al: Effects of endothelin-1 and endothelin-A receptor antagonist on recovery after hypothermic cardioplegic ischemia in neonatal lamb hearts. *Circulation* 1995; 92(suppl II):II-400-404
43. Petrossian E, Parry AJ, Reddy VM, et al: Endothelin receptor blockade prevents the rise in pulmonary vascular resistance after cardiopulmonary bypass in lambs with increased pulmonary blood flow. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999; 117:314-323
44. Berger R, Stanek B, Hulsmann M, et al: Effects of endothelin a receptor blockade on endothelial function in patients with chronic heart failure. *Circulation* 2001; 103(7):981-986



**Figure Legends**

**Figure 1** - Endothelin-1 (ET-1) values are shown at the different time points. Levels begin to increase during surgery and persist elevated at 24 hours post-operatively ( $p<0.001$ ).

**Figure 2** – Pearson's correlation between endothelin-1 (ET-1) and lactate levels is shown in different time points. A: induction of anesthesia (time point (TP) 1); B: at arrival in PICU (TP 4); C: 6 hours after arrival in PICU (TP 5); D: 24 hours post-operatively (TP 6), positive correlation <sup>a</sup>( $r=0.79$ ,  $p<0.001$ ).

**Figure 3** – Correlation between endothelin-1 (ET<sub>1</sub>) levels and hemodynamic variables. A: Positive correlation between ET-1 levels and PAP at arrival in PICU ( $r=0.64$ ,  $p<0.05$ ); B: Negative correlation between ET-1 levels and LAP at 15min after weaning off bypass ( $r=-0.69$ ,  $p<0.05$ ); C: Negative correlation between ET-1 levels and Sat O<sub>2</sub> at 24h post-operatively ( $r=-0.44$ ,  $p<0.05$ ).

**Figure 4** – Endothelin-1 (ET-1) levels according to outcome are depicted. Non-survivors presented higher values for ET-1 than survivors ( $p=0.002$ ).

**Figure 5** - Endothelin-1 levels in cyanotic and acyanotic patients. Acyanotic patients presented higher ET-1 levels, however not statistically significant ( $p=0.08$ ).

## Tables

**Table 1** - Diagnoses of congenital heart defects

Congenital Heart Defect		n (%)
Acyanotic	Atrioventricular Septal Defect	14 (60,9%)
	Ventricular Septal Defect	7 (30,4%)
	Atrial Septal Defect	1 (4,3%)
	Mitral Valve Stenosis	1 (4,3%)
Cyanotic	Tetralogy of Fallot	7 (77,8%)
	Truncus Arteriosus	1 (11,1%)
	Transposition of the Great Arteries	1 (11,1%)

n: number of patients

**Table 2** - Patients demographics

Diagnosis	Sex	Age (months)	Weight (kg)	Type of Surgery	Outcome	Lactate (mmol/L) mean
TOF	M	11	6,5	TC	Discharge	2,2
AVSD	M	2	4,5	TC	Death	2,1
AVSD	M	7	3,6	TC	Discharge	1,6
AVSD + PS	M	5	4	TC	Death	1,4
TOF	F	11	8,9	TC	Death	1,9
VSD + CoAo	M	7	6,2	TC	Discharge	2,5
MVS	F	7	5,5	TC	Discharge	1,4
VSD	M	5	4	TC	Discharge	1,7
TOF	F	9	8,4	TC	Discharge	2,6
Truncus type II	F	1	3,5	TC	Discharge	3,4
AVSD	F	6	4,4	TC	Discharge	1,3
AVSD	M	6	4,3	TC	Discharge	1,7
TOF	F	8	9,2	TC	Discharge	1,3
TOF	M	8	8,3	TC	Discharge	1,2
AVSD	F	5	4,5	TC	Discharge	3,1
TOF	M	8	8,7	TC	Discharge	1,8
VSD + PDA	F	3	4,0	TC	Discharge	2,4
ASD	M	10	6,9	TC	Discharge	1,1
AVSD	F	10	5,4	TC	Discharge	2,8
AVSD	M	1,5	3	TC	Discharge	1,6
TGA	M	1,4	3,3	TC	Discharge	2,4
AVSD	M	5	5,2	TC	Discharge	3,4
AVSD	M	2	2,4	TC	Death	8,7
AVSD	F	4	2,7	TC	Death	2,5
AVSD	M	5	4,9	TC	Discharge	2,2
TOF	F	9	5,7	TC	Discharge	1,6
VSD	M	5	5	TC	Discharge	1,4
AVSD	M	7	5,8	TC	Discharge	2,4
VSD	M	6	3,8	TC	Discharge	1,1
VSD	F	4	4,1	TC	Discharge	1,6
AVSD	F	4	5,7	TC	Discharge	1,7
VSD	M	4	4,4	TC	Discharge	1,3

TOF: tetralogy of Fallot, AVSD: atrioventricular septal defect, PS: pulmonary stenosis, VSD: ventricular septal defect, CoAo: Coarctation of the Aorta, MVS: mitral valve stenosis, ASD: atrial septal defect, PDA: persistent ductus arteriosus, M: masculine, F: feminine, TC: total correction.

**Table 3** - Hemodynamic variables

Time Point	MBP (mmHg)	CVP (mmHg)	LAP (mmHg)	PAP (mmHg)	HR (bpm)	O <sub>2</sub> sat (%)
1	63 ± 16	6 ± 4			134 ± 16	93 ± 9
3	57 ± 13	6 ± 3	9 ± 5	20 ± 7	152 ± 18	97 ± 3
4	62 ± 14	9 ± 5	11 ± 5	21 ± 6	145 ± 16	95 ± 4
5	69 ± 13	11 ± 5	11 ± 4	22 ± 7	142 ± 23	94 ± 4
6	65 ± 16	12 ± 5	12 ± 2	20 ± 6	145 ± 27	93 ± 4

Values are expressed as mean ± SD.

MBP: mean blood pressure; CVP: central venous pressure; LAP: left atrial pressure;

PAP: pulmonary artery pressure; HR: heart rate; bpm: beats per minute; O<sub>2</sub> sat: oxygen saturation.

**Table 4** - Endothelin-1 serum levels at different time points

		ET-1
Time Point 1	(induction of anesthesia)	1,55 ± 0,93
Time Point 2	(15 min after beginning of CPB)	1,89 ± 0,82
Time Point 3	(15 min after weaning off CPB)	2,70 ± 0,98
Time Point 4	(at arrival in PICU)	3,34 ± 2,40
Time Point 5	(6h after arrival in cardiac PICU)	3,58 ± 2,12
Time Point 6	(24h post-operatively)	2,61 ± 2,29

Values are expressed as mean ± SD

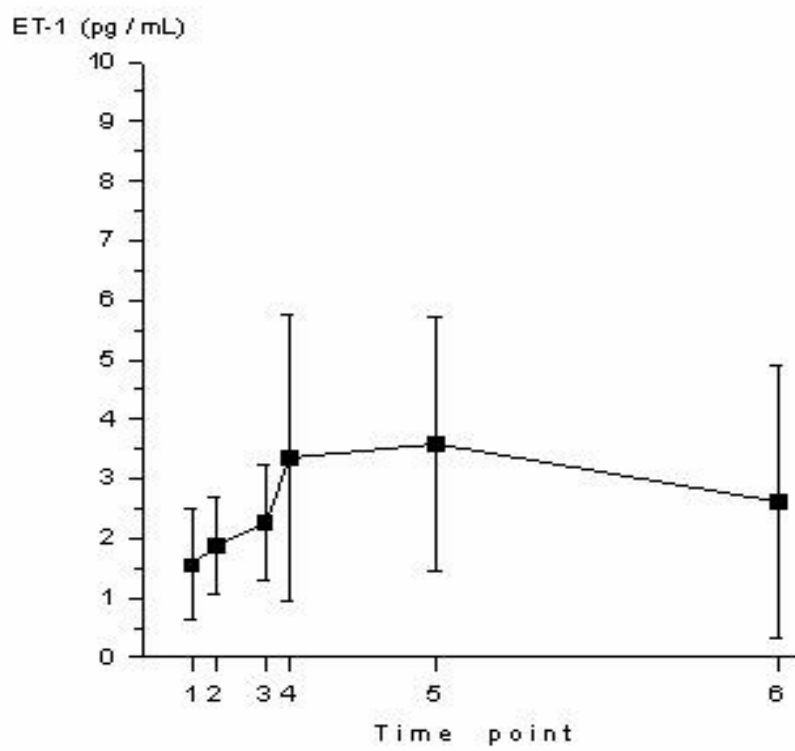
ET-1: endothelin-1; CPB: cardiopulmonary bypass; PICU: pediatric intensive care unit.

**Table 5** – Comparison of data between acyanotic and cyanotic patients

	Acyanotic	Cyanotic
n (32)	23	9
Weight (Kg)	4,54	7,0 *
Age (months)	7,39	5,24
Gender		
Male	15	4
Female	8	5
MOSF	7 (30%)	2 (22%)
Death	4 (17%)	1 (11%)
Lactate 1	1,81 ± 0,69	2,86 ± 1,54
Lactate 4	2,72 ± 1,40	2,23 ± 0,88
Lactate 5	2,25 ± 1,97	1,62 ± 0,53
Lactate 6	2,14 ± 3,17	1,69 ± 0,96
ET-1 time point 1	1,64 ± 1,05	1,30 ± 0,43
ET-1 time point 2	2,03 ± 0,86	1,53 ± 0,60
ET-1 time point 3	2,33 ± 0,97	2,13 ± 1,06
ET-1 time point 4	3,83 ± 2,65	2,08 ± 0,72
ET-1 time point 5	3,83 ± 2,36	2,89 ± 1,19
ET-1 time point 6	2,67 ± 2,66	2,40 ± 0,95

n: number of patients; MOSF: multiple organ system failure; ET-1: endothelin-1.

\*p = 0.001



**Figure 1**

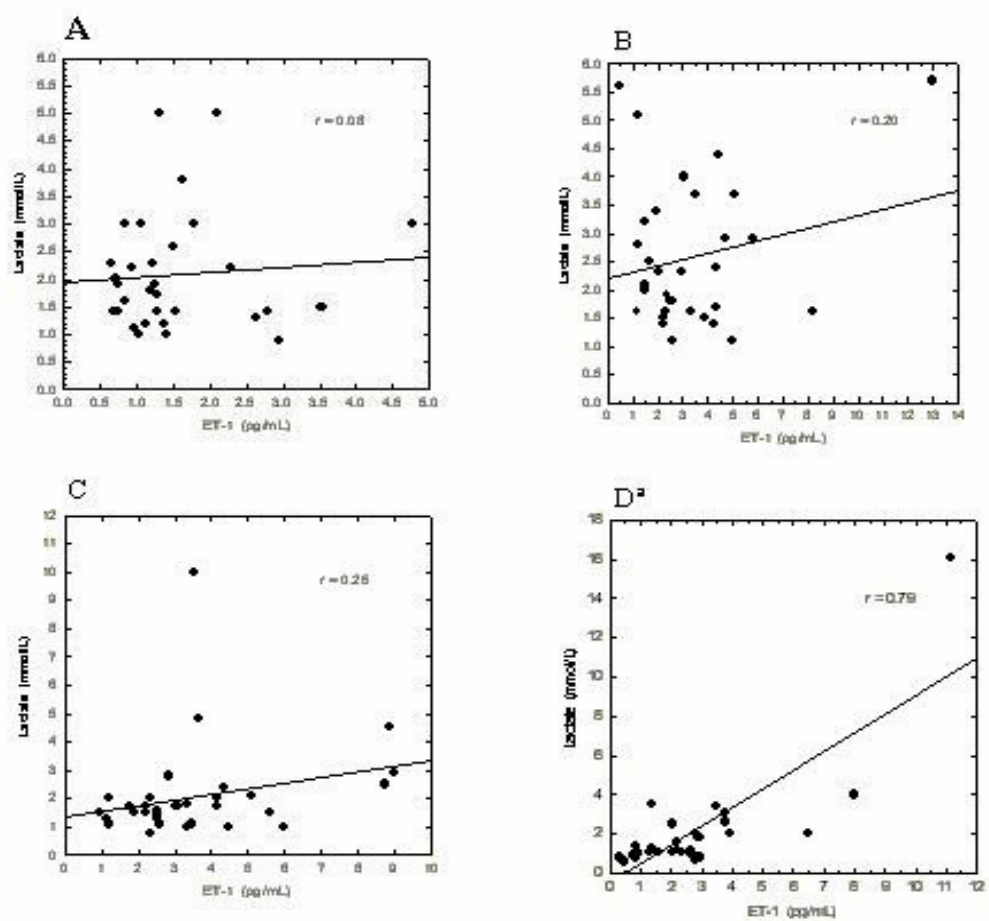


Figure 2



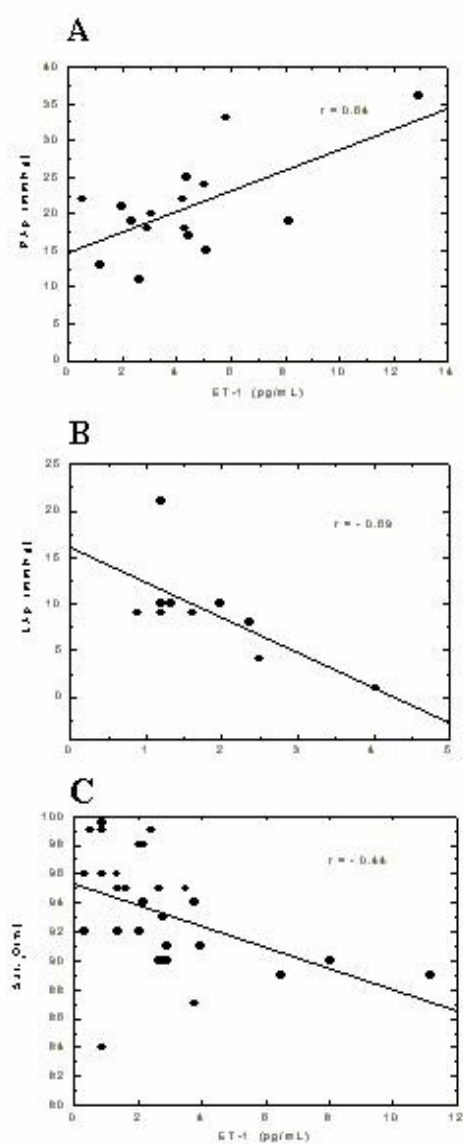
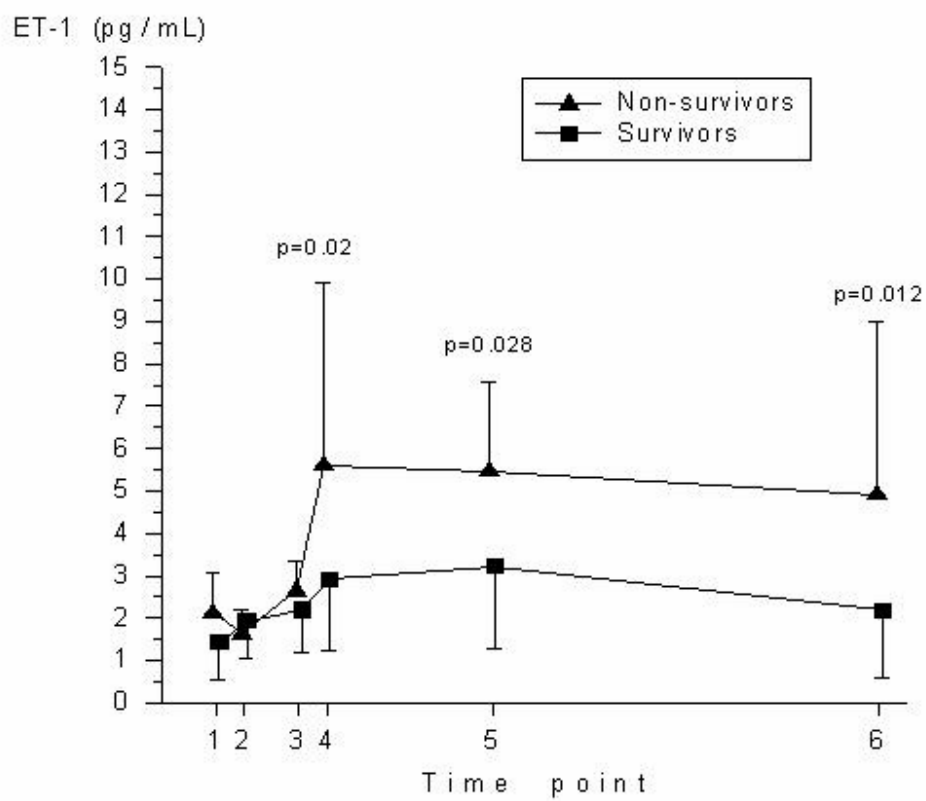
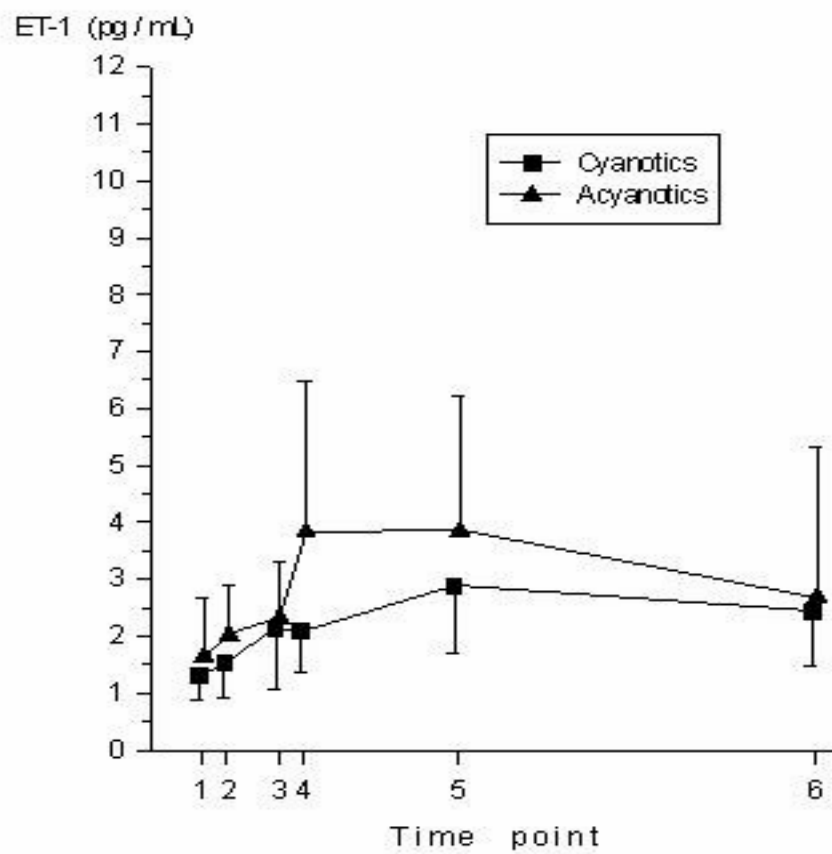


Figure 3

**Figure 4**

**Figure 5**