ANITA ROTTER

Avaliação dos níveis plasmáticos e urinários do fator de crescimento do endotélio vascular e dos níveis urinários das metaloproteinases 2 e 9 em pacientes com hemangioma infantil antes e durante o tratamento com betabloqueador sistêmico e tópico

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

Programa de Dermatologia

Orientadora: Profa. Dra. Zilda Najjar Prado de Oliveira

São Paulo

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Rotter, Anita

Avaliação dos níveis plasmáticos e urinários do fator de crescimento do endotélio vascular e dos níveis urinários das metaloproteinases 2 e 9 em pacientes com hemangioma infantil antes e durante o tratamento com betabloqueador sistêmico e tópico / Anita Rotter. -- São Paulo, 2017.

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

Programa de Dermatologia.

Orientadora: Zilda Najjar Prado de Oliveira.

Descritores: 1.Hemangioma 2.Crianças 3.Fator de crescimento do endotélio vascular
4.Metaloproteinase 2 da matriz 5.Metaloproteinase 9 da matriz 6.Ultrassonografia

USP/FM/DBD-402/17

Dedicatória

**Aos meus avôs Ester e Baruch Rubinstein,
Hinda e Szmul Rotter.**

**Dedico esta pesquisa a eles, minhas primeiras
referências familiares, exemplos de vida e
superação.**

**Cada qual com sua história, dificuldades e
conquistas, me mostraram que, a partir de valores
verdadeiros, com garra e coragem, tudo é possível!**

Agradecimentos

À minha família, meus maiores exemplos de dedicação, trabalho, e cuidado ao próximo. Obrigada por terem me ensinado valores para a vida, por me apoiarem e me incentivarem a alcançar sempre mais.

Aos meus queridos amigos, presentes em todos os momentos da minha vida, obrigada pelo apoio e carinho.

Aos meus professores e amigos da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, a minha segunda casa por 12 anos, por me ensinarem a ser médica e estimularem a busca constante do conhecimento.

Ao Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo por acreditarem na minha pesquisa e possibilitarem o desenvolvimento desse projeto.

Aos residentes, por atenderem os pacientes e deles cuidarem e, muitas vezes, me ajudarem com essa pesquisa.

À Sandra Maria da Silva, da equipe de enfermagem da Dermatologia do HC-FMUSP, por sua ajuda com o cuidado dos pacientes e familiares.

À equipe do laboratório Central, por me auxiliarem com as coletas.

À equipe do LIM-03, Dra. Leila Antonangelo e Lia Marçal e, em especial à Carolina Silvério Faria, por sua constante disponibilidade e cuidado com o material do meu estudo, muito obrigada.

Ao pessoal do LIM-56, Dra. Maria Notomi Sato e Thiago de O. Titz, pelo acolhimento cuidadoso no laboratório e por me ensinarem a manusear o material e armazená-lo.

Ao Henry Dan Kyomoto, pelos ensinamentos de estatística, pela paciência, e valiosa ajuda na minha pesquisa.

Aos secretários, Marcelo e Rute, por me orientarem e cuidarem de todos os prazos.

Ao Amadeu e Rosângela, por fazerem sempre o melhor para os pacientes.

Aos componentes da banca de qualificação, pelas brilhantes sugestões no sentido de aprimorar esse trabalho.

Às Dras. Maria Cecília Rivitti Machado e Luciana de Paula Samorano, pela amizade e parceria.

Ao Dr. Marcio Bouer, pela realização dos exames de imagem e por permitir que, com isso, pudéssemos oferecer o melhor tratamento e acompanhamento aos nossos pacientes.

À minha orientadora, professora, médica e amiga, Dra. Zilda Najjar Prado de Oliveira, pelo incentivo, dedicação, paciência e, principalmente, por seu exemplo como médica e pessoa, muito obrigada por todos esses anos de convivência.

Aos pacientes e seus familiares, pela confiança e colaboração. Durante cinco anos, essas crianças foram a principal motivação para a realização dessa pesquisa. Acompanhar esses doentes e compartilhar sua felicidade durante o sucesso do tratamento foi uma experiência encantadora.

Às oportunidades que a vida me ofereceu e à sorte que tive em conhecer pessoas especiais no meu caminho.

À FUNADERSP, Fundo de Apoio à Dermatologia de São Paulo – Sebastião Sampaio e Sociedade Brasileira de Dermatologia – Regional do Estado de São Paulo, pelo auxílio financeiro e por tornar possível a concretização dessa pesquisa.

Ao CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela bolsa de doutorado concedida pelas Cotas do Programa de Pós-Graduação.

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria Fazanelli Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3^a ed. – São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação - DBD/FMUSP, 2011.

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

Sumário

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e símbolos

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Abstract

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Revisão da literatura.....	8
1.1.1 Patogênese do hemangioma infantil.....	8
1.1.2 Fator de crescimento do endotélio vascular	10
1.1.3 Metaloproteinases.....	13
1.1.4 Mecanismo de ação do betabloqueador	14
1.1.5 O exame de ultrassonografia no seguimento do hemangioma infantil.....	19
2 OBJETIVOS	22
3 CASUÍSTICA E MÉTODOS	25
3.1 Casuística	26
3.1.1 Critérios de inclusão	27
3.1.2 Critérios de exclusão	27
3.1.3 Dados clínicos dos pacientes com hemangioma infantil	28
3.1.4 Grupos de pacientes segundo o tratamento instituído	29
3.1.5 Descrição da casuística	31
3.2 Métodos	35
3.2.1 Ultrassonografia	35
3.2.2 Coletas de amostras de sangue e urina	36
3.2.3 Técnica de análise de biomarcadores	37
3.3 Análise estatística.....	40
4 RESULTADOS	42
4.1 Determinação dos níveis plasmáticos e urinários de VEGF e dos níveis urinários de MMP-2 e MMP-9 em pacientes com HI e em crianças saudáveis (controles)	44

4.2	Determinação dos níveis plasmáticos e urinários de VEGF e dos níveis urinários de MMP-9 antes do tratamento com propranolol e timolol em pacientes com HI com menos de 12 meses (fase proliferativa) e com mais de 12 meses de idade (fase de involução)	47
4.3	Correlação entre os níveis plasmáticos e urinários de VEGF e níveis urinários de MMP-9 antes do início do tratamento com o tamanho do HI	50
4.4	Correlação entre os níveis plasmáticos e urinários de VEGF e níveis urinários de MMP-9 dos pacientes com HI antes do início do tratamento.....	52
4.5	Avaliação do tamanho (volume obtido pela ultrassonografia) dos HIs de pacientes antes e durante o tratamento com propranolol e timolol	54
4.6	Resultados da avaliação dos níveis plasmáticos de VEGF dos pacientes com HI antes e durante o tratamento com propranolol e timolol	59
4.7	Resultados da avaliação dos níveis urinários de VEGF dos pacientes com HI antes e durante o tratamento com propranolol e timolol	62
4.8	Resultados da avaliação dos níveis urinários de MMP-9 dos pacientes com HI antes e durante o tratamento com propranolol e timolol	65
5	DISCUSSÃO	68
5.1	Hemangioma infantil e controles saudáveis	70
5.2	Fases de crescimento do hemangioma infantil	73
5.2.1	Níveis plasmáticos e urinários de VEGF e níveis urinários de MMP-9	73
5.3	Correlação entre o tamanho (volume) do hemangioma infantil e níveis plasmáticos e urinários de VEGF e níveis urinários MMP-9	75
5.4	Correlação entre os níveis plasmáticos e urinários de VEGF e níveis urinários de MMP-9 antes do início do tratamento.....	76
5.5	Volume do hemangioma infantil, obtido pela ultrassonografia, antes e durante o tratamento com propranolol e timolol	77
5.6	Níveis plasmáticos e urinários de VEGF e níveis urinários de MMP-9 antes e durante o tratamento com propranolol	79
5.7	Níveis plasmáticos e urinários de VEGF e níveis urinários de MMP-9 antes e durante o tratamento com timolol.....	84
5.8	Considerações finais.....	85
6	CONCLUSÕES	87

7 REFERÊNCIAS	90
8 ANEXOS.....	102
Anexo 1 - Carta de Aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq- 042/2012) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo	103
Anexo 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	104
Anexo 3 - Dados do grupo controle	110
Anexo 4 - Dados dos pacientes com hemangioma infantil tratados com timolol.....	111
Anexo 5 - Dados dos pacientes com hemangioma infantil tratados com propranolol	112
9 APÊNDICES.....	114
Apêndice 1 - Publicação: Rotter A, Samorano LP, Labinas GHO, Alvarenga JG, Rivitti-Machado MC, Bouer M, Santos PCC, Silvestre DAM, Oliveira ZNP. Ultrasonography as an objective tool for assessment of infantile hemangioma treatment with propranolol. International Journal of Dermatology. 2016;76(2):190-194	115
Apêndice 2 - Trabalho aceito para publicação. Rotter A, et al. Infantile hemangioma: pathogenesis and propranolol mechanisms of action. JDDG – Journal of the German Society of Dermatology	120

Listas

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%:	por cento
<:	menor que
>:	maior que
≤:	menor ou igual
=:	igual a
°C:	Graus Celsius
μL:	Microlitro
bFGF:	Fator básico de crescimento de fibroblastos
CaPPesq:	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CD:	<i>cluster differentiation</i>
cm ³ :	centímetro cúbico
DP:	Desvio padrão
EDTA:	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA:	Ensaio Imunoenzimático (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
et al.:	e outros
HC-FMUSP:	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HI:	Hemangioma infantil ou hemangioma da Infância
HI:	Hemangiomas infantis
HIF-1α:	Fator induzido pela hipóxia 1 alfa
IQ:	Intervalo interquartil
IL:	<i>Illinois</i>
INRAD :	Instituto de Radiologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
kDa:	kilodalton
Kg:	quilograma
LAE:	Laboratório de Análises Especiais
LIM/03:	Laboratório de Investigação Médica 03
Me:	mediana
mg:	miligrama
MHz:	mega-hertz

mL:	mililitro
mm:	milímetro
MMP-2:	Metaloproteinase 2
MMP-9:	Metaloproteinase 9
n:	tamanho da amostra
PCR:	<i>polimerase chain reaction</i>
pg:	Picograma
rpm:	rotações por minuto
RNAm:	Ácido ribonucleico mensageiro
SPSS:	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TIMP-1:	Inibidor tecidual das metaloproteinases 1
USA:	United States of America
VEGF:	Fator de crescimento do endotélio vascular
VEGFR-1:	Receptor do fator de crescimento do endotélio vascular – 1
VEGFR-2:	Receptor do fator de crescimento do endotélio vascular – 2
xMAP:	<i>multiple analyte profiling</i>

FIGURAS

Figura 1 -	Esquema ilustrativo das fases de crescimento do hemangioma infantil	2
Figura 2 -	Célula tronco do hemangioma infantil diferenciando-se em pericito, célula endotelial e adipócito. VEGF: fator de crescimento do endotélio vascular	9
Figura 3 -	Esquema do mecanismo de ação do betabloqueador no tratamento do hemangioma infantil. VEGF: fator de crescimento do endotélio vascular, bFGF: fator básico de crescimento de fibroblastos, MMP-2 e 9: metaloproteinase 2 e 9	15
Figura 4 -	Classificação do hemangioma infantil de acordo com a apresentação clínica	28
Figura 5 -	Esquema ilustrativo do ensaio Luminex®. VEGF: fator de crescimento do endotélio vascular, MMP-2 e 9: metaloproteinase 2 e 9	38
Figura 6 -	Etapas de análise dos biomarcadores do ensaio Luminex®	39
Figura 7 -	Determinação dos níveis plasmáticos e urinários de VEGF e dos níveis urinários de MMP-9 em pacientes com hemangioma infantil (HI) e em crianças saudáveis (controles). a. Dosagem plasmática de VEGF em controles (n=25) e pacientes com HI (n=67); b. Dosagem urinária de VEGF em controles (n=16) e pacientes com HI (n=45); c. Dosagem urinária de MMP-9 em controles (n=16) e pacientes com HI (n=55)	46
Figura 8 -	Determinação dos níveis plasmáticos e urinários de VEGF e urinários de MMP-9 antes do tratamento com propranolol e timolol em pacientes com hemangioma infantil (HI) com menos de 12 meses e com mais de 12 meses de idade. a. Dosagem plasmática de VEGF em pacientes com HI com menos de 12 meses (n=50) e com mais de 12 meses de idade (n=17); b. Dosagem urinária de VEGF em pacientes com HI com menos de 12 meses (n=35) e com mais de 12 meses de idade (n=10); c. Dosagem urinária de MMP-9 em pacientes com HI com menos de 12 meses (n=43) e com mais de 12 meses de idade (n=12)	49

- Figura 9 -** Correlação entre os níveis plasmáticos e urinários de VEGF e níveis urinários de MMP-9 antes do início do tratamento e o tamanho do HI. a. volume do hemangioma e VEGF plasmático, b. volume do hemangioma e VEGF urinário, c. volume do hemangioma e MMP-9 urinária51
- Figura 10 -** Correlação entre os níveis plasmáticos e urinários de VEGF e urinários de MMP-9 antes do tratamento. a. VEGF plasmático e VEGF urinário, b. VEGF plasmático e MMP-9 urinária, c. VEGF urinário e MMP-9 urinária53
- Figura 11 -** Fotografia e ultrassonografia de paciente do sexo feminino com hemangioma em região nasal. a. antes do início do tratamento (Volume: 1,2 cm³) e b. após 6 meses de tratamento com propranolol (Volume: 0,3 cm³)54
- Figura 12 -** Avaliação do tamanho do HI no grupo tratado com propranolol e no grupo tratado com timolol e o estudo da variação do tamanho do HI antes e durante o tratamento. a. Análise não pareada, grupo tratado com propranolol: volume antes (n= 36), até 6 meses (n=17), de 7 a 12 meses (n=21); grupo tratado com timolol, volume antes (n= 22), até 6 meses (n=10), de 7 a 12 meses (n=7). Teste Kruskal-Wallis. b. Análise pareada, grupo tratado com propranolol (n=8), grupo tratado com timolol (n=5). Teste Wilcoxon signed-rank, # p≤0,05.57
- Figura 13 -** Determinação dos níveis plasmáticos de VEGF de pacientes com HI antes e durante o tratamento com propranolol e timolol. a. Análise não pareada, grupo tratado com propranolol: VEGF plasmático antes (n= 44), até 6 meses (n=19), de 7 a 12 meses (n=27); grupo tratado com timolol: VEGF plasmático antes (n= 23), até 6 meses (n=11), de 7 a 12 meses (n=8). Teste Kruskal-Wallis. b. Análise pareada, grupo tratado com propranolol (n=13), grupo tratado com timolol (n=6). Teste Wilcoxon signed-rank, # p≤0,05.60
- Figura 14 -** Determinação dos níveis urinários de VEGF de pacientes com HI antes e durante o tratamento com propranolol e timolol. a. Análise não pareada, grupo tratado com propranolol: VEGF urinário antes (n= 28), até 6 meses (n=16), de 7 a 12 meses (n=21); grupo tratado com timolol, VEGF urinário antes (n= 17), até 6 meses (n=9), de 7 a 12 meses (n=7). Teste de Kruskal-Wallis. b. Análise pareada, grupo tratado com propranolol (n=7), grupo tratado com timolol (n=4). Teste Friedman, # p≤0,05.63

Figura 15 - Determinação dos níveis urinários de MMP-9 de pacientes com HI antes e durante o tratamento com propranolol e timolol. a. Análise não pareada, grupo tratado com propranolol: MMP-9 urinária antes (n=35), até 6 meses (n=20), de 7 a 12 meses (n=23); grupo tratado com timolol, MMP-9 urinária antes (n=20), até 6 meses (n=9), de 7 a 12 meses de tratamento (n=8). Teste Kruskal-Wallis. b. Análise pareada, grupo tratado com propranolol (n=9), grupo tratado com timolol (n=5). Teste Wilcoxon signed-rank, # $p \leq 0,05$66

TABELAS

Tabela 1 -	Dados demográficos dos pacientes com hemangioma infantil.....	32
Tabela 2 -	Características do hemangioma infantil de cada paciente.....	33
Tabela 3 -	Localização dos hemangiomas infantis	34
Tabela 4 -	Níveis plasmáticos e urinários de VEGF e níveis urinários de MMP-9 em pacientes com hemangioma infantil e controles.....	45
Tabela 5 -	Níveis plasmáticos e urinários de VEGF e níveis urinários de MMP-9 antes do tratamento com propranolol e timolol em pacientes com hemangioma infantil com menos de 12 meses e com mais de 12 meses de idade.....	48
Tabela 6 -	Medidas de volume do hemangioma infantil nos pacientes tratados com propranolol e timolol (grupos não pareados).....	58
Tabela 7 -	Medidas de volume do hemangioma infantil nos pacientes tratados com propranolol e timolol (grupos pareados).....	58
Tabela 8 -	Níveis plasmáticos de VEGF dos pacientes com hemangioma infantil antes e durante o tratamento com propranolol e timolol (grupos não pareados)	61
Tabela 9 -	Níveis plasmáticos de VEGF dos pacientes com hemangioma infantil antes e durante o tratamento com propranolol e timolol (grupos pareados)	61
Tabela 10 -	Níveis urinários de VEGF dos pacientes com hemangioma infantil antes e durante o tratamento com propranolol e timolol (grupos não pareados)	64
Tabela 11 -	Níveis urinários de VEGF dos pacientes com hemangioma infantil antes e durante o tratamento com propranolol e timolol (grupos pareados)	64
Tabela 12 -	Níveis urinários de MMP-9 dos pacientes com hemangioma infantil antes e durante o tratamento com propranolol e timolol (grupos não pareados)	67

Tabela 13 - Níveis urinários de MMP-9 dos pacientes com hemangioma infantil antes e durante o tratamento com propranolol e timolol (grupos pareados)	67
---	----

Resumo

Rotter A. *Avaliação dos níveis plasmáticos e urinários do fator de crescimento do endotélio vascular e dos níveis urinários das metaloproteinases 2 e 9 em pacientes com hemangioma infantil antes e durante o tratamento com betabloqueador sistêmico e tópico* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

INTRODUÇÃO: Fatores angiogênicos têm sido estudados em relação ao seu papel na patogênese do hemangioma da infância (HI). Durante o tratamento com betabloqueador, os pacientes com HI são acompanhados por exame físico e comparações por fotografia e ultrassonografia. Além disso, a dosagem sanguínea e urinária do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e a dosagem urinária das metaloproteinases 2 e 9 (MMP-2 e 9) podem ser ferramentas não invasivas para o acompanhamento evolutivo e terapêutico do HI. **OBJETIVOS:** Estudar os níveis de VEGF plasmático e urinário e MMP-2 e MMP-9 urinárias em pacientes com HI, com o objetivo de avaliar sua possível relação na angiogênese do HI. **MÉTODOS:** foram incluídos 68 pacientes com hemangioma infantil e 25 controles, pareados por idade e sexo. Foi instituído tratamento sistêmico com propranolol em 45 crianças e tópico, com timolol, em 23. Os pacientes foram acompanhados por até 12 meses de tratamento com medidas de volume do HI pela ultrassonografia, dosagem plasmática e urinária de VEGF e dosagem urinária de MMP-2 e MMP-9 (ensaio Luminex). **RESULTADOS:** Os níveis de MMP-2 foram indetectáveis em mais de 50% das amostras. Antes do início do tratamento, não houve diferença dos níveis plasmáticos e urinários de VEGF e urinários de MMP-9 entre os grupos de pacientes com HI e controles. Não foi encontrada diferença significativa nos níveis plasmáticos e urinários dos biomarcadores de acordo com a fase de crescimento do hemangioma (crianças com 12 meses ou menos, em relação às maiores que 12 meses de idade). Não houve correlação entre o tamanho do HI e os níveis dos biomarcadores. Obteve-se correlação significativa entre os níveis urinários de VEGF e MMP-9. No grupo tratado com propranolol, observou-se diminuição significativa do volume do HI com o tratamento, o que não foi verificado no grupo tratado com timolol. A variação dos valores dos biomarcadores obtidas antes, até seis meses e de sete a doze meses de tratamento, mostrou redução significativa de VEGF plasmático e MMP-9 urinária nas crianças tratadas com propranolol. Não foi observada variação significativa dos níveis dos biomarcadores durante o tratamento com timolol. **CONCLUSÕES:** os níveis plasmáticos e urinários de VEGF e os níveis urinários de MMP-9 não se mostraram bons marcadores de angiogênese aumentada nos pacientes com HI, nem tampouco refletiram o aumento da angiogênese característica da fase proliferativa do HI. No acompanhamento terapêutico dos HIs tratados com propranolol, a medida dos níveis dos biomarcadores mostrou diminuição significativa de VEGF plasmático e MMP-9 urinária, o que não foi observado com o timolol. A redução do volume do HI associada à diminuição dos biomarcadores nos pacientes tratados com propranolol sugeriu que o mecanismo de ação do betabloqueador nos HIs seja também por inibição da angiogênese. Desse modo, as dosagens de VEGF plasmático e MMP-9 urinária podem ser úteis para monitorar a efetividade do tratamento.

Descritores: hemangioma; criança; propranolol; timolol; fator de crescimento do endotélio vascular; metaloproteinase 2; metaloproteinase 9; ultrassonografia.

Abstract

Rotter A. *Evaluation of plasma and urinary levels of endothelial growth factor and urinary levels of matrix metalloproteinases 2 and 9 in infantile hemangioma patients before and during systemic and topical β -blocker treatment*. [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2017.

INTRODUCTION: Angiogenic factors have been studied in regard to their role in the pathogenesis of infantile hemangioma (IH). During β -blocker treatment, patients were monitored through physical examination and comparisons by photography and ultrasonography. In addition, plasma and urinary levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) and urinary levels of matrix metalloproteinases 2 and 9 (MMP-2 and MMP-9) can be non-invasive tools to monitor the evolution of IH and its therapeutic follow-up. **OBJECTIVES:** To study plasma and urinary levels of VEGF and urinary levels of MMP-2 and MMP-9 in patients with IH, in order to evaluate their potential relation to the IH angiogenesis. **METHODS:** 68 IH patients and 25 controls were included, matched by age and gender. Systemic treatment with propranolol was administered to 45 patients, while topical timolol was administered to 23 patients. Patients were monitored for up to 12 months of treatment with measurements of IH volume through ultrasonography, plasma and urinary levels of VEGF and urinary levels of MMP-2 and MMP-9 (Luminex assays). **RESULTS:** MMP-2 levels were not detectable in over 50% of the samples. Before treatment, there was no difference in plasma and urinary levels of VEGF and urinary levels of MMP-9 between IH patients and control group. There was no significant difference in plasma and urinary levels for the biomarkers in accordance to the proliferative phase (12-month-old children or younger, in relation to children over 12 months of age). There was no correlation between IH size and biomarkers levels. There was a significant correlation between urinary levels of VEGF and MMP-9. In the propranolol group, a significant reduction of the IH volume with treatment was observed; this was not observed in the group treated with timolol. The variation of the biomarkers values obtained before, up to six months and from seven to twelve months of treatment indicated significant decrease in plasma levels of VEGF and urinary levels of MMP-9 in children treated with propranolol. It was not observed a significant variation of the biomarkers levels during timolol treatment. **CONCLUSIONS:** Plasma and urinary levels of VEGF and urinary levels of MMP-9 were not good markers of increased angiogenesis in patients with IH, nor reflected the increase in angiogenesis characteristic of the proliferative phase of IH. During therapeutic monitoring of IH treated with propranolol, a significant decrease in plasma VEGF and urinary MMP-9 levels was observed. The reduction in volume associated to the decrease in biomarkers in patients treated with propranolol suggested that its mechanism of action in IH occurs also through the inhibition of the angiogenesis. Thus, measurements of plasma levels of VEGF and urinary levels of MMP-9 may be useful to monitor the effectiveness of treatment.

Descriptors: hemangioma; child; propranolol; timolol; vascular endothelial growth factor; matrix metalloproteinase 2; matrix metalloproteinase 9; ultrasonography

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

O hemangioma infantil (HI) é o tumor benigno mais frequente da infância, ocorrendo em 4 a 10% das crianças. A incidência é maior no sexo feminino, na etnia branca, em prematuros com baixo peso ao nascer e em gêmeos ⁽¹⁻⁵⁾. Localiza-se preferencialmente na face e no pescoço (80% dos casos), e, a seguir, no tronco e nas extremidades ⁽⁴⁾. Geralmente não está presente ao nascimento, embora possa existir lesão precursora que se apresenta como mácula telangiectásica ou eritematosa em 30 a 50% dos hemangiomas infantis (HIs) ⁽³⁾.

Após poucas semanas de vida, inicia-se uma fase proliferativa de crescimento rápido do HI, que ocorre até os 8 a 12 meses de idade ⁽⁶⁾. Geralmente a evolução é benigna, apresentando uma fase de involução lenta até sua regressão, que ocorre entre os 5 e 10 anos de idade ⁽⁷⁾ (Figura 1).

Figura 1 - Esquema ilustrativo das fases de crescimento do hemangioma infantil

A regressão é espontânea em 85 a 90% dos HIs. Na maioria dos casos se opta apenas pelo tratamento tópico, sendo que, atualmente, o tratamento sistêmico é reservado para indicações bem específicas.

Desse modo, em 10 a 15% dos HIs, deve-se instituir tratamento sistêmico rapidamente: em hemangiomas que podem ser desfigurantes; em HIs com potencial risco de levar a sequelas funcionais ou nos HIs que ocasionem risco à vida por obstrução de vias aéreas ⁽⁸⁾. Hemangiomas da infância que levam a complicações também devem ser tratados por via sistêmica. Nesse quesito se enquadra a ulceração que pode ocorrer no HI, que pode levar a sangramento, dor intensa e ocasionar desfiguração da região. Potenciais complicações funcionais e implicações estéticas permanentes também podem ser observadas em hemangiomas considerados de risco, como os segmentares ou de grandes dimensões na face (região periocular, nariz, lábio), pavilhão auricular, região perineal, além das áreas de dobras e mama ⁽⁹⁻¹¹⁾. Os HIs do nariz podem ocasionar obstrução nasal e, quando localizados na ponta nasal, têm alto risco de provocar desfiguração permanente (“nariz de Cyrano”). Na região do lábio, podem ulcerar, desfigurar a área e impedir a ingesta adequada de alimento. HIs localizados nas orelhas e região pré e retroauricular podem ulcerar, desfigurar o local, comprometer a audição e a parótida. HIs localizados na região da “barba” podem estar associados à obstrução de vias aéreas. Já os da região perineal e axilar têm maior risco de ulcerar e provocar desfiguração.

A patogênese do HI ainda não está completamente esclarecida. Estudos referem que, na fase proliferativa do HI, há um desequilíbrio dos fatores angiogênicos, com aumento do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), do fator básico de crescimento de fibroblastos (bFGF) e das metaloproteinases 2 e 9 (MMP-2 e MMP-9) ⁽¹²⁻¹⁵⁾. Já na fase de regressão, há a diminuição desses marcadores, associada ao aumento de fatores antiangiogênicos, como o inibidor tecidual das metaloproteinases -1 (TIMP-1) ^(16, 17).

O VEGF é um dos mais potentes fatores angiogênicos, sendo capaz de estimular as células progenitoras endoteliais a formar novos vasos capilares. O aumento da expressão do VEGF ocorre devido a estímulo adrenérgico e à hipóxia, esta última sendo identificada como um dos fatores predisponentes para o desenvolvimento do hemangioma infantil. Como consequência, há produção do fator induzido pela hipóxia 1 alfa (HIF-1 α), que estimula a produção de VEGF pelas células tronco do HI, e posterior difusão para o tecido adjacente ⁽¹⁸⁾. A seguir, ocorre proliferação de células endoteliais do hemangioma e estímulo para a síntese de proteinases (metaloproteinases) envolvidas na reorganização da matriz extracelular.

Existem, na literatura, poucos estudos que demonstram o aumento dos níveis sanguíneos de VEGF em pacientes com HI ^(17, 19-22). Em todos eles, se utiliza o ensaio imunoenzimático (teste ELISA) para análise de citocinas. Recentemente, novos métodos foram desenvolvidos para a análise de citocinas, tais como as plataformas de imunoensaio múltiplas (MULTIPLEX). Estes ensaios se mostraram mais sensíveis que o método de

ELISA. Têm também a vantagem de permitir a análise de citocinas em alíquotas menores e com leitura simultânea de diferentes citocinas do mesmo material ^(23, 24). Não há estudos, até o momento, que utilizem esta técnica na dosagem de VEGF e MMPs em crianças com HI.

O VEGF também pode estar aumentado em outras doenças, como câncer de intestino, pulmão e cérebro, em adultos, e tumores sólidos em crianças ⁽²⁵⁻²⁷⁾.

As MMPs são uma família de proteinases solúveis envolvidas na degradação da matriz extracelular. Atuam na proliferação, migração e adesão das células ⁽²⁸⁾. Níveis aumentados de MMP-2 e 9 são encontrados em amostras teciduais, sanguíneas e urinárias de crianças com HI em fase proliferativa ^(17, 29). Há evidências de que a expressão de MMP-2 e de MMP-9 seja regulada por receptores β -adrenérgicos ⁽³⁰⁾. Estudos prévios demonstram a presença de MMP-2 e MMP-9 em urina de crianças saudáveis, como consequência da remodelação tecidual normal, relacionada ao crescimento. Sua presença não é observada em adultos saudáveis, porém, há aumento da MMP urinária em pacientes com câncer e metástases ^(28, 31).

Além dos novos conhecimentos da patogênese do HI, houve, também, grandes avanços na terapêutica desta afecção na última década. Antes de 2008, os hemangiomas que poderiam levar a complicações clínicas eram tratados com corticosteróides sistêmicos em altas doses, vincristina, interferon e ciclofosfamida. Essas medicações apresentavam várias restrições de uso e efeitos colaterais graves ^(11, 32). Em 2008, Léauté-

Labrèze et al. ⁽³³⁾ descreveram o uso do propranolol para o tratamento do HI e, desde então, essa medicação é referida como a de primeira escolha. Diversos estudos, publicados posteriormente, relatam melhora clínica superior e mais rápida com o uso do betabloqueador sistêmico quando comparado ao corticóide sistêmico ⁽³⁴⁻³⁶⁾. A segurança para se utilizar propranolol na infância advém da indicação deste medicamento, desde 1964, para o tratamento de doenças cardíacas nessa faixa etária ^(37, 38).

Em 2010, a partir da observação do sucesso na resposta ao tratamento do HI com propranolol, iniciou-se o uso de betabloqueador tópico, timolol 0,5% em solução oftálmica, para o tratamento dos HIs em que não houvesse indicação de tratamento sistêmico ^(39, 40).

São vários os mecanismos de ação do betabloqueador no tratamento do HI. A vasoconstrição, que o betabloqueador provoca, leva à diminuição do aporte sanguíneo para a lesão, devido à ação em receptores beta-adrenérgicos presentes nas células endoteliais do HI. Clinicamente, isto se traduz por atenuação tanto da coloração como da consistência à palpação. Os betabloqueadores, também, inibem a angiogênese, através da diminuição da expressão de VEGF, do bFGF e das MMP-2 e 9. Por fim, induzem apoptose das células endoteliais do hemangioma infantil ^(13, 15, 41-43).

Quanto aos efeitos colaterais do tratamento com propranolol, há poucas descrições de efeitos graves e nenhum relato de morte. Como eventos adversos principais, são descritos broncoespasmo, hipoglicemia e alterações do sono ⁽⁴⁴⁻⁴⁶⁾. A dose recomendada varia de 1 a 3 mg/kg/dia. A avaliação necessária antes de se instituir a terapêutica consta de

investigação cardiológica clínica e eletrocardiograma ⁽⁴⁷⁾. A duração do tratamento é baseada no período de crescimento do hemangioma; portanto, quando a medicação é iniciada nos primeiros meses de vida, a terapêutica é mantida em média por 12 a 15 meses. O tratamento é contraindicado em crianças que apresentem bloqueios cardíacos, doenças do nó sinusal, hipotensão, bradicardia e broncoespasmo ^(1, 48). Em relação ao timolol tópico, não há relatos de efeitos colaterais e de contraindicações ao seu uso ^(40, 49-51).

Embora a redução do HI, até seu completo desaparecimento, seja bem documentada durante o tratamento com propranolol, a experiência de alguns autores indica a possibilidade de recorrência e crescimento do tumor após a suspensão da terapêutica ⁽⁵²⁾. Acredita-se que, nesses casos, possa ter havido retirada precoce da medicação, ainda na fase proliferativa, principalmente, em HI com componente profundo e do tipo segmentar ⁽⁵³⁾. Assim sendo, a determinação da duração do tratamento depende das características intrínsecas e da evolução clínica de cada HI. Desta forma, suspende-se o tratamento quando não houver mais redução da lesão na vigência do uso da medicação.

Durante o tratamento do HI com betabloqueador, os pacientes devem ser acompanhados por meio do exame físico, observando-se a diminuição da lesão clinicamente e utilizando-se comparações obtidas por imagens fotográficas. Medidas mais precisas podem ser obtidas através da mensuração do volume da lesão pelo estudo ultrassonográfico, e da intensidade de sua vascularização por meio do doppler ⁽⁵⁴⁻⁵⁷⁾. Além dos

critérios clínicos, fotográficos e ultrassonográficos, o acompanhamento do tratamento do HI com betabloqueadores pode ser conduzido de maneira ainda mais acurada.

Novas possibilidades são estudadas, utilizando-se métodos laboratoriais objetivos para avaliar tanto a evolução do HI, como a resposta ao tratamento, tais como a dosagem sanguínea e urinária de VEGF, e a dosagem urinária de MMP-2 e MMP-9. Os valores obtidos podem refletir as fases de crescimento do HI e, portanto, ter relação com sua evolução. Dessa forma, podem ser ferramentas não invasivas e simples para o acompanhamento evolutivo e terapêutico do HI, além de auxiliarem na tomada de decisão a respeito do melhor momento para a interrupção do tratamento.

1.1 Revisão da literatura

1.1.1 Patogênese do hemangioma infantil

A patogênese do HI não é completamente esclarecida. Postula-se que a formação do HI se inicia pela proliferação de células endoteliais imaturas, provenientes da medula óssea e placenta, que são estimuladas por fatores angiogênicos. Citocinas e fatores de crescimento atuam nas células endoteliais e induzem a formação de uma rede capilar. As citocinas mais estudadas, envolvidas com a formação do HI são: VEGF, b-FGF,

MMP-2 e 9, fator de crescimento semelhante à insulina ⁽⁵⁸⁾, osteoprotegerina ⁽⁵⁹⁾ e enzima conversora de angiotensina ⁽⁶⁰⁾.

A detecção de marcadores de células tronco no HI introduziu o conceito de que essas células são capazes de originar três tipos celulares: endoteliais, pericitos e adipócitos ⁽⁶¹⁾. Além disso, a célula tronco (*stem cell*) do hemangioma secreta o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF). As células provenientes da célula tronco do HI, como o pericito, diferencia-se em adipócito na fase de involução. Já o pericito e a célula endotelial do hemangioma secretam fator de crescimento do endotélio vascular e metaloproteinases (Figura 2).

Figura 2 - Célula tronco do hemangioma infantil diferenciando-se em pericito, célula endotelial e adipócito. VEGF: fator de crescimento do endotélio vascular. Adaptado de Boscolo et al. 2009 ⁽¹⁴⁾

As células progenitoras endoteliais são um tipo de células tronco com marcadores de superfície CD 133 e CD 34, que migram da medula óssea e placenta para o sangue periférico, e são capazes de promover neovascularização na fase proliferativa do HI ⁽⁶²⁾. Foi constatado um

aumento de 15 vezes dos marcadores CD 133 e CD 34 circulantes em crianças com HI ⁽⁶³⁾. A presença de células progenitoras endoteliais sugere a origem primitiva do HI. O estudo do endotélio no HI proliferativo mostra a expressão de marcadores do mesoderma primitivo (vimentina, CD-29)⁽⁶⁴⁾. Yu et al. propõem que esta população de células mesenquimais progenitoras dá origem ao tecido fibroadiposo que se forma durante a involução espontânea do HI ⁽⁶¹⁾.

Em revisão sobre a biologia do HI, Itinteang et al. ⁽¹³⁾ lançam a teoria da ocorrência, no feto, de embolia placentária precoce de células primitivas. Estas, devido ao ambiente pós-natal que lhes é propício, se proliferam. Em seguida, por ação do VEGF, as células primitivas se diferenciam em células endoteliais, com o desenvolvimento do hemangioma.

O entendimento do mecanismo de formação vascular do HI é um ponto fundamental para o desenvolvimento de novas drogas e estratégias de tratamento.

1.1.2 Fator de crescimento do endotélio vascular

O fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) é uma proteína que está implicada na proliferação e permeabilidade vascular ⁽⁶⁵⁾. Trata-se de um dos mais potentes fatores angiogênicos produzido por diferentes células, tais como células endoteliais, macrófagos, plaquetas e células tumorais. Dentre suas ações, estimula a migração das células do endotélio

vascular, a proliferação e formação de novos vasos e inibe a apoptose celular ⁽⁶⁶⁾.

Durante o desenvolvimento fetal, o microambiente parece ser um fator importante para a formação vascular. A hipóxia leva à produção de HIF-1 α , que induz à transcrição genética de VEGF. Este estimula a proliferação e migração de células progenitoras endoteliais, levando à formação dos novos vasos ^(17, 62).

A expressão de VEGF pode ser detectada em amostras de tecido, sangue e urina. Diversos estudos demonstram maior expressão de VEGF durante a fase proliferativa do HI. Já na fase de involução, há maior expressão de TIMP-1 e menor expressão de VEGF ^(62, 67, 68).

O estudo por *hibridização in situ* das células endoteliais do HI durante a fase proliferativa mostra expressão aumentada de VEGF e bFGF, ao contrário do observado durante a fase involutiva, que revela menor expressão desses marcadores ⁽⁶⁹⁾.

Marler et al. ⁽¹⁶⁾, em 2005, estudam os níveis urinários de VEGF e bFGF em 217 pacientes (57 com HI e 160 com malformações vasculares) e 74 controles. Realizam ELISA para avaliar os níveis de bFGF e VEGF. Não são observadas diferenças significativas em relação aos níveis urinários de VEGF nos diferentes grupos. Nos pacientes com tumor vascular, os valores de bFGF apresentam níveis maiores de acordo com a extensão e atividade do tumor.

Zhang et al. ⁽²⁰⁾, em 2005, estudam os níveis circulantes de VEGF em amostras de sangue utilizando a técnica de ELISA em 59 pacientes com HI

proliferativo, 39 com HI em involução, 18 com malformação vascular e 12 controles saudáveis. Verificam que os níveis séricos de VEGF são maiores em HI proliferativos em relação aos HI em involução, malformações vasculares e controles.

Przewratil et al. ⁽¹⁹⁾, em 2010, determinam os níveis de VEGF em amostras de sangue periférico e da lesão de 52 crianças com HI e de 14 com malformações vasculares. Comparam tais dados com a dosagem no sangue periférico de 36 controles. Os resultados dos níveis séricos de VEGF obtidos por ELISA são comparados entre os grupos. A concentração sérica de VEGF nas crianças com HI proliferativos é significativamente maior que a encontrada nos pacientes com HI involutivos, com malformações vasculares, e nos controles. Não há correlação com o tamanho do HI e idade da criança. Observam, também, níveis menores de VEGF nas amostras coletadas diretamente do tumor, quando comparadas com as obtidas do sangue periférico. Concluem que, diferentemente dos HI, o aumento de VEGF no sangue periférico não é evidenciado nos indivíduos portadores de malformações vasculares e em indivíduos saudáveis.

A dosagem de VEGF, além da sua aplicabilidade no HI, pode ser também utilizada no acompanhamento de pacientes com determinados tipos de câncer (de cólon, reto, pulmão, mama, ovário, rim e fígado e no glioblastoma, em adultos, além de tumores sólidos em crianças) ⁽²⁶⁾. Observam-se valores aumentados de VEGF nesses doentes, o que tem sido considerado um fator preditivo do estágio em que se encontra o tumor, bem como um indicador de sobrevida ⁽²⁵⁻²⁷⁾.

1.1.3 Metaloproteinases

As metaloproteinases são proteinases responsáveis pela degradação da matriz extracelular e pela neovascularização. Estão associadas a vários processos fisiológicos, que incluem remodelamento tecidual, processos inflamatórios, doenças neoplásicas e vasculares ^(28, 31). Podem-se avaliar os níveis de metaloproteinases em amostras de tecido, sangue e urina.

A MMP-2 (gelatinase A, 72 kDa) e a MMP-9 (gelatinase B, 92 kDa) degradam colágeno da membrana basal. Em condições fisiológicas, a atividade das MMPs é regulada pela inibição de TIMPs ⁽⁶⁵⁾.

As metaloproteinases são secretadas pelas células tumorais e estão relacionadas à angiogênese. A progressão da angiogênese depende do remodelamento da matriz extracelular que delimita os espaços teciduais ao redor dos vasos. As metaloproteinases degradam componentes da matriz extracelular, o que permite a formação de novos vasos ⁽³¹⁾.

Diversos estudos mostram que a hipóxia leva a aumento de VEGF, o que ocasiona aumento dos níveis de MMPs e redução dos níveis do TIMP-1 ⁽⁷⁰⁾. Considera-se que a formação da rede vascular do HI seja resultado da proliferação de células progenitoras endoteliais. O VEGF estimularia a proliferação dessas células e a MMP-9 as mobilizaria da medula óssea ⁽⁶²⁾. A partir desse raciocínio, pode-se formular a hipótese de que um tratamento que fosse capaz de modular a expressão de VEGF e MMP-9 poderia ser uma opção para prevenir o crescimento e proliferação do HI.

Kleinman et al. ⁽¹⁷⁾, em 2007, estudam a relação de mediadores de células progenitoras endoteliais com tumores vasculares. Dez crianças com HI proliferativo e dez controles são incluídos no estudo. Os autores dosam VEGF e MMP-9 pela técnica de ELISA em amostras sanguíneas. Analisam, também, MMP-9, VEGF e HIF-1 α em amostras de tecido por imunohistoquímica. Os autores demonstram níveis aumentados destes marcadores em crianças com HI, tanto no plasma como no tecido.

1.1.4 Mecanismo de ação do betabloqueador

O propranolol é um bloqueador do receptor beta adrenérgico não cardiosseletivo. O seu mecanismo de ação, no tratamento do HI, ainda não está totalmente elucidado. As catecolaminas, adrenalina e noradrenalina, interagem com receptores adrenérgicos beta 1 (localizados no coração e rins) e beta 2 (localizados em vasos sanguíneos periféricos, músculo esquelético e pulmões). O propranolol é um antagonista de receptores beta 1 e 2. Desta forma, inibe a vasodilatação via receptores beta, o que leva à vasoconstrição dos capilares e redução do fluxo sanguíneo ^(13, 15, 41).

Além disso, a noradrenalina estimula a proteína HIF-1 α , o que leva ao aumento de VEGF e maior expressão de MMP-2 e 9 pelas células tumorais. O propranolol bloqueia a ação das catecolaminas na célula, diminuindo VEGF e MMPs, sem interferir na produção basal de citocinas pelas células ^(41, 71). Outras ações do propranolol nas células endoteliais são: bloqueio do receptor do fator de crescimento do endotélio vascular - 2 (VEGFR-2),

diminuição da proliferação e migração das células do HI e indução de apoptose celular ⁽⁴³⁾.

Como a ação do propranolol no tratamento do HI tem diferentes alvos, as células endoteliais, o tônus vascular, a angiogênese e a apoptose, vários efeitos são observados. Esses efeitos podem ser divididos em imediatos, intermediários e tardios ⁽¹⁵⁾. Após um a três dias da administração do propranolol, mudanças da coloração e consistência do HI já são observadas, o que é explicado pela vasoconstrição, que leva à diminuição do fluxo sanguíneo no HI. Os efeitos intermediários acontecem pelo bloqueio à liberação dos fatores pró-angiogênicos (VEGF, bFGF, MMP-2 e 9), o que resulta na diminuição de crescimento do hemangioma. Os efeitos tardios são caracterizados pela indução de apoptose das células endoteliais, com consequente regressão tumoral ^(15, 41) (Figura 3).

Mecanismo de ação do betabloqueador no tratamento do HI

Figura 3 - Esquema do mecanismo de ação do betabloqueador no tratamento do hemangioma infantil. VEGF: fator de crescimento do endotélio vascular, bFGF: fator básico de crescimento de fibroblastos, MMP-2 e 9: metaloproteinase 2 e 9

Outra hipótese da ação do propranolol no HI leva em consideração que o HI é um tumor que se origina da formação de vasos sanguíneos “de novo”, a partir de células progenitoras imaturas. Dessa forma, este medicamento preveniria a diferenciação das células tronco do HI em células endoteliais e pericitos, além de levar à diferenciação das células progenitoras em adipócitos. Estes efeitos resultariam na redução do tempo de duração da fase proliferativa, com migração mais rápida para a fase involutiva ⁽⁴¹⁾.

Ji et al. ⁽⁷²⁾, em 2012, estudam o efeito do propranolol na proliferação e apoptose das células endoteliais do hemangioma. Os autores fazem um estudo *in vitro*, a partir de células retiradas de tecido de hemangioma e as incubam com propranolol. O mecanismo de ação da medicação na célula é medido a partir da análise por *western Blot* e *polimerase chain reaction* (PCR). Os autores evidenciam o efeito inibitório do propranolol na viabilidade e proliferação das células endoteliais. Demonstram, também, que a apoptose é maior nas células incubadas com propranolol do que nas células sem a medicação. Além disso, há diminuição da expressão de VEGF nas células incubadas, o que tem relação direta com a dose da medicação utilizada.

Kleber et al. ⁽⁷³⁾, em 2012, estudam a presença de MMP-2 e 9 na urina de 22 crianças com HI, com menos de um ano de vida, e em 21 controles saudáveis. Identificam a presença de MMP-2 e MMP-9 em amostras urinárias de crianças saudáveis menores de um ano, sendo que, quanto menor a idade da criança, maiores os níveis de MMP-2 encontrados.

Em relação à MMP-9, não conseguem estabelecer nenhuma correlação com a idade, tampouco entre os doentes e os controles. Quanto à MMP-2 na urina de crianças com HI, verificam níveis menores, quando comparados com os controles saudáveis. Estes autores, procuram, além disso, testar a hipótese de que os valores dos marcadores variam conforme o tratamento com propranolol. Para tanto, os marcadores são dosados antes, após duas semanas e após dois meses de tratamento. Os autores verificam que, em relação aos valores anteriores e posteriores a duas semanas de tratamento com propranolol, há aumento significativo de MMP-2. Porém, após dois meses, não há mais diferença. Em relação aos valores de MMP-9, não há diferenças significativas antes, após duas semanas, e após dois meses de tratamento.

Chen et al. ⁽²²⁾, em 2013, avaliam a variação sérica de VEGF em 22 crianças com hemangioma infantil antes, após um, e após três meses de tratamento com propranolol, bem como em sete controles. Correlacionam, também, os níveis de VEGF com o volume do tumor por ultrassonografia medidos antes do início da terapêutica. Os autores demonstram valores médios de VEGF em crianças com HI estatisticamente maior que os dos controles. Já após um mês de tratamento, o nível diminui 21,6% ($p=0,003$) e, após três meses, 18% ($p=0,63$). Os autores, também, encontram correlação dos níveis de VEGF com o tamanho do tumor. Não demonstram correlação do VEGF com a idade do paciente.

Yuan et al. ⁽⁷⁴⁾, em 2013, analisam a eficácia do tratamento com propranolol e a variação sérica de VEGF em 35 pacientes com HI

proliferativo. Avaliam a melhora clínica pelo exame físico, ultrassonografia e pelas dosagens séricas medidas por ELISA. Verificam respostas positivas ao tratamento (excelente em 19% dos pacientes, boa em 46%, moderada em 29% e pobre em 9%) e redução significativa do VEGF no segundo mês de tratamento.

Wu et al. ⁽⁷⁵⁾, em 2015, avaliam a eficácia do propranolol no tratamento do HI e as variações séricas de VEGF, bFGF, MMP-9. Estudam 129 casos, sendo 97 com uso de propranolol oral e 32 em que não foi instituído tratamento algum. Utilizam o método de ELISA para dosar os marcadores antes e depois de oito semanas de tratamento em 40 crianças do grupo que foi tratado. Estas dosagens não foram realizadas no grupo que não recebeu tratamento. A avaliação da evolução clínica do HI é feita por meio do exame físico e de uma escala de gradação de redução do tumor (grau I a IV). Os autores observam melhor evolução no grupo tratado. Relatam redução significativa dos marcadores VEGF, bFGF e MMP-9 após as oito semanas de tratamento.

Ozeki et al. ⁽²¹⁾, em 2016, estudam, em 35 crianças com HI, a relação entre o tamanho do tumor, a idade da criança e o efeito do tratamento com propranolol, e sua influência sobre a variação plasmática de VEGF. Comparam os achados com os obtidos em 16 crianças com malformações vasculares e 28 saudáveis. A técnica utilizada é o ELISA. Observam níveis significativamente maiores de VEGF nos pacientes com HI em relação aos outros grupos de pacientes. Além disso, referem que os níveis se correlacionam com o tamanho do tumor ($p=0,002$), mas não com a idade da

criança. Após quatro semanas de tratamento, o valor da dosagem de VEGF já é estatisticamente menor que o valor inicial ($p < 0,01$).

Przewratil et al. ⁽⁷⁶⁾, em 2016, analisam a expressão sérica de VEGF pela técnica de ELISA em 50 crianças com HI antes e após três meses de tratamento com propranolol. Através da imunohistoquímica e análise de RNAm, avaliam, também, a expressão tecidual de VEGF e VEGFR-1 e 2 em 27 pacientes tratados e em 45 pacientes não tratados com propranolol. Os autores não encontram diminuição sérica significativa de VEGF após o tratamento com propranolol ($p = 0,1284$), nem correlação desses níveis com a idade do paciente ($p = 0,6327$) e tamanho do tumor ($p = 0,5499$). A análise por imunohistoquímica tecidual não evidencia diferença na expressão de VEGFR-1 e 2 entre os pacientes tratados e não tratados; nota-se, porém, aumento da expressão de VEGF após o tratamento ($p = 0,03$). A expressão tecidual de VEGF e VEGFR-1 por RNAm encontra-se diminuída no HI após tratamento com propranolol ($p < 0,00001$) e a expressão de VEGFR-2 não apresenta diferenças entre os grupos ($p = 0,95$).

1.1.5 O exame de ultrassonografia no seguimento do hemangioma infantil

Descrições prévias mostram que os exames de imagem, tais como a ressonância magnética e a ultrassonografia contribuem para o seguimento do HI em tratamento com betabloqueador ⁽⁵⁴⁻⁵⁶⁾.

A ultrassonografia é um método simples e não invasivo, que permite a obtenção de medidas precisas do tamanho, da espessura, e do volume da lesão. Avalia a profundidade do hemangioma, as camadas da pele e as estruturas anatômicas adjacentes acometidas, além de caracterizar a vascularização através da técnica com doppler.

Talaat et al. ⁽⁵⁶⁾, em 2012, avaliam 50 pacientes com HI antes e durante o tratamento com propranolol. São acompanhadas crianças com HI de até 22 meses de idade e o exame de ultrassonografia com doppler é realizado antes, após dois e seis meses e ao final do tratamento, com média de duração de 6,5 meses. Os autores observam mudança significativa da espessura da lesão e do índice de resistência vascular.

Bingham et al. ⁽⁵⁵⁾, em 2012, avaliam 19 pacientes com HI em tratamento com propranolol. O exame de ultrassonografia com doppler é realizado antes e depois de quatro semanas de tratamento. Observam que tanto a diminuição de volume do HI como a variação da densidade dos vasos apresentam diferenças significativas após este período de tratamento.

Kutz et al. ⁽⁵⁴⁾, em 2015, acompanham 10 pacientes com HI de até quatro anos de idade. A ultrassonografia com doppler é realizada antes e após três meses de tratamento com propranolol. A diminuição média do volume do HI é de 51% e a variação média da espessura dos vasos é menor que 15%. Constatam redução significativa do volume e do tamanho dos vasos presentes na lesão após o período de tratamento.

Rotter et al. ⁽⁵⁷⁾, em 2017, avaliam 19 pacientes com HI tratados com propranolol. Realizam a medida do volume do hemangioma pela

ultrassonografia com doppler, antes do início do tratamento e até 6 meses após. Observam uma média de 47% de redução de volume dos hemangiomas durante o tratamento. Concluem que a ultrassonografia com doppler pode contribuir para o melhor seguimento terapêutico do HI.

Na literatura, existem poucos estudos sobre a relação entre os níveis de VEGF e MMPs com as fases de crescimento do HI ^(19, 20). Também não há trabalhos que estudem a variação desses marcadores durante o tratamento com propranolol por um período maior que seis meses, ou que avaliem o comportamento desses marcadores no HI tratado com timolol.

O presente estudo foi elaborado devido à carência, na literatura, deste campo de conhecimento acerca dos hemangiomas da infância.

2 Objetivos

2 OBJETIVOS

Objetivo Geral:

Estudar os marcadores VEGF sanguíneo e urinário e MMP-2 e 9 urinárias em pacientes com hemangioma infantil.

Objetivos Específicos:

Nos pacientes com HI, antes do início do tratamento, e nos controles:

1. Determinar os níveis plasmáticos e urinários de VEGF e os níveis urinários de MMP-2 e 9.

Nos pacientes com HI, antes do início do tratamento com propranolol e timolol:

2. Determinar os níveis plasmáticos e urinários de VEGF e os níveis urinários de MMP-9 em pacientes com menos de 12 meses (fase proliferativa do HI) e com mais de 12 meses de idade (fase de involução do HI).
3. Correlacionar os níveis plasmáticos e urinários de VEGF e os níveis urinários de MMP-9 com o volume do HI.
4. Correlacionar os níveis plasmáticos de VEGF, os níveis urinários de VEGF e os níveis urinários de MMP-9 entre si.

Nos pacientes com HI, avaliar antes e durante o tratamento com propranolol e timolol:

5. Tamanho do HI calculado pela medida do volume à ultrassonografia;
6. Níveis plasmáticos de VEGF;
7. Níveis urinários de VEGF;
8. Níveis urinários de MMP-9.

3 Casuística e Métodos

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

Trata-se de um estudo de coorte prospectivo desenvolvido de acordo com os princípios da resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. O projeto de pesquisa foi enviado para a Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq- 042/2012) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) e aprovado em 07 de novembro de 2012 (Anexo 1).

3.1 Casuística

Foram analisados 68 doentes com HI com idades de um a 40 meses (média de idade= $10,6 \pm 9,62$), e 25 controles com idades de dois a 31 meses (média de idade= $11,96 \pm 8,11$) provenientes do Ambulatório de Dermatologia Infantil da Divisão de Dermatologia do HC-FMUSP, no período de novembro de 2012 a maio de 2016.

Todos os responsáveis legais dos pacientes e controles leram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido após terem sido informados a respeito dos procedimentos deste estudo. (Anexo 2)

3.1.1 Critérios de inclusão

- **Grupo de pacientes:** crianças com menos de 40 meses de idade com diagnóstico de hemangioma da infância (confirmado pela história clínica e exame físico) e que preenchiam critérios para se submeterem a tratamento sistêmico com propranolol, ou tópico com timolol ^(9, 48, 77). Os pacientes foram divididos em dois grupos: grupo propranolol e grupo timolol.
- **Grupo Controle:** composto por 25 crianças saudáveis com até 40 meses de idade.

3.1.2 Critérios de exclusão

- **Grupo Propranolol:** crianças com quadro clínico ou história de choque cardiogênico, bradicardia sinusal, hipotensão, bloqueio cardíaco maior que primeiro grau, falência cardíaca e asma brônquica.
- **Grupo Timolol:** não há critérios de exclusão.
- **Grupo controle:** crianças com doenças inflamatórias crônicas, doenças proliferativas, neoplásicas, infecciosas e alérgicas graves.

3.1.3 Dados clínicos dos pacientes com hemangioma infantil

De acordo com a história clínica e exame físico, foram compilados dados gerais das crianças, tais como sexo, idade, cor, prematuridade, gemelaridade, idade de início das lesões e idade de início de tratamento (Tabela 1).

Os HIs foram classificados levando-se em conta sua apresentação clínica:

1. De acordo com a profundidade do acometimento cutâneo, classificados em três subtipos:
 - a. Superficial, que se apresenta como lesão vermelho vivo, superficial à palpação;
 - b. Profundo, de coloração mais azulada ou da cor da pele normal, mais profundo à palpação;
 - c. Misto, quando há combinação da forma superficial e profunda, apresentando-se clinicamente com características de ambos os tipos (Figura 4).

Figura 4 - Classificação do hemangioma infantil de acordo com a apresentação clínica

2. De acordo com a localização e número de lesões do HI em:

- a. facial, não facial;
- b. único, múltiplo.

3.1.4 Grupos de pacientes segundo o tratamento instituído

Os pacientes foram subdivididos em dois grupos de acordo com o tratamento escolhido, propranolol ou timolol. O grupo controle foi composto por crianças saudáveis.

Grupo Propranolol: composto por todos os HIs em áreas passíveis de deixar sequelas funcionais ou de desfiguração permanente, tais como periocular, nasal, labial, auricular, facial (de disposição segmentar ou com mais de cinco cm), perineal, mamária. Também estão incluídos neste grupo os HIs que podem levar a risco de vida, como quando há acometimento de vias aéreas, além de ulceração e sangramento.

Antes do início do tratamento, todos os pacientes foram submetidos à avaliação por cardiologista pediatra, a fim de garantir a segurança de uso da medicação. Tal avaliação constou de anamnese específica, exame físico com aferição de pressão arterial e frequência cardíaca e eletrocardiograma. O ecocardiograma era realizado sempre que fosse evidenciada qualquer alteração no exame físico ou no eletrocardiograma. Também se indicava o ecocardiograma nos casos em que a criança possuísse antecedente familiar para doenças cardiológicas congênitas, bloqueio cardíaco, ou história materna de doença do tecido conectivo.

As contraindicações ao uso do propranolol foram choque cardiogênico, bradicardia sinusal, hipotensão, bloqueio cardíaco maior que primeiro grau, falência cardíaca e asma brônquica.

O tratamento com propranolol foi introduzido durante o atendimento ambulatorial. Apenas os bebês prematuros ou com menos de 8 semanas de vida eram hospitalizados, de modo a evitar qualquer possível risco com o uso da medicação.

O propranolol foi administrado na forma de comprimido de 10 mg, macerado e diluído em água. Estabeleceu-se a dose da medicação de acordo com o peso, sendo a mesma corrigida a cada consulta.

A dose utilizada na primeira semana era de 1 mg por kg de peso por dia, dividido em duas tomadas diárias, sendo uma pela manhã e outra à tarde, com as mamadas ou refeições. A partir da segunda semana, e na ausência de efeitos adversos, a dose era aumentada para 2 mg por kg de peso por dia.

Orientou-se que a medicação fosse administrada durante o período diurno e que a alimentação fosse oferecida imediatamente após a tomada, para se minimizar ou evitar o risco de hipoglicemia. Suspendia-se o tratamento na vigência de infecções, de baixa ingesta alimentar, de broncoespasmo, ou na presença de qualquer efeito colateral.

A resposta ao tratamento e os efeitos colaterais foram avaliados pelo mesmo observador.

Os principais efeitos adversos relatados com o tratamento com propranolol são broncoespasmo, hipoglicemia, alterações do sono, extremidades frias, diminuição do apetite, obstipação, diarreia e sonolência.

Grupo Timolol: composto por todos os HIs que, após a avaliação clínica e de imagem, não preenchem critérios para se indicar tratamento sistêmico.

Foi utilizado o colírio de timolol 0,5% ou a apresentação em gel oftalmológico (Timoptol XE[®] gel). Os pais eram orientados a pingar duas gotas da medicação sobre o hemangioma, massagear levemente, e fazer a oclusão com plástico filme, duas vezes ao dia.

3.1.5 Descrição da casuística

Sessenta e oito pacientes com HI foram incluídos no estudo. Para quarenta e cinco deles, foi indicado o tratamento sistêmico com propranolol; para vinte e três pacientes, indicou-se o tratamento tópico com timolol. Os dados demográficos dos dois grupos de pacientes com hemangioma infantil são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Dados demográficos dos pacientes com hemangioma infantil

	propranolol n= 45	timolol n=23
Idade, em meses ao início do tratamento		
Idade, mediana (variação)	6 (1-40)	10 (3-36)
Pacientes com menos de 12 meses de idade, n (%)	35 (78%)	15 (65%)
Sexo, n (%)		
feminino	36 (80%)	19 (83%)
masculino	9 (20%)	4 (17%)
Cor, n (%)		
branca	27 (60%)	15 (65%)
parda	16 (35%)	8 (35%)
preta	2 (5%)	0 (0%)
Prematuridade, n (%)	11 (24%)	5 (22%)
Gemelaridade, n (%)	2 (4%)	0 (0%)

n: número de pacientes

As características do HI dos pacientes de cada grupo estão demonstradas na tabela 2.

Tabela 2 - Características do hemangioma infantil de cada paciente

	propranolol n= 45	timolol n=23
Idade em que notou o crescimento do hemangioma (semanas)		
mediana, variação	4 (0-12)	4 (0-8)
IIQ	6	4
Subtipo, n (%)		
superficial	0 (0%)	5 (22%)
misto	39 (87%)	17 (74%)
profundo	6 (13%)	1 (4%)
Localização, n (%)		
facial	35 (78%)	11 (48%)
não facial	10 (22%)	12 (52%)
Classificação, n (%)		
único	38 (84%)	19 (83%)
múltiplo	7 (16%)	4 (17%)

n: número de pacientes, IIQ: intervalo interquartil

As localizações dos HIs estão descritas na Tabela 3. Nos casos de pacientes com hemangiomas múltiplos, a localização considerada foi a da lesão de maior tamanho.

Tabela 3 - Localização dos hemangiomas infantis

Localização	n	%
lábio	12	18%
maxila	7	10%
couro cabeludo	7	10%
membro superior	6	9%
vulva	6	9%
pálpebra	5	7%
dorso	4	6%
fronte	4	6%
face (segmentar)	4	6%
nariz	3	4%
barba	2	3%
mama	2	3%
tórax	2	3%
pescoço	1	1,5%
glabella	1	1,5%
nádega	1	1,5%
períneo	1	1,5%
Total	68	100%

n: número de pacientes

3.2 Métodos

As crianças incluídas no estudo foram avaliadas e submetidas aos exames propostos, que serão descritos a seguir, tanto no momento do diagnóstico, como durante e após o tratamento medicamentoso. Foram avaliadas por tempo variável e em consultas bimestrais.

Foram realizadas fotografias clínicas em todas as consultas, como medida mais objetiva de avaliação da evolução da lesão e da resposta ao tratamento. A máquina fotográfica utilizada foi da marca Canon 50D, com objetiva Canon 28-135mm e flash Canon Speedlite 600EX-RT.

3.2.1 Ultrassonografia

O exame ultrassonográfico com doppler também foi realizado a cada dois meses, no INRAD (Instituto de Radiologia do HC da FMUSP), pelo mesmo médico radiologista, com comprovada experiência na técnica.

O aparelho utilizado foi da marca Toshiba Aplio XG com transdutor intraoperatório PLT-1202S (7-14 MHz) e com regulagem para a avaliação da pele.

O volume da lesão foi calculado pelas medidas hemisféricas, utilizando-se os eixos longitudinal, transversal e anteroposterior, e aplicando-se um fator de correção de 0,5.

Quando o paciente apresentava múltiplos hemangiomas, foi considerada para o estudo e seguimento, a lesão de maior tamanho, mensurada pela ultrassonografia.

3.2.2 Coletas de amostras de sangue e urina

As coletas de sangue e urina foram realizadas em diferentes tempos, por profissionais do Laboratório Central do Hospital das Clínicas, sendo imediatamente transportadas ao LAE - Laboratório de Análises Especiais, do Laboratório de Investigação Médica 03 (LIM/03), do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

As amostras de sangue, coletadas em tubo contendo o anticoagulante EDTA, foram centrifugadas a 4500 rpm por 20 minutos a 4°C. O plasma foi separado em duas alíquotas, que foram imediatamente congeladas em eppendorfs (300 a 500 µL), devidamente identificados e armazenados em freezer industrial a -70°C até a realização das dosagens. As amostras de urina, coletadas com saco coletor, foram centrifugadas a 3000rpm por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi separado em duas alíquotas, imediatamente congeladas em eppendorfs (300 a 500 µL), devidamente identificadas e armazenadas em freezer industrial a -70°C até a realização das dosagens.

3.2.3 Técnica de análise de biomarcadores

As citocinas foram dosadas pela tecnologia xMAP (*multiple analyte profiling*) da Luminex[®], ou ensaio Luminex[®]. Para a leitura, se utilizou a plataforma Bio-Plex[®]. Esta técnica permite quantificar uma série de citocinas simultaneamente (até 100 diferentes biomarcadores) numa mesma amostra de plasma e urina. A dosagem é realizada em amostras pequenas, o que é uma vantagem, em se tratando de estudo com bebês e crianças. O ensaio tem, também, limites de detecção de citocinas inferiores ao ELISA convencional, o que resulta em maior sensibilidade analítica.

O princípio do ensaio Luminex[®] é similar ao ELISA “sanduíche”, associado à citometria de fluxo. O ensaio Luminex[®] utiliza microesferas coloridas (*beads*) revestidas com anticorpos de captura, que são direcionados contra o biomarcador desejado (VEGF, MMP-2 e 9). Anticorpos de detecção são adicionados para criar o complexo “sanduíche”, que é ligado ao conjugado estreptavidina-ficoeritrina (Figura 5). O complexo, então, emite sinal fluorescente que é captado por dois lasers: um vermelho, que identifica e classifica a microesfera, e outro verde, que quantifica a concentração dos biomarcadores. Um processador digital captura esses dados e os envia ao software de análise da plataforma Bio-plex[®].

Figura 5 - Esquema ilustrativo do ensaio Luminex[®]. VEGF: fator de crescimento do endotélio vascular, MMP-2 e 9: metaloproteinase 2 e 9

Para realização das dosagens de VEGF e metaloproteinases 2 e 9 foram utilizados, respectivamente, os kits comerciais da Bio-rad[®] (Human Cytokine 27-plex Assay) e Milipore[®] (Human MMP Panel 2). A quantidade das amostras utilizadas para análise e os tempos de incubação seguiram as instruções dos manuais desses kits. As etapas do exame serão descritas a seguir, sempre nessa sequência de kits, primeiramente Bio-rad[®] e depois, Milipore[®].

Inicialmente, foram pipetadas microesferas coloridas, revestidas com anticorpos de captura contra VEGF e MMP-2 e 9 em uma placa com 96 poços. Foram incubadas por 30 minutos (kit Bio-rad[®]) ou uma hora (kit Milipore[®]). Realizaram-se as incubações em agitador de placas (IKA MTS 2/4 digital - IKA[®] Werke Staufen, Alemanha) protegidas da luz. A seguir, foram pipetadas 25 ou 50 µL de amostras dos pacientes, controles, e curva padrão. Após a lavagem, o anticorpo de detecção foi adicionado à placa, que passou por novo período de incubação, de 30 minutos ou de 2 horas (de acordo com o kit). As lavagens foram realizadas em lavadora magnética (Bio-plex[®] PRO II Wash Station) e as microesferas permaneceram retidas na

placa pela ação de um ímã. Foi adicionada, posteriormente, a estreptavidina conjugada com a proteína fluorescente, R-ficoeritrina (estreptavidina-RPE), e incubada por um breve período, 10 ou 30 minutos. Após a lavagem para remoção dos reagentes não aderidos, foi adicionada aos poços uma solução tampão (Luminex®, MiraiBio, Alameda, CA) para serem analisadas na plataforma (Bio-plex® 200) (Figura 6).

Figura 6 - Etapas de análise dos biomarcadores do ensaio Luminex®

As concentrações das amostras analisadas (plasma e urina) foram calculadas a partir da curva padrão, obtidas por meio do *Software Bio-Plex Manager* (Bio-Rad® Laboratories, Hercules, CA). Os níveis das citocinas foram expressos em pg/mL. Os limites de detecção das citocinas de interesse no presente estudo, analisados pela metodologia xMAP da

Luminex[®], foram: VEGF (1,81 a 37.546 pg/mL), MMP-2 (68 a 50.000 pg/mL) e MMP-9 (14 a 10.000 pg/mL). Os biomarcadores que apresentaram valores não detectáveis pelo ensaio em mais de 50% das amostras analisadas deixaram de ser avaliados durante o estudo.

3.3 Análise estatística

Para a análise estatística descritiva, os dados categóricos foram explicitados tanto em números absolutos como em sua respectiva proporção. Já os dados contínuos foram descritos pela sua média $\pm$ desvio padrão ou pela mediana (Me) e (intervalo interquartil), quando apropriado.

Os dados contínuos foram submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar a normalidade da distribuição. Para análise estatística inferencial, quando os dados contínuos apresentavam distribuição normal, foi utilizado o teste t para amostras independentes. Quando a distribuição não era normal, realizaram-se testes não paramétricos. Para medidas repetidas de grupos pareados, foi realizado o teste de Friedman. Quando necessário, uma análise pos-hoc foi realizada com o teste de Wilcoxon *signed-rank*, com a correção de Bonferroni. Para testar amostras de forma independente, foram utilizados o teste U de Mann-Whitney e o teste de Kruskal Wallis, para análise de dois ou mais grupos respectivamente.

Para a análise das diferentes proporções dos dados categóricos foi utilizado o teste de Fisher.

Na análise de correlação entre as medidas anteriores ao início do tratamento, o teste não paramétrico de Spearman foi utilizado quando a distribuição não era considerada normal. Foi aceito como erro do tipo I, para inferência da diferença estatisticamente significativa, $p \leq 0,05$.

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa SPSS versão 23.0 (SPSS Inc[®], Chicago, IL, EUA).

4 Resultados

4 RESULTADOS

Dos 68 pacientes com HI incluídos no estudo, 45 foram tratados com propranolol e 23 foram tratados com timolol.

A idade das crianças com HI variou entre 1 a 40 meses, com mediana de 7 meses. Já as 25 crianças do grupo controle tinham idade variando de 2 a 31 meses, com mediana de 11 meses. Embora a mediana do grupo controle fosse maior, não houve diferença estatística com relação à idade entre o grupo controle e o de pacientes ($p=0,234$).

Em relação ao sexo, houve predomínio de meninas tanto no grupo controle, 18 (70%), como no grupo de crianças com HI, 55 (80%). Não houve diferença estatística entre os grupos ($p=0,247$).

Todos os pacientes foram acompanhados clinicamente, em consultas mensais ou bimensais, em que eram analisados os seguintes parâmetros: avaliação clínica (sempre pelo mesmo examinador), avaliação fotográfica, medidas de volume do HI (obtidas pelo exame de ultrassonografia), dosagem plasmática e urinária de VEGF e dosagem urinária de MMP-2 e MMP-9. Foram feitas comparações, tanto dos parâmetros laboratoriais, como das medidas de volume antes do tratamento e durante o mesmo.

As dosagens dos marcadores obtidas antes do início do tratamento, de até seis meses e de 7 a 12 meses de tratamento, foram comparadas entre si.

Todos os resultados obtidos estão apresentados nos Anexos 3, 4 e 5.

Embora este não fosse o objetivo do estudo, é interessante relatar que não houve nenhuma ocorrência de efeitos adversos com o uso do propranolol nos pacientes tratados.

4.1 Determinação dos níveis plasmáticos e urinários de VEGF e dos níveis urinários de MMP-2 e MMP-9 em pacientes com HI e em crianças saudáveis (controles)

As dosagens urinárias de MMP-2 foram indetectáveis em mais de 50% das amostras coletadas (pacientes e controles). Por este motivo, optou-se por não se utilizar este marcador no presente estudo.

Foram comparadas as dosagens de VEGF no plasma e na urina e de MMP-9 na urina de pacientes com HI, de antes do início do tratamento, com as de crianças saudáveis (controles) (Tabela 4).

Os níveis de VEGF em amostras plasmáticas foram maiores nos pacientes com HI em relação aos controles, porém sem diferença significativa ($p=0,726$) (Figura 7a). Em relação aos níveis urinários de VEGF e MMP-9, não houve diferença entre os grupos de pacientes com HI e controles ($p=0,706$ e $p=0,421$, respectivamente) (Figuras 7b e 7c).

Tabela 4 - Níveis plasmáticos e urinários de VEGF e níveis urinários de MMP-9 em pacientes com hemangioma infantil e controles

	Controles n= 25	Pacientes n= 68	Valor de <i>p</i>
VEGF plasma, pg/mL	n=25	n=67	
Mediana (IIQ)	25,98 (87,64)	29,4 (44,48)	0,726
VEGF urina, pg/mL	n= 16	n=45	
Mediana (IIQ)	109,5 (232,43)	140,9 (163,94)	0,706
MMP-9 urina, pg/mL	n=16	n= 55	
Mediana (IIQ)	57,03 (225,26)	67,3 (298,20)	0,421

Teste U de Mann Whitney

n: número de pacientes, IIQ: intervalo interquartil, *p*: nível de significância

VEGF: fator de crescimento do endotélio vascular, MMP-9: metaloproteinase 9.

As barras horizontais (inseridas no retângulo) representam a mediana e intervalo interquartil. Teste U de Mann Whitney; (○, ★) *outliers*. n: número de pacientes, VEGF: fator de crescimento do endotélio vascular, MMP-9: metaloproteinase 9.

Figura 7 - Determinação dos níveis plasmáticos e urinários de VEGF e dos níveis urinários de MMP-9 em pacientes com hemangioma infantil (HI) e em crianças saudáveis (controles).
a. Dosagem plasmática de VEGF em controles (n=25) e pacientes com HI (n=67);
b. Dosagem urinária de VEGF em controles (n=16) e pacientes com HI (n=45);
c. Dosagem urinária de MMP-9 em controles (n=16) e pacientes com HI (n=55)

4.2 Determinação dos níveis plasmáticos e urinários de VEGF e dos níveis urinários de MMP-9 antes do tratamento com propranolol e timolol em pacientes com HI com menos de 12 meses (fase proliferativa) e com mais de 12 meses de idade (fase de involução)

Inicialmente, com o objetivo de determinar os níveis de marcadores em diferentes fases de crescimento do tumor, os pacientes do grupo propranolol e timolol foram divididos pela idade em menores que 12 meses, incluindo os que tinham 12 meses, e maiores que 12 meses. Conforme a literatura, considera-se que, até os 12 meses de idade, o HI encontra-se em fase proliferativa e, após os 12 meses, na fase de involução ⁽⁷⁾.

No grupo de pacientes com HI, 50 crianças tinham 12 meses ou menos, com média de idade de 6 meses ($DP \pm 2,9$) e 18 tinham mais que 12 meses de idade, com média de idade de 24 meses ($DP \pm 9$).

Foram comparadas as dosagens de VEGF no plasma e na urina, e de MMP-9 na urina de pacientes com HI com 12 meses ou menos de idade, com as dosagens obtidas nas crianças com mais de 12 meses de idade (Tabela 5).

Os valores de VEGF no plasma e de MMP-9 na urina foram maiores nos pacientes com 12 meses ou menos, porém sem diferença estatística significativa em relação aos pacientes de mais de 12 meses de idade ($p=0,207$, $p=0,476$) (Figuras 8a e 8b). Já os valores de VEGF urinários foram maiores nos pacientes com mais de 12 meses de idade, embora sem

diferença estatística significativa em relação ao grupo com menos de 12 meses de idade ($p=0,326$) (Figura 8c).

Tabela 5 - Níveis plasmáticos e urinários de VEGF e níveis urinários de MMP-9 antes do tratamento com propranolol e timolol em pacientes com hemangioma infantil com menos de 12 meses e com mais de 12 meses de idade

	idade $\leq$ 12meses n= 50	idade > 12meses n= 18	valor p
VEGF plasma, pg/mL	n=50	n= 17	
Mediana (IIQ)	32,85 (61,82)	20,55 (31,27)	0,207
VEGF urina, pg/mL	n=35	n=10	
Mediana (IIQ)	126,92 (125,58)	227,13 (340,63)	0,326
MMP-9 urina, pg/mL	n= 43	n=12	
Mediana (IIQ)	77,92 (452,95)	52,97 (262,85)	0,476

Teste U de Mann Whitney

n: número de pacientes, IIQ: intervalo interquartil, p : nível de significância, VEGF: fator de crescimento do endotélio vascular, MMP-9: metaloproteinase 9.

As barras horizontais (inseridas no retângulo) representam a mediana e intervalo interquartil. Teste U de Mann Whitney; (○, ★) outliers.

n: número de pacientes, IIQ: intervalo interquartil, p : nível de significância, VEGF: fator de crescimento do endotélio vascular, MMP-9: metaloproteinase 9.

Figura 8 - Determinação dos níveis plasmáticos e urinários de VEGF e urinários de MMP-9 antes do tratamento com propranolol e timolol em pacientes com hemangioma infantil (HI) com menos de 12 meses e com mais de 12 meses de idade.

a. Dosagem plasmática de VEGF em pacientes com HI com menos de 12 meses (n=50) e com mais de 12 meses de idade (n=17);

b. Dosagem urinária de VEGF em pacientes com HI com menos de 12 meses (n=35) e com mais de 12 meses de idade (n=10);

c. Dosagem urinária de MMP-9 em pacientes com HI com menos de 12 meses (n=43) e com mais de 12 meses de idade (n=12)

4.3 Correlação entre os níveis plasmáticos e urinários de VEGF e níveis urinários de MMP-9 antes do início do tratamento com o tamanho do HI

Para verificar se o tamanho do HI influenciaria nos níveis dos marcadores, foi realizada análise estatística correlacionando o volume do tumor, obtido pelo exame de ultrassonografia, e os níveis de VEGF (em amostras de plasma e urina) e de MMP-9 (em amostras de urina) (Figura 9).

n= 42. Teste de correlação de Spearman. $p \leq 0,01$. p : nível de significância
 VEGF: fator de crescimento do endotélio vascular, MMP-9: metaloproteinase 9.

Figura 9 - Correlação entre os níveis plasmáticos e urinários de VEGF e níveis urinários de MMP-9 antes do início do tratamento e o tamanho do HI.

- a. volume do hemangioma e VEGF plasmático,
- b. volume do hemangioma e VEGF urinário,
- c. volume do hemangioma e MMP-9 urinária

De acordo com os dados apresentados, não houve correlação estatisticamente significativa entre o tamanho do tumor e os níveis dos marcadores.

4.4 Correlação entre os níveis plasmáticos e urinários de VEGF e níveis urinários de MMP-9 dos pacientes com HI antes do início do tratamento

Os resultados obtidos antes do início do tratamento mostraram correlação significativa entre os níveis urinários de VEGF e MMP-9 ($p=0,0001$) (Figura 10c).

Não se observou correlação entre os níveis plasmáticos e urinários de VEGF e entre os níveis plasmáticos de VEGF e urinários de MMP-9 (Figura 10a e 10b).

n= 42. Teste de correlação de Spearman. $p \leq 0,01$.

VEGF: fator de crescimento do endotélio vascular, MMP-9: metaloproteinase 9. p : nível de significância

Figura 10 - Correlação entre os níveis plasmáticos e urinários de VEGF e urinários de MMP-9 antes do tratamento.

- a.** VEGF plasmático e VEGF urinário,
- b.** VEGF plasmático e MMP-9 urinária,
- c.** VEGF urinário e MMP-9 urinária

4.5 Avaliação do tamanho (volume obtido pela ultrassonografia) dos HIs de pacientes antes e durante o tratamento com propranolol e timolol

Foi realizada a análise do tamanho do HI no grupo tratado com propranolol e no grupo tratado com timolol e o estudo da variação do tamanho do HI antes e durante o tratamento. Foram comparadas as medidas de volume obtidas antes do início do tratamento com as obtidas em até 6 meses e de 7 a 12 meses de tratamento (Figura 11).

Figura 11 - Fotografia e ultrassonografia de paciente do sexo feminino com hemangioma em região nasal. a. antes do início do tratamento (Volume: 1,2 cm³) e b. após 6 meses de tratamento com propranolol (Volume: 0,3 cm³)

O número de pacientes de cada grupo variou de acordo com o tempo de tratamento, pois nem todos os exames foram realizados pelos pacientes nas datas estabelecidas pelo examinador. Assim sendo, não se obtiveram todos os resultados no número total de pacientes. Como alternativa para a análise dos dados obtidos, optou-se pela realização de dois testes de análise dos resultados, a saber:

- a – análise não pareada: comparação entre as medidas de volume antes do início do tratamento, com até 6 meses, e com de 7 a 12 meses de tratamento. Neste grupo de pacientes, como os exames algumas vezes não foram realizados na data preconizada, a análise nem sempre contemplou o mesmo paciente nos diferentes tempos de tratamento (antes, até 6 meses, e de 7 a 12 meses). Por esse motivo, a análise foi feita com um número maior de pacientes e de forma não pareada.
- b - análise pareada: comparação entre os dados coletados dos mesmos pacientes ao longo do período de tratamento (antes, até 6 meses, de 7 a 12 meses). Essa análise permitiu a avaliação prospectiva de um mesmo paciente, diminuindo a influência que as diferenças entre os pacientes pudessem exercer sobre os resultados.

Na análise não pareada, no grupo tratado com propranolol, houve diminuição de volume do HI com o tratamento. Comparando-se o volume do HI medido antes do início do tratamento, com o volume até 6 meses de tratamento e com de 7 a 12 meses, não houve diferença significativa entre os grupos ($p=0,223$) (Figura 12a; Tabela 6). No entanto, quando realizada a análise pareada, acompanhando o mesmo paciente, observou-se redução

significativa do volume do HI tratado com propranolol. A variação do volume do HI medido antes do início do tratamento (Me: 0,75 (1,54)), com até 6 meses de tratamento (Me: 0,47 (1,26), $p=0,002$) e de 7 a 12 meses (Me: 0,2 (0,65), $p=0,001$) foi significativa. Da mesma forma, houve redução significativa do volume do HI quando comparado o volume até os 6 meses com o de 7 a 12 meses de tratamento ($p=0,028$) (Figura 12b; Tabela 7).

Na análise não pareada dos pacientes tratados com timolol, a variação do volume do HI de antes do início do tratamento para o volume medido até 6 meses e de 7 a 12 meses de tratamento não mostrou diferença significativa ($p=0,969$). Pelo contrário, foi observado um aumento do volume do HI medido de 7 a 12 meses de tratamento (Figura 12a; Tabela 6). Ao se analisar de forma pareada, acompanhando o mesmo paciente, observou-se redução não significativa do volume do HI tratado com timolol em relação à medida de antes do tratamento, com a de até 6 meses ($p=0,33$) e com a de 7 a 12 meses de tratamento ($p=0,89$) (Figura 12b; Tabela 7).

As barras horizontais (inseridas no retângulo) representam mediana e intervalo interquartil. (○, ★) outliers.

n: número de pacientes, p : nível de significância.

Figura 12 - Avaliação do tamanho do HI no grupo tratado com propranolol e no grupo tratado com timolol e o estudo da variação do tamanho do HI antes e durante o tratamento.

a. Análise não pareada, grupo tratado com propranolol: volume antes ($n=36$), até 6 meses ($n=17$), de 7 a 12 meses ($n=21$); grupo tratado com timolol, volume antes ($n=22$), até 6 meses ($n=10$), de 7 a 12 meses ($n=7$). Teste Kruskal-Wallis.

b. Análise pareada, grupo tratado com propranolol ($n=8$), grupo tratado com timolol ($n=5$). Teste Wilcoxon *signed-rank*, # $p \leq 0,05$

Tabela 6 - Medidas de volume do hemangioma infantil nos pacientes tratados com propranolol e timolol (grupos não pareados)

	propranolol n= 36	timolol n=22
Antes do tratamento		
Volume (cm ³)	0,95 (2,22)	0,42 (1,45)
Até 6 meses de tratamento	propranolol n= 17	timolol n= 10
Volume (cm ³)	0,99 (2,45)	0,44 (1,72)
De 7 a 12 meses de tratamento	propranolol n= 21	timolol n= 7
Volume (cm ³)	0,57 (1,31)	0,88 (3,67)

Os valores são apresentados em mediana (intervalo interquartil)
n: número de pacientes

Tabela 7 - Medidas de volume do hemangioma infantil nos pacientes tratados com propranolol e timolol (grupos pareados)

	propranolol n= 8	timolol n=5
Antes do tratamento		
Volume (cm ³)	0,75 (1,54)	1,77 (0,92)
Até 6 meses de tratamento		
Volume (cm ³)	0,47 (1,26)	1,61 (6,81)
De 7 a 12 meses de tratamento		
Volume (cm ³)	0,2 (0,65)	1,28 (3,39)

Os valores são apresentados em mediana (intervalo interquartil)
n: número de pacientes

4.6 Resultados da avaliação dos níveis plasmáticos de VEGF dos pacientes com HI antes e durante o tratamento com propranolol e timolol

Realizou-se a análise da variação dos níveis plasmáticos de VEGF dos pacientes com HI no grupo tratado com propranolol e no grupo tratado com timolol, antes e durante o tratamento (Figura 13).

Pelo mesmo motivo já explanado na análise dos resultados de volume do HI, foram também realizados testes pareados e não pareados.

Na análise não pareada dos pacientes tratados com propranolol, apesar de ter havido diminuição dos níveis plasmáticos de VEGF com o tratamento, a análise deste marcador, antes do início do tratamento, com até 6 meses e de 7 a 12 meses de tratamento, não mostrou diferença significativa ($p=0,079$) (Figura 13a; Tabela 8). Porém, quando foi realizada a análise pareada, acompanhando o mesmo paciente, observou-se diminuição significativa dos níveis plasmáticos de VEGF em relação aos valores obtidos antes do início do tratamento, com os de até 6 meses de tratamento (Me: 30,35 (35,22), 20,27 (25,68), respectivamente; $p=0,022$) e com os de 7 a 12 meses de tratamento (28,48 (36,66); $p=0,028$). Quando se comparam os dois grupos com diferentes tempos de tratamento, verifica-se que não houve redução significativa do VEGF dosado até os 6 meses para o de 7 a 12 meses de tratamento ($p=0,917$) (Figura 13b; Tabela 9).

Na análise não pareada dos pacientes tratados com timolol, os níveis plasmáticos de VEGF de antes do início do tratamento comparados com a

medida de até 6 meses e de 7 a 12 meses de tratamento, não mostrou diferença significativa ($p=0,3$) (Figura 13a; Tabela 8). Ao se realizar análise pareada, acompanhando o mesmo paciente, também se observou diminuição não significativa dos níveis plasmáticos de VEGF, quando comparados os valores de antes do início do tratamento com os de até 6 meses, ($p=0,110$) e também com os de 7 a 12 meses de tratamento ($p=0,123$) (Figura 13b; Tabela 9).

As barras horizontais (inseridas no retângulo) representam mediana e intervalo interquartil. (○, ★) outliers, VEGF: fator de crescimento do endotélio vascular, n: número de pacientes, p: nível de significância.

Figura 13 - Determinação dos níveis plasmáticos de VEGF de pacientes com HI antes e durante o tratamento com propranolol e timolol. a. Análise não pareada, grupo tratado com propranolol: VEGF plasmático antes (n= 44), até 6 meses (n=19), de 7 a 12 meses (n=27); grupo tratado com timolol: VEGF plasmático antes (n= 23), até 6 meses (n=11), de 7 a 12 meses (n=8). Teste Kruskal-Wallis. b. Análise pareada, grupo tratado com propranolol (n=13), grupo tratado com timolol (n=6). Teste Wilcoxon *signed-rank*, # $p \leq 0,05$

Tabela 8 - Níveis plasmáticos de VEGF dos pacientes com hemangioma infantil antes e durante o tratamento com propranolol e timolol (grupos não pareados)

Antes do tratamento	propranolol n= 44	timolol n=23
VEGF plasma, pg/mL	31,85 (67,24)	19,78 (39,58)
Até 6 meses de tratamento	propranolol n= 19	timolol n= 11
VEGF plasma, pg/mL	20,55 (23,37)	19,63 (25,42)
De 7 a 12 meses de tratamento	propranolol n= 27	timolol n= 8
VEGF plasma, pg/mL	15,98 (33,07)	12,66 (10,2)

Os valores são apresentados em mediana (intervalo interquartil)
n: número de pacientes, VEGF: fator de crescimento do endotélio vascular

Tabela 9 - Níveis plasmáticos de VEGF dos pacientes com hemangioma infantil antes e durante o tratamento com propranolol e timolol (grupos pareados)

	propranolol n= 13	timolol n=6
Antes do tratamento		
VEGF plasma, pg/mL	30,35 (35,22)	17,17 (22,11)
Até 6 meses de tratamento		
VEGF plasma, pg/mL	20,27 (25,68)	13,71 (18,75)
De 7 a 12 meses de tratamento		
VEGF plasma, pg/mL	28,48 (36,66)	10,55 (7,98)

Os valores são apresentados em mediana (intervalo interquartil)
n: número de pacientes, VEGF: fator de crescimento do endotélio vascular

4.7 Resultados da avaliação dos níveis urinários de VEGF dos pacientes com HI antes e durante o tratamento com propranolol e timolol

Foi realizada a análise da variação dos níveis urinários de VEGF dos pacientes com HI no grupo tratado com propranolol e no grupo tratado com timolol antes e durante o tratamento (Figura 14).

Pelo mesmo motivo já explanado na análise dos resultados de volume do HI, foram realizados testes pareados e não pareados.

Na análise não pareada, no grupo tratado com propranolol, quando se comparam os níveis urinários de VEGF com os resultados obtidos antes do tratamento, constata-se ter havido diminuição significativa em até 6 meses de tratamento (119,99 (120,93), 45,64 (70,6); $p=0,006$). No entanto, tal diminuição não se mostrou significativa de 7 a 12 meses de tratamento (70,2 (145,64); $p=0,092$) (Figura 14a; Tabela 10). Ao se realizar a análise pareada, acompanhando o mesmo paciente, observou-se que, no grupo tratado com propranolol, houve uma variação não significativa dos níveis urinários de VEGF dosados antes do tratamento, com os de até 6 meses e com os medidos de 7 a 12 meses após o início do tratamento ($p=0,651$) (Figura 14b; Tabela 11).

Na análise não pareada, no grupo tratado com timolol, não houve variação significativa de VEGF urinário, dosado antes do início do tratamento quando comparado com o de até 6, e com o de 7 a 12 meses de tratamento ($p=0,711$) (Figura 14a; Tabela 10). Da mesma forma, ao se

realizar a análise pareada, acompanhando o mesmo paciente, observou-se variação não significativa dos níveis urinários de VEGF, dosados antes do início do tratamento, até 6 meses, e de 7 a 12 meses de tratamento ($p=0,472$) (Figura 14b; Tabela 11).

As barras horizontais (inseridas no retângulo) representam mediana e intervalo interquartil. (○, ★) outliers. VEGF: fator de crescimento do endotélio vascular, n: número de pacientes, p : nível de significância.

Figura 14 - Determinação dos níveis urinários de VEGF de pacientes com HI antes e durante o tratamento com propranolol e timolol.

a. Análise não pareada, grupo tratado com propranolol: VEGF urinário antes ($n=28$), até 6 meses ($n=16$), de 7 a 12 meses ($n=21$); grupo tratado com timolol, VEGF urinário antes ($n=17$), até 6 meses ($n=9$), de 7 a 12 meses ($n=7$). Teste de Kruskal-Wallis.

b. Análise pareada, grupo tratado com propranolol ($n=7$), grupo tratado com timolol ($n=4$). Teste Friedman, # $p \leq 0,05$

Tabela 10 - Níveis urinários de VEGF dos pacientes com hemangioma infantil antes e durante o tratamento com propranolol e timolol (grupos não pareados)

Antes do tratamento	propranolol n= 28	timolol n= 17
VEGF urina, pg/mL	119,99 (120,93)	170, 04 (281,01)
Até 6 meses de tratamento	propranolol n= 16	timolol n= 9
VEGF urina, pg/mL	45,64 (70,6)	38,56 (310,57)
De 7 a 12 meses de tratamento	propranolol n= 21	timolol n= 7
VEGF urina, pg/mL	70,2 (145,64)	97,24 (196,63)

Os valores são apresentados em mediana (intervalo interquartil)
n: número de pacientes, VEGF: fator de crescimento do endotélio vascular.

Tabela 11 - Níveis urinários de VEGF dos pacientes com hemangioma infantil antes e durante o tratamento com propranolol e timolol (grupos pareados)

	propranolol n= 7	timolol n= 4
Antes do tratamento		
VEGF urina, pg/mL	90,00 (177,24)	196,24 (268,89)
Até 6 meses de tratamento		
VEGF urina, pg/mL	55,28 (161,05)	79,77 (288,66)
De 7 a 12 meses de tratamento		
VEGF urina, pg/mL	70,22 (148,11)	188,02 (408,74)

Os valores são apresentados em mediana (intervalo interquartil)
n: número de pacientes, VEGF: fator de crescimento do endotélio vascular.

4.8 Resultados da avaliação dos níveis urinários de MMP-9 dos pacientes com HI antes e durante o tratamento com propranolol e timolol

Foi realizado estudo da variação dos níveis urinários de MMP-9 dos pacientes com HI no grupo tratado com propranolol e no grupo tratado com timolol antes e durante o tratamento (Figura 15).

Pelo mesmo motivo já explanado na análise dos resultados de volume do HI, foram também utilizados, na avaliação destes parâmetros, testes pareados e não pareados.

Na análise não pareada, no grupo de pacientes tratados com propranolol, a variação dos níveis urinários de MMP-9 dosados antes, até 6 meses e de 7 a 12 meses de tratamento, não mostrou diferença estatisticamente significativa ($p=0,065$) (Figura 15a; Tabela 12). Ao se realizar análise pareada, acompanhando o mesmo paciente, observou-se diminuição significativa dos níveis de MMP-9 urinárias no grupo tratado com propranolol, quando se compararam os valores de antes do tratamento, com os de até 6 meses (173,94 (896,41); 14,24 (287,37), respectivamente; $p=0,006$) e com os de 7 a 12 meses de tratamento (23,16 (99,26), $p=0,035$). Não houve redução significativa dos níveis urinários de MMP-9 entre os grupos de até 6 meses com o de 7 a 12 meses de tratamento ($p=0,169$) (Figura 15b; Tabela 13).

Nos pacientes tratados com timolol, tanto na análise não pareada como na pareada, não houve variação significativa dos níveis urinários de

MMP-9 dosados antes, até 6 meses e de 7 a 12 meses de tratamento ($p=0,169$ e $p=0,623$, respectivamente) (Figura 15 a. e b.; Tabelas 12 e 13).

As barras horizontais (inseridas no retângulo) representam mediana e intervalo interquartil. (○, ★) outliers. MMP-9: metaloproteinase 9, n: número de pacientes, p : nível de significância.

Figura 15 - Determinação dos níveis urinários de MMP-9 de pacientes com HI antes e durante o tratamento com propranolol e timolol.
a. Análise não pareada, grupo tratado com propranolol: MMP-9 urinária antes ($n=35$), até 6 meses ($n=20$), de 7 a 12 meses ($n=23$); grupo tratado com timolol, MMP-9 urinária antes ($n=20$), até 6 meses ($n=9$), de 7 a 12 meses de tratamento ($n=8$). Teste Kruskal-Wallis.
b. Análise pareada, grupo tratado com propranolol ($n=9$), grupo tratado com timolol ($n=5$). Teste Wilcoxon *signed-rank*, # $p \leq 0,05$

Tabela 12 - Níveis urinários de MMP-9 dos pacientes com hemangioma infantil antes e durante o tratamento com propranolol e timolol (grupos não pareados)

Antes do tratamento	propranolol n= 35	timolol n= 20
MMP-9 urina, pg/mL	123,36 (659,33)	34,53 (130,81)
Até 6 meses de tratamento	propranolol n= 20	timolol n= 9
MMP-9 urina, pg/mL	30,35 (170,27)	212,76 (396,60)
De 7 a 12 meses de tratamento	propranolol n= 23	timolol n= 8
MMP-9 urina, pg/mL	54,9 (239,94)	101,18 (572,01)

Os valores são apresentados em mediana (intervalo interquartil)

n: número de pacientes, MMP-9: metaloproteinase 9.

Tabela 13 - Níveis urinários de MMP-9 dos pacientes com hemangioma infantil antes e durante o tratamento com propranolol e timolol (grupos pareados)

	propranolol n= 9	timolol n= 5
Antes do tratamento		
MMP-9 urina, pg/mL	173,94 (896,41)	15,02 (507,13)
Até 6 meses de tratamento		
MMP-9 urina, pg/mL	14,24 (287,37)	208,35 (278,47)
De 7 a 12 meses de tratamento		
MMP-9 urina, pg/mL	23,16 (99,26)	190,13 (5090,59)

Os valores são apresentados em mediana (intervalo interquartil)

n: número de pacientes, MMP-9: metaloproteinase 9.

5 Discussão

5 DISCUSSÃO

Fatores angiogênicos são cada vez mais estudados em relação ao seu papel na patogênese do hemangioma da infância. Da mesma forma, o mecanismo de ação dos betabloqueadores, como o propranolol, no tratamento dos HI, tem sido objeto de várias pesquisas. A maioria delas indica que o nível dos marcadores VEGF e MMPs estão aumentados nas crianças com HI ^(16, 17, 19-22). Outras estabelecem relação dos marcadores com o tamanho e a fase de crescimento do HI e com a resposta terapêutica ao propranolol ⁽¹⁹⁻²¹⁾. Não existem, até o momento, trabalhos sobre o papel destes marcadores no tratamento do HI com timolol.

A maioria dos estudos da literatura sobre os HIs é direcionada apenas para uma determinada caracterização dessa doença ou de seus mediadores. Não há pesquisas que contemplem, conjuntamente, vários fatores que podem alterar a mensuração dos marcadores, tais como as diferentes fases evolutivas do HI, os diversos tamanhos da lesão, ou mesmo a vigência do tratamento tópico ou sistêmico. O presente trabalho foi elaborado com o intuito de suprir essa lacuna da literatura, estudando os marcadores da angiogênese num grupo de crianças com HI tratadas com propranolol e timolol.

5.1 Hemangioma infantil e controles saudáveis

Com o objetivo de avaliar se há relação entre os fatores (marcadores) relacionados à angiogênese nos pacientes com hemangioma infantil, foram dosados VEGF plasmático e urinário e MMP-2 e 9 urinárias. Os valores encontrados foram então comparados com os de crianças saudáveis, sem HI.

Os níveis plasmáticos de VEGF em 67 crianças com HI, embora aumentados em relação a 25 do grupo controle (com médias de idade de 10,9 e 11,9 meses, respectivamente), não apresentaram diferença significativa. Esses resultados mostram, portanto, que o nível plasmático de VEGF não é um bom marcador para mensurar o aumento da angiogênese que ocorre nos pacientes com HI.

Apesar de alguns estudos demonstrarem aumento dos níveis sanguíneos de VEGF em crianças com HI em relação a controles saudáveis (17, 19-22), a maioria deles o fazem com números variáveis de pacientes e controles e nem sempre com idades adequadamente pareadas. Kleinman et al. (17) estudam apenas dez pacientes com HI e dez controles, com idades não pareadas. Chen et al. (22) avaliam 22 crianças com HI e somente sete controles. Przewratil et al. (19) estudam 52 crianças com HI e 36 controles, com idades não pareadas (média de 12 e 30 meses, respectivamente). Zhang et al. (20) avaliam 59 pacientes com HI em fase proliferativa e apenas 12 controles, com idades maiores no grupo controle. Somente a pesquisa realizada por Ozeki et al. (21) compara os níveis de VEGF em 35 pacientes

com HI com 28 controles com médias de idade similares nos dois grupos (6 e 7 meses, respectivamente).

A análise de VEGF foi também realizada em amostras de urina, devido à maior facilidade e menor risco na coleta desse material na faixa etária estudada. Porém, uma limitação do estudo foi a não realização de sondagem para os casos em que houvesse dificuldades de coleta, o que levou à realização de um menor número de exames de urina. A decisão de não sondar foi tomada por se tratar de crianças, a maioria das quais lactentes, o que implica na coleta utilizando saco coletor, como é habitual nessa faixa etária.

Na comparação dos valores de VEGF urinário do grupo de pacientes com HI e controles, não foram verificadas diferenças significativas. Esse resultado foi semelhante ao único estudo da literatura que avaliou este marcador ⁽¹⁶⁾.

Outro marcador relacionado à angiogênese estudado foi a MMP-9, que pode ser detectada em amostras urinárias de crianças saudáveis como consequência do remodelamento tecidual normal e, em níveis mais altos, em crianças com HI ⁽⁷³⁾. No presente estudo, embora se tenha obtido maior dosagem de MMP-9 nas amostras urinárias nos pacientes com HI, quando comparadas aos controles, essa diferença não foi significativa. Kleber et al. ⁽⁷³⁾, em 2012, também não evidenciam níveis aumentados de MMP-9 em crianças com HI.

Não há consenso, na literatura, sobre a relação dos níveis de MMP-9 e de VEGF com angiogênese aumentada nos pacientes com HI. No

presente estudo, mesmo tendo sido utilizado método mais sensível de detecção de marcadores, não se encontrou evidência de atividade angiogênica relacionada ao HI que pudesse ser mensurada no sangue periférico e na urina. Com esses dados, levantou-se a hipótese de que possa existir aumento de fatores angiogênicos locais. Estes poderiam estar mais envolvidos na patogênese do HI. Porém, os achados de Przewratil et al., em 2010, contrariam esta hipótese. Para pesquisar a importância dos fatores angiogênicos locais, os autores comparam amostras obtidas por punção, coletadas de dez hemangiomas, com as do sangue periférico. Observam níveis menores de VEGF obtido diretamente do tumor ⁽¹⁹⁾. Este é o único estudo da literatura que dosou, com método ELISA, VEGF em amostras teciduais.

No presente estudo, a MMP-2 foi indetectável em mais de 50% das amostras de urina coletadas (pacientes e controles), mesmo se utilizando técnica de análise com alta sensibilidade. Dos dados obtidos, pode-se inferir que essa metaloproteinase também não pode ser considerada um bom marcador para medida de angiogênese aumentada no HI. Esses achados contrariam Kleber et al. que detectam MMP-2 na urina dos pacientes com HI ⁽⁷³⁾. Deve-se salientar que a técnica de análise utilizada por esses autores não foi a mesma que a da presente pesquisa.

5.2 Fases de crescimento do hemangioma infantil

As fases de crescimento do HI são classificadas em proliferativa e involutiva. Essas fases são determinadas pela idade da criança. Considera-se que a fase proliferativa do HI ocorra até os 12 meses de vida. Porém, pode haver variações desse período de acordo com o tipo de lesão. Assim sendo, é mais prolongado nos casos em que o HI é do subtipo profundo, misto, ou com distribuição segmentar ⁽⁷⁾.

Em nossa casuística, no momento do diagnóstico, 97% das crianças tinham HI em fase proliferativa e 73% eram do tipo profundo e misto. Dessa forma, a grande maioria dos pacientes estava no momento ideal para se iniciar o tratamento. Nos casos em que a introdução da medicação ocorreu após os 12 meses de idade, ou seja, após o término da fase proliferativa, o tratamento foi justificado pela ação do betabloqueador na indução de apoptose, o que aceleraria a regressão do hemangioma, mesmo nesta fase mais tardia ^(78, 79).

5.2.1 Níveis plasmáticos e urinários de VEGF e níveis urinários de MMP-9

Até o momento, poucas publicações se propuseram a estudar os níveis dos marcadores nas diferentes fases de crescimento do HI. Dois estudos na literatura ^(19, 20) demonstram níveis maiores de VEGF em amostras sanguíneas de pacientes com HI na fase proliferativa, quando

comparados com pacientes com HI em involução. Já Ozeki et al. ⁽²¹⁾ não encontram essa diferença.

Em relação à MMP-9 urinária e ao VEGF urinário, não há estudos comparativos entre crianças com HI em fase proliferativa e com HI em fase de involução. O presente estudo foi o primeiro que avaliou os níveis urinários de MMP-9 e VEGF de acordo com a fase de atividade do HI.

Nos pacientes com HI deste estudo, não foi encontrada diferença significativa nos valores plasmáticos e urinários dos marcadores de acordo com a fase de crescimento do hemangioma. Assim sendo, não houve diferença entre os resultados obtidos em crianças com 12 meses ou menos em relação às crianças maiores de 12 meses de idade. Apesar da angiogênese ser mais evidente durante a fase proliferativa do HI, os níveis dos marcadores estudados no sangue e urina não refletiram essa expectativa de atividade. Com esses resultados, como já citado, seria possível inferir que os marcadores sistêmicos não são fidedignos para refletir a atividade angiogênica tecidual.

Caso a variação desses marcadores com a idade dos pacientes fosse progressiva, mas sutil, a comparação de dois grupos com idades próximas poderia influenciar a análise. Porém, no presente estudo, os dois grupos que foram comparados tinham idades médias de 6 e 24 meses, respectivamente. Essa constatação torna menos provável que a idade seja um fator importante para influenciar os níveis dos marcadores.

Como previamente demonstrado, os marcadores VEGF plasmático e urinário e MMP-9 urinária não mostraram diferença significativa entre os

grupos de crianças com HI e controles (crianças saudáveis). Esses resultados, em conjunto, favorecem a hipótese de que os marcadores não são indicadores fidedignos para refletir a atividade angiogênica no HI.

5.3 Correlação entre o tamanho (volume) do hemangioma infantil e níveis plasmáticos e urinários de VEGF e níveis urinários MMP-9

Considerando que as crianças com HI apresentam lesões de diferentes tamanhos, procurou-se testar a hipótese de que, quanto maior o hemangioma, maiores seriam os níveis de marcadores envolvidos com a angiogênese. No entanto, no presente estudo, não foi encontrada correlação entre o volume do HI e os níveis plasmáticos e urinários de VEGF e os níveis urinários de MMP-9. Era esperado que a utilização de teste mais sensível (ELISA modificado com citometria de fluxo - Luminex®) favorecesse maior detecção dos marcadores.

Os resultados obtidos em diferentes pesquisas são díspares, mesmo quando usam método semelhante (ELISA convencional e exames de imagem para avaliar o volume). Przewratil et al. ⁽¹⁹⁾ não observam influência do tamanho da lesão sobre os níveis sanguíneos de VEGF analisados, enquanto que Chen et al. ⁽²²⁾ e Ozeki et al. ⁽²¹⁾ encontram uma correlação positiva entre o volume da lesão e os níveis sanguíneos de VEGF. A obtenção de resultados diferentes, utilizando-se método similar, pode ser explicada por variações inerentes à casuística (n=52, 22 e 35, respectivamente). Provavelmente o estudo com maior número de casos seja

mais representativo, demonstrando que o tamanho do HI não se relaciona com os níveis de VEGF. No presente estudo, em 42 pacientes com HI, esta correlação também não foi encontrada, mesmo utilizando técnica de análise mais sensível.

Não há estudos na literatura que correlacionem os níveis urinários de VEGF e MMP-9 com o volume do hemangioma, não permitindo, portanto, comparações de resultados.

5.4 Correlação entre os níveis plasmáticos e urinários de VEGF e níveis urinários de MMP-9 antes do início do tratamento

A partir de trabalhos anteriores que demonstram que os níveis sanguíneos e urinários de VEGF e os níveis urinários de MMP-9 poderiam apresentar comportamentos semelhantes antes da instituição da terapêutica, procurou-se estudar a correlação entre os marcadores. Foram selecionados 42 pacientes da amostra de 68, em que se conseguiu obter resultados para todos os marcadores estudados. Surpreendentemente, observamos que a correlação entre os níveis plasmáticos e urinários de VEGF não foi significativa. Vale ressaltar que esses resultados foram obtidos do mesmo paciente, apenas variando o tipo de amostra (plasma ou urina).

Como os marcadores, VEGF plasmático e MMP-9 urinária, estão relacionados à angiogênese, se esperaria encontrar correlação entre eles no momento do diagnóstico (antes do início do tratamento), fato que não ocorreu.

Somente foi observada correlação significativa entre os níveis urinários de VEGF e de MMP-9 nos pacientes antes do tratamento. Com base nesses achados, pode-se sugerir, talvez, que a urina seja o material adequado, pela técnica utilizada, para correlacionar os marcadores. Essa indicação é importante, pois o HI incide em faixa etária pediátrica, em que a coleta do exame de sangue é mais invasiva e traumática.

5.5 Volume do hemangioma infantil, obtido pela ultrassonografia, antes e durante o tratamento com propranolol e timolol

Para o acompanhamento dos pacientes durante o tratamento, foram realizadas ultrassonografias de modo a ter medidas mais objetivas do tamanho da lesão. A maioria dos pacientes acompanhados (73%) apresentava HI com componente profundo e misto. Nesses casos, devido à profundidade da lesão, os sinais de regressão são menos evidentes ao exame clínico. Assim sendo, com a ultrassonografia, se tem possibilidade de seguimento mais objetivo das variações de tamanho (volume).

Poucos estudos avaliam a resposta ao tratamento com propranolol com a utilização de ultrassonografia para mensurar a diminuição do tamanho do hemangioma. Não há também estudos que realizem o acompanhamento ultrassonográfico da variação de tamanho do HI durante o tratamento com timolol.

Diferentemente do presente estudo, que fez o acompanhamento terapêutico por até 12 meses, os trabalhos da literatura somente o fazem por

curto período de tempo, não contemplando o período completo de tratamento⁽⁵⁴⁻⁵⁷⁾.

Na avaliação não pareada, no grupo de pacientes com HI tratados com propranolol, foi observada diminuição não significativa do volume da lesão nos grupos de até 6 meses e de 7 a 12 meses de tratamento, em relação às medidas de antes do início do tratamento. Porém, ao se avaliar os oito pacientes que realizaram os exames nas datas propostas, isto é, antes, com até 6 meses e com 7 a 12 meses de tratamento (análise pareada), a diminuição de volume do HI foi significativa. Esses resultados são mais fidedignos, já que são dados evolutivos do mesmo paciente.

Depreende-se, portanto, que, nos pacientes tratados com propranolol, a resposta esperada ao tratamento foi alcançada, com verificação objetiva da diminuição do volume do HI durante o período de seguimento. Como descrito anteriormente por Rotter et al.⁽⁵⁷⁾, o exame de ultrassonografia se mostrou uma importante ferramenta na avaliação da resposta ao tratamento.

Na avaliação não pareada, nos pacientes tratados com timolol, os grupos de até 6 meses e de 7 a 12 meses de tratamento não apresentaram variação significativa do volume das lesões pela ultrassonografia, quando se compararam as medidas com as de antes do início do tratamento. Foi observado, inclusive, aumento de tamanho do HI nas medidas de 7 a 12 meses. Os fatores que podem ter interferido nos resultados obtidos são: 78% dos pacientes apresentavam HI do tipo profundo e misto, menos responsivos ao tratamento tópico e mais bem avaliados pela ultrassonografia, e apenas 22% dos pacientes apresentavam hemangioma

do tipo superficial, mais responsivos ao tratamento tópico, embora com menor acurácia à avaliação ultrassonográfica.

A análise pareada somente foi possível em cinco pacientes com HI do tipo misto e profundo, que realizaram a ultrassonografia nos três tempos do estudo. Não se obteve variação significativa do tamanho do HI durante o tratamento com timolol. Como já citado anteriormente, a absorção do timolol é limitada nos HI do tipo profundo e misto, podendo não ter tido plena eficácia nestes doentes. Além disso, o timolol pode não ter sido aplicado corretamente pelos cuidadores, inclusive pela dificuldade de se fazer a aplicação sob oclusão, que melhoraria a absorção da medicação.

Assim sendo, considera-se que a realização da ultrassonografia, para avaliar a resposta ao tratamento do HI, é relevante, principalmente para os HIs profundos e mistos. Os resultados obtidos auxiliam na demonstração da efetividade da medicação sistêmica (propranolol) e da ação limitada da medicação tópica (timolol) no tratamento de hemangiomas desses subtipos.

5.6 Níveis plasmáticos e urinários de VEGF e níveis urinários de MMP-9 antes e durante o tratamento com propranolol

Existem três principais motivações para se estudar os níveis sanguíneos de VEGF. A primeira, para se tentar aprofundar o conhecimento sobre a patogênese do HI. A segunda, para a obtenção de um marcador clínico que possa contribuir para a tomada de decisão sobre quando interromper a terapêutica com propranolol. A terceira, para ampliar os

conhecimentos sobre o mecanismo de ação do betabloqueador no tratamento do HI, que ainda não é completamente conhecido. Atualmente, acredita-se que um dos alvos de ação dessa medicação seja a diminuição da produção de VEGF, promovendo assim, ação antiangiogênica.

No presente estudo, os níveis plasmáticos de VEGF foram discretamente maiores nas crianças com HI do que nos controles. Porém, curiosamente, não houve diferença significativa. Era de se esperar que, dosando-se um fator angiogênico, se obtivessem níveis maiores em pacientes com HI. Da mesma forma se comportou a dosagem do VEGF em amostras urinárias. Uma hipótese para explicar esses achados seria a interferência do tamanho e das diferentes fases de crescimento do HI no grupo de pacientes. Este fato poderia ter influenciado na medida dos marcadores. Porém, como previamente demonstrado, a variação dessas características não apresentou correlação positiva com o nível dos marcadores.

Diferentemente do presente estudo, que fez o acompanhamento terapêutico com a realização da ultrassonografia por até 12 meses, os trabalhos da literatura somente o fazem por curto período de tempo, nem sempre contemplando o período completo de tratamento ⁽⁵⁴⁻⁵⁷⁾. Poucos estudos avaliam a variação dos níveis sanguíneos de VEGF em pacientes com HI em tratamento com propranolol. Vale ressaltar, também, que o fazem por curto período de tempo (de até três meses) ^(21, 22, 74-76). Chen et al. ⁽²²⁾, em 2013, acompanham 22 crianças e observam uma diminuição significativa dos níveis de VEGF no sangue após um mês de tratamento com

propranolol, sendo que, após três meses, a diminuição já não é mais significativa. Do mesmo modo, Wu et al. ⁽⁷⁵⁾, em 2015, observam redução significativa dos níveis de VEGF sanguíneo após oito semanas de tratamento com propranolol.

No presente estudo, na análise não pareada com pacientes com HI tratados com propranolol, foi observada diminuição não significativa dos níveis plasmáticos de VEGF nos grupos de até 6 meses e de 7 a 12 meses de tratamento, quando comparados aos níveis basais. Já os resultados obtidos de 13 pacientes que realizaram os exames nas datas propostas (análise pareada), mostraram que, tanto até 6 meses de tratamento como de 7 a 12 meses de tratamento, ocorreu diminuição significativa dos níveis plasmáticos de VEGF em relação aos níveis basais. Esses resultados poderiam levar à afirmação de que o propranolol está contribuindo para essa diminuição. Poder-se-ia inferir que essa diminuição significativa do VEGF no plasma durante o tratamento com propranolol sinalizaria a possibilidade desse marcador ser uma ferramenta auxiliar para avaliar a resposta do HI ao tratamento.

O presente estudo não permitiu estabelecer o valor do nível plasmático que o VEGF necessita atingir (decrecer), para permitir que se descontinue o tratamento com segurança. Porém, os estudos mostram que a retirada precoce da medicação, em crianças com menos de 12 meses de idade e nos HIs profundos, mistos e segmentares, pode levar à recidiva, com retorno do crescimento da lesão ^(53, 80). Mais estudos são necessários

para se tentar obter um valor de VEGF a partir do qual, com segurança, se possa suspender a medicação.

Não há descrições prévias sobre a avaliação dos níveis urinários de VEGF durante o tratamento com betabloqueador. Neste trabalho, foi observado que no grupo de pacientes com HI tratados com propranolol, na análise não pareada, houve diminuição significativa dos níveis urinários de VEGF até 6 meses de tratamento em relação aos níveis basais. Porém, esta variação não foi observada no período de 7 a 12 meses. Já a análise pareada não mostrou variação significativa dos níveis do marcador durante o período de acompanhamento.

Apesar de se tratar do mesmo marcador, os níveis urinários de VEGF não apresentaram comportamento semelhante aos níveis plasmáticos de VEGF durante o acompanhamento terapêutico. Esse resultado pode indicar que o teste na urina é menos acurado do que no sangue para detectar a variação de VEGF com o tratamento. Também, pode estar relacionado a uma diferença amostral, uma vez que o grupo estudado para determinação do VEGF urinário foi menor do que o do plasmático (28 e 44 pacientes, respectivamente).

Alguns estudos prévios e, também, neste trabalho, tentam formular outra hipótese para explicar o mecanismo de ação do propranolol nos HI, além da inibição do VEGF. Esta medicação poderia agir diminuindo outros fatores angiogênicos, as metaloproteinases 2 e 9. Desta forma, Kleber et al.⁽⁷³⁾, em 2012, acompanham 22 crianças com HI e não encontram diferenças nos níveis urinários de MMP-9 antes e durante o tratamento. Ao contrário,

Wu et al. ⁽⁷⁵⁾, em 2015, observam redução significativa de MMP-9 sérica após duas semanas de tratamento com propranolol.

No presente estudo, nos resultados de grupos não pareados com pacientes com HI tratados com propranolol, foi observada diminuição não significativa dos níveis urinários de MMP-9 no grupo de até 6 meses e no grupo de 7 a 12 meses de tratamento, em relação aos níveis basais. Já os resultados obtidos de nove pacientes que realizaram os exames nas datas propostas (análise pareada), mostraram que, até 6 meses e de 7 a 12 meses de tratamento com propranolol, ocorreu diminuição significativa dos níveis de MMP-9, em relação aos níveis basais.

Com os resultados, pode-se inferir que a diminuição dos níveis plasmáticos de VEGF e dos níveis urinários de MMP-9 no grupo tratado com propranolol até 12 meses de tratamento seja, realmente, decorrente da terapêutica instituída. Na literatura, há divergência sobre a duração do tratamento com propranolol, de 6 até mais de 12 meses ^(1, 46, 81, 82). Observa-se que o tratamento é mais prolongado quando seu início é mais precoce (fase proliferativa do HI). Nesses casos, a maior eficácia terapêutica é evidenciada tanto pela inibição do crescimento do hemangioma, quanto pela indução da sua regressão. Já a introdução tardia da medicação, após a fase proliferativa, pode, também, acelerar a regressão do HI. É importante ressaltar, porém, que, com o tratamento introduzido nesta fase, obtêm-se resultados inferiores.

A MMP-9 urinária, neste estudo, mostrou-se tão fidedigna quanto o VEGF plasmático para o acompanhamento terapêutico dos pacientes com HI.

5.7 Níveis plasmáticos e urinários de VEGF e níveis urinários de MMP-9 antes e durante o tratamento com timolol

Em relação aos pacientes com HI tratados com timolol, não há trabalhos na literatura que estudem a variação dos níveis de VEGF (sangue e urina) e de MMP-9 (urina) antes e durante o tratamento. Na presente pesquisa, não foi observada, tanto nos grupos não pareados como nos pareados, variação significativa dos níveis plasmáticos e urinários de VEGF obtidos antes do início do tratamento em relação aos de até 6 meses e de 7 a 12 meses de tratamento. Pode-se supor que a diferença entre os resultados obtidos com as duas medicações seja devida à forma de administração e à absorção sistêmica. É de se esperar que a ação de um medicamento seja maior quando usado por via sistêmica do que tópica. Além disso, na avaliação do tamanho do HI tratado com timolol, não houve diminuição significativa do volume durante o tratamento, o que acompanhou a variação observada com as dosagens do VEGF no plasma.

Também, quando estudados os níveis urinários de MMP-9 nos pacientes com HI tratados com timolol, tanto na avaliação pareada como na não pareada, os níveis de MMP-9 aumentaram em até 6 e de 7 a 12 meses de tratamento, sem diferença significativa em relação aos valores basais.

Este aumento, embora não significativo, poderia ser explicado pela baixa absorção cutânea da medicação. De forma contrária, no grupo tratado com propranolol, os níveis de MMP-9 diminuíram significativamente durante o tratamento. Com esses resultados laboratoriais, além da evidência de melhora clínica, pode-se inferir que o propranolol contribuiu, de forma inequívoca, para a diminuição da MMP-9.

Já para se formular considerações mais fidedignas sobre a eficácia terapêutica do timolol, há necessidade de padronização da sua aplicação. O ideal seria dispor de um produto desenvolvido para uso cutâneo e não oftalmológico, em que fosse conhecida a sua real absorção pela pele.

5.8 Considerações finais

Em resumo, esta pesquisa foi pioneira no estudo dos vários fatores que podem alterar a mensuração dos marcadores de angiogênese no HI, tais como as diferentes fases evolutivas do tumor, os diversos tamanhos da lesão e o tipo de tratamento, tópico ou sistêmico. Contemplou um número expressivo de crianças com HI que foram tratadas com propranolol ou timolol, de acordo com os critérios de indicação desses tratamentos. Foi realizado acompanhamento clínico e ultrassonográfico. Os resultados obtidos, de diminuição significativa do tamanho do HI com o propranolol, foram comparáveis aos da extensa literatura sobre o tema. Os níveis de VEGF plasmático e MMP-9 urinária, obtidos através de dosagens em

diferentes períodos da terapêutica com propranolol, refletiram a ação da medicação nos HIs.

6 Conclusões

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nessa pesquisa permitem concluir que:

1. Os níveis plasmáticos e urinários de VEGF e os níveis urinários de MMP-9 não se mostraram bons marcadores de angiogênese aumentada nos pacientes com HI (em relação aos controles).

Nos pacientes com HI, antes do início do tratamento:

2. Os níveis plasmáticos e urinários de VEGF e os níveis urinários de MMP-9 não refletiram o aumento da angiogênese característica da fase proliferativa do HI.
3. Os níveis plasmáticos e urinários de VEGF e os níveis urinários de MMP-9 não tiveram relação com o tamanho (volume) do HI.
4. Os níveis urinários de VEGF e de MMP-9 apresentaram comportamento semelhante entre si, porém não houve correlação com os níveis sanguíneos de VEGF.

Nos pacientes com HI, durante o tratamento com propranolol e timolol:

5. A ultrassonografia permitiu avaliação objetiva da variação de volume do HI durante o tratamento com propranolol e timolol, principalmente nos casos com HIs profundos e mistos.

6. O tratamento com propranolol se mostrou eficaz na redução do volume do HI, enquanto que o com timolol foi menos efetivo.
7. A dosagem plasmática de VEGF pôde ser utilizada como um marcador da efetividade do tratamento sistêmico.
8. A dosagem urinária de VEGF não foi um bom marcador da resposta ao tratamento.
9. A dosagem urinária de MMP-9 mostrou ser um bom marcador da efetividade do tratamento com propranolol.
10. A dosagem plasmática de VEGF e urinária de MMP-9 podem ser ferramentas úteis no acompanhamento terapêutico dos pacientes com HI tratados com propranolol.
11. A redução do volume do HI associada à diminuição dos marcadores nos pacientes tratados com propranolol sugeriu que um dos mecanismos de ação da medicação no HI ocorra por inibição da angiogênese.

7 Referências

7 REFERÊNCIAS

1. Leaute-Labreze C, Hoeger P, Mazereeuw-Hautier J, Guibaud L, Baselga E, Posiunas G, et al. A randomized, controlled trial of oral propranolol in infantile hemangioma. *N Engl J Med*. 2015;372(8):735-46.
2. Anderson KR, Schoch JJ, Lohse CM, Hand JL, Davis DM, Tollefson MM. Increasing incidence of infantile hemangiomas (IH) over the past 35 years: Correlation with decreasing gestational age at birth and birth weight. *J Am Acad Dermatol*. 2016;74(1):120-6.
3. Chiller KG, Passaro D, Frieden IJ. Hemangiomas of infancy: clinical characteristics, morphologic subtypes, and their relationship to race, ethnicity, and sex. *Arch Dermatol*. 2002;138(12):1567-76.
4. Dickison P, Christou E, Wargon O. A prospective study of infantile hemangiomas with a focus on incidence and risk factors. *Pediatr Dermatol*. 2011;28(6):663-9.
5. Kilcline C, Frieden IJ. Infantile hemangiomas: how common are they? A systematic review of the medical literature. *Pediatr Dermatol*. 2008;25(2):168-73.
6. Tollefson MM, Frieden IJ. Early growth of infantile hemangiomas: what parents' photographs tell us. *Pediatrics*. 2012;130(2):e314-20.
7. Chang LC, Haggstrom AN, Drolet BA, Baselga E, Chamlin SL, Garzon MC, et al. Growth characteristics of infantile hemangiomas: implications for management. *Pediatrics*. 2008;122(2):360-7.

8. Sans V, de la Roque ED, Berge J, Grenier N, Boralevi F, Mazereeuw-Hautier J, et al. Propranolol for severe infantile hemangiomas: follow-up report. *Pediatrics*. 2009;124(3):e423-31.
9. Holland KE, Drolet BA. Approach to the patient with an infantile hemangioma. *Dermatol Clin*. 2013;31(2):289-301.
10. Haggstrom AN, Drolet BA, Baselga E, Chamlin SL, Garzon MC, Horii KA, et al. Prospective study of infantile hemangiomas: clinical characteristics predicting complications and treatment. *Pediatrics*. 2006;118(3):882-7.
11. Drolet BA, Esterly NB, Frieden IJ. Hemangiomas in children. *N Engl J Med*. 1999;341(3):173-81.
12. Greenberger S, Bischoff J. Pathogenesis of infantile haemangioma. *Br J Dermatol*. 2013;169(1):12-9.
13. Itinteang T, Withers AH, Davis PF, Tan ST. Biology of infantile hemangioma. *Front Surg*. 2014;1:38.
14. Boscolo E, Bischoff J. Vasculogenesis in infantile hemangioma. *Angiogenesis*. 2009;12(2):197-207.
15. Storch CH, Hoeger PH. Propranolol for infantile haemangiomas: insights into the molecular mechanisms of action. *Br J Dermatol*. 2010;163(2):269-74.
16. Marler JJ, Fishman SJ, Kilroy SM, Fang J, Upton J, Mulliken JB, et al. Increased expression of urinary matrix metalloproteinases parallels the extent and activity of vascular anomalies. *Pediatrics*. 2005;116(1):38-45.

17. Kleinman ME, Greives MR, Churgin SS, Blechman KM, Chang EI, Ceradini DJ, et al. Hypoxia-induced mediators of stem/progenitor cell trafficking are increased in children with hemangioma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27(12):2664-70.
18. Janmohamed SR, Brinkhuizen T, den Hollander JC, Madern GC, de Laat PC, van Steensel MA, et al. Support for the hypoxia theory in the pathogenesis of infantile haemangioma. *Clin Exp Dermatol.* 2015;40(4):431-7.
19. Przewratil P, Sitkiewicz A, Andrzejewska E. Local serum levels of vascular endothelial growth factor in infantile hemangioma: intriguing mechanism of endothelial growth. *Cytokine.* 2010;49(2):141-7.
20. Zhang L, Lin X, Wang W, Zhuang X, Dong J, Qi Z, et al. Circulating level of vascular endothelial growth factor in differentiating hemangioma from vascular malformation patients. *Plast Reconstr Surg.* 2005;116(1):200-4.
21. Ozeki M, Nozawa A, Hori T, Kanda K, Kimura T, Kawamoto N, et al. Propranolol for infantile hemangioma: Effect on plasma vascular endothelial growth factor. *Pediatr Int.* 2016;58(11):1130-5.
22. Chen XD, Ma G, Huang JL, Chen H, Jin YB, Ye XX, et al. Serum-level changes of vascular endothelial growth factor in children with infantile hemangioma after oral propranolol therapy. *Pediatr Dermatol.* 2013;30(5):549-53.
23. Fu Q, Zhu J, Van Eyk JE. Comparison of multiplex immunoassay platforms. *Clin Chem.* 2010;56(2):314-8.
24. Tighe PJ, Ryder RR, Todd I, Fairclough LC. ELISA in the multiplex era: potentials and pitfalls. *Proteomics Clin Appl.* 2015;9(3-4):406-22.

25. Landriscina M, Cassano A, Ratto C, Longo R, Ippoliti M, Palazzotti B, et al. Quantitative analysis of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in human colorectal cancer. *Br J Cancer*. 1998; 78(6):765-70.
26. Shibuya M. VEGF-VEGFR signals in health and disease. *Biomol Ther (Seoul)*. 2014;22(1):1-9.
27. Kerbel RS. Tumor angiogenesis. *N Engl J Med*. 2008;358(19):2039-49.
28. Murphy G, Nagase H. Progress in matrix metalloproteinase research. *Mol Aspects Med*. 2008;29(5):290-308.
29. Zhong S, Yang G, Xia C, Duanlian Z, Shan S. Expression of matrix metalloproteinase and its tissue inhibitor in haemangioma. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2009;29(5):614-9.
30. Ji Y, Chen S, Xu C, Li L, Xiang B. The use of propranolol in the treatment of infantile haemangiomas: an update on potential mechanisms of action. *Br J Dermatol*. 2015;172(1):24-32.
31. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell*. 2010;141(1):52-67.
32. Boon LM, MacDonald DM, Mulliken JB. Complications of systemic corticosteroid therapy for problematic hemangioma. *Plast Reconstr Surg*. 1999;104(6):1616-23.
33. Leaute-Labreze C, Dumas de la Roque E, Hubiche T, Boralevi F, Thambo JB, Taieb A. Propranolol for severe hemangiomas of infancy. *N Engl J Med*. 2008;358(24):2649-51.

34. Chinnadurai S, Fonnesebeck C, Snyder KM, Sathe NA, Morad A, Likis FE, et al. Pharmacologic interventions for infantile hemangioma: a meta-analysis. *Pediatrics*. 2016;137(2):e20153896.
35. Bauman NM, McCarter RJ, Guzzetta PC, Shin JJ, Oh AK, Preciado DA, et al. Propranolol vs prednisolone for symptomatic proliferating infantile hemangiomas: a randomized clinical trial. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*. 2014;140(4):323-30.
36. Bertrand J, McCuaig C, Dubois J, Hatami A, Ondrejchak S, Powell J. Propranolol versus prednisone in the treatment of infantile hemangiomas: a retrospective comparative study. *Pediatr Dermatol*. 2011;28(6):649-54.
37. Gillette P, Garson A, Eterovic E, Neches W, Mullins C, McNamara DG. Oral propranolol treatment in infants and children. *J Pediatr*. 1978;92(1):141-4.
38. Love JN, Sikka N. Are 1-2 tablets dangerous? Beta-blocker exposure in toddlers. *J Emerg Med*. 2004;26(3):309-14.
39. Guo S, Ni N. Topical treatment for capillary hemangioma of the eyelid using beta-blocker solution. *Arch Ophthalmol*. 2010;128(2):255-6.
40. McMahon P, Oza V, Frieden IJ. Topical timolol for infantile hemangiomas: putting a note of caution in "cautiously optimistic". *Pediatr Dermatol*. 2012;29(1):127-30.
41. Greenberger S, Bischoff J. Infantile hemangioma-mechanism(s) of drug action on a vascular tumor. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2011;1(1):a006460.

-
42. Lamy S, Lachambre MP, Lord-Dufour S, Beliveau R. Propranolol suppresses angiogenesis in vitro: inhibition of proliferation, migration, and differentiation of endothelial cells. *Vascul Pharmacol*. 2010;53(5-6):200-8.
43. Stiles J, Amaya C, Pham R, Rowntree RK, Lacaze M, Mulne A, et al. Propranolol treatment of infantile hemangioma endothelial cells: A molecular analysis. *Exp Ther Med*. 2012;4(4):594-604.
44. Prey S, Voisard JJ, Delarue A, Lebbe G, Taïeb A, Leaute-Labreze C, et al. Safety of propranolol therapy for severe infantile hemangioma. *JAMA*. 2016;315(4):413-5.
45. Marqueling AL, Oza V, Frieden IJ, Puttgen KB. Propranolol and infantile hemangiomas four years later: a systematic review. *Pediatr Dermatol*. 2013;30(2):182-91.
46. Hermans DJ, Bauland CG, Zweegers J, van Beynum IM, van der Vleuten CJ. Propranolol in a case series of 174 patients with complicated infantile haemangioma: indications, safety and future directions. *Br J Dermatol*. 2013;168(4):837-43.
47. Raphael MF, Breugem CC, Vlasveld FA, de Graaf M, Slieker MG, Pasmans SG, et al. Is cardiovascular evaluation necessary prior to and during beta-blocker therapy for infantile hemangiomas?: A cohort study. *J Am Acad Dermatol*. 2015;72(3):465-72.
48. Drolet BA, Frommelt PC, Chamlin SL, Haggstrom A, Bauman NM, Chiu YE, et al. Initiation and use of propranolol for infantile hemangioma: report of a consensus conference. *Pediatrics*. 2013;131(1):128-40.
49. Yu L, Li S, Su B, Liu Z, Fang J, Zhu L, et al. Treatment of superficial infantile hemangiomas with timolol: Evaluation of short-term efficacy and safety in infants. *Exp Ther Med*. 2013;6(2):388-90.

-
50. Semkova K, Kazandjieva J. Rapid complete regression of an early infantile hemangioma with topical timolol gel. *Int J Dermatol*. 2014;53(2):241-2.
51. Semkova K, Kazandjieva J. Topical timolol maleate for treatment of infantile haemangiomas: preliminary results of a prospective study. *Clin Exp Dermatol*. 2013;38(2):143-6.
52. Giachetti A, Garcia-Monaco R, Sojo M, Scacchi MF, Cernadas C, Guerchicoff Lemcke M, et al. Long-term treatment with oral propranolol reduces relapses of infantile hemangiomas. *Pediatr Dermatol*. 2014;31(1):14-20.
53. Bagazgoitia L, Hernández-Martín A, Torrelo A. Recurrence of infantile hemangiomas treated with propranolol. *Pediatr Dermatol*. 2011;28(6):658-62.
54. Kutz AM, Aranibar L, Lobos N, Wortsman X. Color Doppler ultrasound follow-up of infantile hemangiomas and peripheral vascularity in patients treated with propranolol. *Pediatr Dermatol*. 2015;32(4):468-75.
55. Bingham MM, Saltzman B, Vo NJ, Perkins JA. Propranolol reduces infantile hemangioma volume and vessel density. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2012;147(2):338-44.
56. Talaat AA, Elbasiouny MS, Elgendy DS, Elwakil TF. Propranolol treatment of infantile hemangioma: clinical and radiologic evaluations. *J Pediatr Surg*. 2012;47(4):707-14.
57. Rotter A, Samorano LP, de Oliveira Labinas GH, Alvarenga JG, Rivitti-Machado MC, Bouer M, et al. Ultrasonography as an objective tool for assessment of infantile hemangioma treatment with propranolol. *Int J Dermatol*. 2017;56(2):190-4.

58. Ritter MR, Dorrell MI, Edmonds J, Friedlander SF, Friedlander M. Insulin-like growth factor 2 and potential regulators of hemangioma growth and involution identified by large-scale expression analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(11):7455-60.
59. Vishvanath A, Itinteang T, Tan ST, Day DJ. Infantile haemangioma expresses tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), TRAIL receptors, osteoprotegerin and receptor activator for nuclear factor κ B ligand (RANKL). *Histopathology*. 2011;59(3):397-406.
60. Itinteang T, Brasch HD, Tan ST, Day DJ. Expression of components of the renin-angiotensin system in proliferating infantile haemangioma may account for the propranolol-induced accelerated involution. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2011;64(6):759-65.
61. Yu Y, Fuhr J, Boye E, Gyorffy S, Soker S, Atala A, et al. Mesenchymal stem cells and adipogenesis in hemangioma involution. *Stem Cells*. 2006;24(6):1605-12.
62. Zhang GY, Yi CG, Li X, Liang ZQ, Wang RX, Liu DE, et al. Proliferation hemangiomas formation through dual mechanism of vascular endothelial growth factor mediated endothelial progenitor cells proliferation and mobilization through matrix metalloproteinases 9. *Med Hypotheses*. 2008;70(4):815-8.
63. Kleinman ME, Tepper OM, Capla JM, Bhatt KA, Ceradini DJ, Galiano RD, et al. Increased circulating AC133+ CD34+ endothelial progenitor cells in children with hemangioma. *Lymphat Res Biol*. 2003;1(4):301-7.
64. Itinteang T, Tan ST, Guthrie S, Tan CE, McIntyre BC, Brasch HD, et al. A placental chorionic villous mesenchymal core cellular origin for infantile haemangioma. *J Clin Pathol*. 2011;64(10):870-4.

-
65. Liekens S, De Clercq E, Neyts J. Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochem Pharmacol*. 2001;61(3):253-70.
66. Greenberger S, Boscolo E, Adini I, Mulliken JB, Bischoff J. Corticosteroid suppression of VEGF-A in infantile hemangioma-derived stem cells. *N Engl J Med*. 2010;362(11):1005-13.
67. Takahashi K, Mulliken JB, Kozakewich HP, Rogers RA, Folkman J, Ezekowitz RA. Cellular markers that distinguish the phases of hemangioma during infancy and childhood. *J Clin Invest*. 1994;93(6):2357-64.
68. Frischer JS, Huang J, Serur A, Kadenhe A, Yamashiro DJ, Kandel JJ. Biomolecular markers and involution of hemangiomas. *J Pediatr Surg*. 2004;39(3):400-4.
69. Chang J, Most D, Bresnick S, Mehrara B, Steinbrech DS, Reinisch J, et al. Proliferative hemangiomas: analysis of cytokine gene expression and angiogenesis. *Plast Reconstr Surg*. 1999;103(1):1-9; discussion 10.
70. Lamoreaux WJ, Fitzgerald ME, Reiner A, Hasty KA, Charles ST. Vascular endothelial growth factor increases release of gelatinase A and decreases release of tissue inhibitor of metalloproteinases by microvascular endothelial cells in vitro. *Microvasc Res*. 1998;55(1):29-42.
71. Zhang L, Mai HM, Zheng J, Zheng JW, Wang YA, Qin ZP, et al. Propranolol inhibits angiogenesis via down-regulating the expression of vascular endothelial growth factor in hemangioma derived stem cell. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7(1):48-55.
72. Ji Y, Li K, Xiao X, Zheng S, Xu T, Chen S. Effects of propranolol on the proliferation and apoptosis of hemangioma-derived endothelial cells. *J Pediatr Surg*. 2012;47(12):2216-23.

73. Kleber CJ, Spiess A, Kleber JB, Hinz U, Holland-Cunz S, Weiss J. Urinary matrix metalloproteinases-2/9 in healthy infants and haemangioma patients prior to and during propranolol therapy. *Eur J Pediatr*. 2012;171(6): 941-6.
74. Yuan WL, Jin ZL, Wei JJ, Liu ZY, Xue L, Wang XK. Propranolol given orally for proliferating infantile haemangiomas: analysis of efficacy and serological changes in vascular endothelial growth factor and endothelial nitric oxide synthase in 35 patients. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2013;51(7): 656-61.
75. Wu S, Wang B, Chen L, Xiong S, Zhuang F, Huang X, et al. Clinical efficacy of propranolol in the treatment of hemangioma and changes in serum VEGF, bFGF and MMP-9. *Exp Ther Med*. 2015;10(3):1079-83.
76. Przewratil P, Kobos J, Wnęk A, Szemraj J, Wyrzykowski D, Chrzanowska B, et al. Serum and tissue profile of VEGF and its receptors VEGFR1/R2 in children with infantile hemangiomas on systemic propranolol treatment. *Immunol Lett*. 2016;175:44-9.
77. Sans V, de la Roque ED, Berge J, Grenier N, Boralevi F, Mazereeuw-Hautier J, et al. Propranolol for severe infantile hemangiomas: follow-up report. *Pediatrics*. 2009;124(3):e423-31.
78. Zvulunov A, McCuaig C, Frieden IJ, Mancini AJ, Puttgen KB, Dohil M, et al. Oral propranolol therapy for infantile hemangiomas beyond the proliferation phase: a multicenter retrospective study. *Pediatr Dermatol*. 2011;28(2):94-8.
79. Vivas-Colmenares GV, Bernabeu-Wittel J, Alonso-Arroyo V, Matute de Cardenas JA, Fernandez-Pineda I. Effectiveness of propranolol in the treatment of infantile hemangioma beyond the proliferation phase. *Pediatr Dermatol*. 2015;32(3):348-52.

80. Ahogo CK, Ezzedine K, Prey S, Colona V, Diallo A, Boralevi F, et al. Factors associated with the relapse of infantile haemangiomas in children treated with oral propranolol. *Br J Dermatol*. 2013;169(6):1252-6.

81. Sanchez-Carpintero I, Ruiz-Rodriguez R, Lopez-Gutierrez JC. [Propranolol in the treatment of infantile hemangioma: clinical effectiveness, risks, and recommendations]. *Actas Dermosifiliogr*. 2011;102(10):766-79.

82. Saint-Jean M, Leaute-Labreze C, Mazereeuw-Hautier J, Bodak N, Hamel-Teillac D, Kupfer-Bessagnet I, et al. Propranolol for treatment of ulcerated infantile hemangiomas. *J Am Acad Dermatol*. 2011;64(5):827-32.

8 Anexos

ANEXO 1 – Carta de Aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq- 042/2012) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

PROJETO DE PESQUISA

Título: AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DO FATOR DE CRESCIMENTO DO ENDOTÉLIO VASCULAR E DOS NÍVEIS URINÁRIOS DE METALOPROTEINASES 2 E 9 EM PACIENTES COM HEMANGIOMA INFANTIL DURANTE E APÓS O TRATAMENTO COM BETABLOQUEADOR

Pesquisador Responsável: Zilda Najjar Prado de Oliveira

Versão: 2

Pesquisador Executante: Anita Rotter

CAAE: 06656012.6.0000.0068

Finalidade Acadêmica: Doutorado

Instituição: HCFMUSP

Departamento: DERMATOLOGIA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 9621

Número do Parecer: 140.498

Data da Relatoria: 07/11/2012

Apresentação do Projeto: Já relatado.

Objetivo da Pesquisa: Já relatado.

Avaliação dos Riscos e Benefícios: Os autores esclareceram como serão recrutados os controles com hemangioma e sem tratamento e sem hemangioma e incluíram no TCLE os riscos do propranolol. Esclareceram também porque alguns pacientes com hemangioma não serão tratados com propranolol.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: As dúvidas levantadas pelo parecer do Comitê de Ética em Pesquisa foram todas esclarecidas pelos autores e foi elaborado o TCLE para os controles sem hemangioma, que está adequado para o seu propósito. Também foi modificado o TCLE dos participantes com hemangioma.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: Foram descritos os critérios de inclusão e exclusão das crianças no estudo.

Recomendações: Já relatado anteriormente e foram acatadas pelos pesquisadores.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: O estudo com as modificações apresentadas está de acordo com os preceitos de ética em pesquisa e será muito útil para o acompanhamento dos pacientes com hemangioma infantil.

Situação do Parecer: Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP: Não

Considerações Finais a critério do CEP: Aprovado

São Paulo, 08 de Novembro de 2012

Prof. Dr. Luiz Eugênio Garcez Leme
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa-CAPPesq

Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5º andar
CEP 05403-010 - São Paulo - SP.

55 11 2661-7585 - 55 11 2661-6442 ramais: 16, 17, 18 | marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

ANEXO 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU
RESPONSÁVEL LEGAL**

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐

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

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

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

2. RESPONSÁVEL LEGAL

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

DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M ☐ F ☐

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

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

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

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA **Avaliação dos níveis séricos do fator de crescimento do endotélio vascular e dos níveis urinários de metaloproteinases 2 e 9 em pacientes com hemangioma infantil durante e após o tratamento com betabloqueador**

2. PESQUISADOR: **DRA ZILDA NAJJAR PRADO DE OLIVEIRA**

CARGO/FUNÇÃO: DOCENTE -MÉDICA SUPERVISORA DO AMBULATÓRIO DE DERMATOLOGIA PEDIÁTRICA

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL DE MEDICINA: Nº 30.190

UNIDADE DO HCFMUSP: DEPARTAMENTO DE DERMATOLOGIA

2º. PESQUISADORA: **DRA ANITA ROTTER**

CARGO/FUNÇÃO: MÉDICA DO AMBULATÓRIO DE DERMATOLOGIA PEDIÁTRICA

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL DE MEDICINA: Nº 112.830

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO (X)

RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐

RISCO MAIOR ☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 3 ANOS

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

1 – A sua criança está sendo convidado (a) a participar de um estudo que tem como objetivo aprimorar e otimizar o acompanhamento de crianças com hemangioma em tratamento com o propranolol ou timolol. Com isso, visamos estabelecer critérios objetivos para determinar a duração do tratamento com a medicação.

De acordo com a indicação do médico, será orientado o uso do propranolol, timolol ou a observação do hemangioma com acompanhamento clínico.

2 – Alguns cuidados já lhe foram explicados em relação ao uso do propranolol. Porém iremos lembrá-los: a medicação deve ser dada pela manhã e após o horário do almoço. Após uma hora do remédio, você deve oferecer para a criança, algo para beber ou comer. Fique atento se a criança ficar mais quieta ou muito sonolenta, se isso ocorrer, você deve oferecer imediatamente a mamadeira. Quando a criança ficar com gripe, se houver chiado no peito, você deve suspender a medicação. Sempre avisar os médicos que a criança está fazendo esse tratamento.

3 – Em relação à aplicação do timolol na lesão, esses efeitos colaterais não são observados. Você deve aplicar o remédio na lesão 2 vezes ao dia.

4 – Serão realizadas 3 coletas de sangue por punção periférica e 3 coletas de urina através da utilização de saco coletor para dosagem de marcadores sanguíneos e urinários que estão relacionados ao crescimento do hemangioma. Coletaremos esses exames três vezes, no início, meio e final do tratamento.

5 – Serão realizadas ultrassonografias com doppler para melhor avaliação dos hemangiomas e definição do seu tamanho e sua profundidade.

6 – Durante a coleta de sangue, sente-se uma picada e pode haver a ocorrência de leve hematoma que se resolverá em dias. Para exame de urina, coloca-se um saco coletor e aguarda-se a criança urinar espontaneamente. A ultrassonografia corresponde a um exame em que se passa um aparelho sobre a lesão e visualiza-se no computador.

7 – Benefícios para o participante: através desses exames, definir em que fase de crescimento encontra-se a lesão, podemos otimizar o tratamento se em uso, e indicar com maior precisão o melhor momento de parar da medicação. Assim, diminuimos a chance do hemangioma voltar a crescer após a suspensão do tratamento.

8 – Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a **Dra Zilda Najjar Prado de Oliveira** e a segunda investigadora a **Dra Anita Rotter** que podem ser encontradas no endereço Departamento de Dermatologia do HCFMUSP. Telefone(s): 2661-7936. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 – e-mail: cappesq@hcnet.usp.br

9 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

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

10 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;

11 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

12 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.

13 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo: Avaliação dos níveis séricos do fator de crescimento do endotélio vascular e dos níveis urinários de metaloproteinases 2 e 9 em pacientes com hemangioma infantil durante e após o tratamento com betabloqueador”

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

Assinatura do paciente/representante legal Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha Data ____ / ____ / ____

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

(Somente para o responsável do projeto)

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

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____ / ____ / ____

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

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

DADOS SOBRE A PESQUISA

3. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA **Avaliação dos níveis séricos do fator de crescimento do endotélio vascular e dos níveis urinários de metaloproteínases 2 e 9 em pacientes com hemangioma infantil durante e após o tratamento com betabloqueador**
4. PESQUISADOR PRINCIPAL: **DRA ZILDA NAJJAR PRADO DE OLIVEIRA**
CARGO/FUNÇÃO: DOCENTE -MÉDICA SUPERVISORA DO AMBULATÓRIO DE DERMATOLOGIA PEDIÁTRICA
INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL DE MEDICINA: Nº 30.190
UNIDADE DO HCFMUSP: DEPARTAMENTO DE DERMATOLOGIA
- 2º. PESQUISADORA: **DRA ANITA ROTTER**
CARGO/FUNÇÃO: MÉDICA DO AMBULATÓRIO DE DERMATOLOGIA PEDIÁTRICA
INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL DE MEDICINA: Nº 112.830
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:
RISCO MÍNIMO (X)	RISCO MÉDIO ☐
RISCO BAIXO ☐	RISCO MAIOR ☐
4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 3 ANOS

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

1 – Durante essa coleta de exame de sangue da sua criança, pedimos a sua autorização para que uma parte do sangue que está sendo coletado seja utilizado como controle num estudo que ajudará crianças portadoras de hemangioma.

Se a sua criança estiver coletando urina, pedimos a sua autorização para enviar parte da urina coletada para realização de outro exame que também será utilizado para dosagem de marcadores urinários que estão relacionados ao crescimento do hemangioma.

A sua criança, não portadora de hemangioma, cederá parte do exame de sangue e urina. Os exames realizados com essas amostras serão considerados normais e servirão como valores de referência para auxiliar uma pesquisa que estudará crianças com hemangioma.

2 – Convidamos assim a sua criança a participar como voluntário controle de um estudo que tem como objetivo aprimorar e otimizar o acompanhamento de crianças com hemangioma em tratamento com o propranolol ou timolol. Com isso visamos estabelecer critérios objetivos para determinar a duração do tratamento com a medicação.

3 – Durante a coleta de sangue, sente-se uma picada e pode haver a ocorrência de leve hematoma que se resolverá em dias. Para exame de urina, coloca-se um saco coletor e aguarda-se a criança urinar espontaneamente.

4 – Não haverá benefícios para sua criança, porém esse benefício será para as crianças que possuem o hemangioma.

Os exames da sua criança nós ajudará a estabelecer os valores de referência dos exames, que são considerados normais de acordo com a idade da criança.

Através desses exames, podemos otimizar o tratamento, definir em que fase de crescimento encontra-se a lesão e indicar com maior precisão o melhor momento de parar da medicação. Assim, diminuimos a chance do hemangioma voltar a crescer após a suspensão do tratamento.

5 – Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a **Dra Zilda Najjar Prado de Oliveira** e a segunda investigadora a **Dra Anita Rotter** que podem ser encontradas no endereço Departamento de Dermatologia do HCFMUSP. Telefone(s): 2661-7936. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 – e-mail: cappesq@hcnet.usp.br

6– É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

7 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;

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

8 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

9 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.

10 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo: Avaliação dos níveis séricos do fator de crescimento do endotélio vascular e dos níveis urinários de metaloproteinases 2 e 9 em pacientes com hemangioma infantil durante e após o tratamento com betabloqueador”

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

Assinatura do paciente/representante legal Data ____/____/____

Assinatura da testemunha Data ____/____/____

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

(Somente para o responsável do projeto)

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

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____/____/____

ANEXO 3 – Dados do grupo controle

GRUPO CONTROLE	idade (meses)	sexo	VEGF plasma antes	VEGF urina antes	MMP-9 urina antes
2	14	F	25,98		
3	4	F	94,46		
7	16	F	63,58	32,17	49,01
8	14	F	7,01	461,88	726,87
13	20	F	212,35		
16	8	M	21,79	161,13	262,27
23	14	M	132,73	2918,00	719,09
27	2	M	469,43	85,33	6,35
30	5	F	13,00	414,82	134,04
32	31	M	162,23	348,82	23,68
56	6	F	95,10		
57	5	M	5,48	68,71	3,96
61	5	F	2,01	103,70	66,18
63	21	F	7,27	74,93	4,49
68	11	M	60,34	24,34	4,42
70	3	F	20,27	115,30	1190,48
74	9	F	7,82		
81	24	F	182,13		
82	7	F	41,75		
84	5	M	12,35		
87	28	F	1,29		
90	18	F	28,27	35,11	19,68
91	3	F	89,11	71,76	65,05
97	13	F	5,28	122,21	0,00
98	13	F	5,72	126,43	104,99

F: feminino, M: masculino,

VEGF: fator de crescimento do endotélio vascular, MMP-9: metaloproteinase 9.

ANEXO 4 – Dados dos pacientes com hemangioma infantil tratados com timolol

GRUPO TIMOLOL	idade (meses)	sexo	cor	premature	início sintomas (semanas)	localização	único/ múltiplo	face/ não face	subtipo	volume antes	volume 6m	volume 7-12m	VEGF plasma antes	VEGF plasma 6m	VEGF plasma 7-12m	VEGF urina antes	VEGF urina 6m	VEGF urina 7-12m	MMP-9 urina antes	MMP-9 urina 6m	MMP-9 urina 7-12m
1	10	M	P	não	2	dorso	único	não face	misto	7,65			7,94			140,90			162,11		
9	20	F	B	não	8	glúteo	único	não face	misto	1,77	1,09	1,28	16,64	5,58	8,24		7,05	86,87	42,90	14,91	12,23
15	6	F	B	não	0	fronte	único	face	sup	0,41		0,19	22,23		50,55	259,76		4,53	471,96		0,00
13	10	M	B	não	0	MS	único	não face	sup	0,15			19,78								
29	26	M	B	sim	4	CC	único	face	sup	0,22			13,51			478,53			37,34		
31	4	M	B	não	0	CC	único	face	misto	1,31		0,18	73,43		18,95				8,03		0,00
35	4	F	B	não	4	maxila	único	face	misto	1,89	2,90	3,93	16,71	7,80	9,42	164,42	25,19	49,75	15,02	208,35	359,22
36	27	F	B	não	2	MS	único	não face	misto	0,36	0,10	0,13	55,80	32,61	11,69	8,32	38,56	129,66	0,00	381,91	0,00
37	31	F	B	não	0	MS	único	não face	misto	12,00			38,08			296,48			377,00		
38	10	F	B	não	4	vulva	múltiplo	não face	misto	1,64			26,76			16,46			0,41		
39	13	F	P	não	4	fronte	único	face	misto	1,59	1,61	0,88	7,65	7,19	2,37		5,37	97,24		412,70	642,94
47	5	F	B	não	0	tórax	múltiplo	não face	sup	0,04			13,66			170,04			0,00		
53	8	F	B	não	8	vulva	único	não face	misto	0,20	0,22		53,41	7,88			18,19		31,73	33,60	
58	9	F	P	sim	8	CC	múltiplo	face	misto	1,43			40,16			73,77			17,55		
59	11	F	P	não	0	CC	múltiplo	face	misto	0,88			83,27			52,51			0,00		
69	4	F	P	não	4	dorso	único	não face	misto	0,39			103,70	68,71		60,34			22,37		
76	3	F	B	sim	4	CC	único	face	misto	0,44	0,42		53,09	61,59		24,53	263,79		116,30	499,73	
78	36	F	B	não	8	maxila	único	face	sup	0,32	0,42		30,07	19,63	13,64	345,62	120,98	555,83	971,35	212,76	9834,19
80	15	F	P	sim	8	dorso	único	não face	prof	1,90	11,90	3,85	17,63	23,18	18,09	228,06	382,59	246,38	0,00	22,82	190,13
88	6	F	P	sim	4	CC	único	face	misto	0,32	0,47		5,09	1,62							
94	10	F	B	não	4	MS	único	não face	misto	7,80			6,23			493,31			44,64		
101	3	F	B	não	0	CC	único	face	misto	0,22	0,21		14,42	26,60		329,25	881,46		111,34	436,92	
104	20	F	P	não	4	vulva	único	não face	misto	0,08			8,92			2957,00			138,73		

VEGF: fator de crescimento do endotélio vascular; MMP-9: metaloproteinase 9; F: feminino; M: masculino; P: parda; B: branca; MS: membro superior; CC: couro cabeludo; sup: superficial; prof: profundo

ANEXO 5 – Dados dos pacientes com hemangioma infantil tratados com propranolol

GRUPO PROPRANOLOL	idade meses)	sexo	cor	premature	início sintomas (semanas)	localização	único/ múltiplo	face/ não face	subtipo	volume antes	volume 6m	volume 7-12m	VEGF plasma antes	VEGF plasma 6m	VEGF plasma 7-12m	VEGF urina antes	VEGF urina 6m	VEGF urina 7-12m	MMP-9 urina antes	MMP-9 urina 6m	MMP-9 urina 7-12m
4	32	F	P	não	12	lábio	único	face	misto	1,22		1,23	109,34		40,80				317,61		10,63
5	5	F	B	não	8	MS	único	não face	misto	0,43			75,97								
6	7	F	Pr	não		lábio	único	face	misto	0,17	0,14		53,64	38,25		79,00	58,00		796,64	1207,75	
10	3	F	B	não	1	pálpebra	múltiplo	face	misto	0,14			41,75	5,27		175,17	35,66		1947,90	82,77	
11	39	F	B	não	12	lábio	único	face	misto	0,69		0,57	20,55		11,69	226,21		66,70			249,96
12	3	F	P	não	8	lábio	único	face	misto	0,25		0,04	20,27		19,77				144,98		15765,00
17	3	M	B	sim	3	fronte	múltiplo	face	misto	0,23			85,33			103,89			19,01		
19	4	F	Pr	não	1	segmentar	único	face	misto	12,00			14,81	20,27	2,19	90,00	187,79	259,76	804,95	369,25	114,16
22	3	F	B	não	4	barba	único	face	misto	12,00	12,00	12,00	232,56	192,29	51,34	119,99		24,75	9920,00	4460,00	609,27
24	3	M	Pr	não	2	pescoço	único	face	misto	1,03		0,15	34,55		13,64			0,00			17,22
25	15	F	B	sim	12	fronte	único	face	misto	5,85			197,78			4,77			23,23		
26	7	F	B	não	4	maxila	único	face	misto	2,18		1,63	10,19		15,95	126,92		69,52	14,24		7,65
28	7	M	P	não		pálpebra	único	face	misto	0,90			78,35						25,39		
33	31	M	P	não	0	períneo	múltiplo	não face	misto	12,00			16,47								
34	2	F	B	sim	1	nasal	único	face	misto	1,01	0,71	0,20	14,57	6,31	3,24	190,64	16,02		260,29	5,24	
40	11	M	P	não	2	lábio	único	face	misto	1,80	0,72		30,83			38,70			8,94	3,52	
41	3	F	B	não	6	segmentar	único	face	misto	12,00		12,00	143,41	19,63	15,68			185,98	2108,71		656,11
42	6	M	B	sim	8	MS	único	não face	misto		10,60	6,00	20,92	20,55	28,27	63,42	26,74	131,61	0,00	0,00	4,42
44	2	F	P	sim	1	lábio	único	face	misto	3,30	3,10		59,05	32,19		189,00			1797,00		
45	3	F	B	não	1	tórax	múltiplo	não face	prof	1,24		0,58	193,59		118,58				122,13		
46	16	F	B	não	2	barba	único	face	misto	12,00		12,00			15,98			25,19	123,36		123,36
48	22	F	B	não	8	dorso	único	não face	misto	6,05		4,93	28,29		5,62			184,43			140,76
49	5	F	B	não	8	maxila	único	face	prof	12,00		12,00	29,40		2,37	174,14		169,02	32,67		0,00

Continua

VEGF: fator de crescimento do endotélio vascular; MMP-9: metaloproteinase 9; F: feminino; M: masculino; P: parda; B: branca; Pr: preta; prof: profundo

ANEXO 5 – Dados dos pacientes com hemangioma infantil tratados com propranolol (continuação)

GRUPO PROPRANOLOL	idade meses)	sexo	cor	premature	início sintomas (semanas)	localização	único/ múltiplo	face/ não face	subtipo	volume antes	volume 6m	volume 7-12m	VEGF plasma antes	VEGF plasma 6m	VEGF plasma 7-12m	VEGF urina antes	VEGF urina 6m	VEGF urina 7-12m	MMP-9 urina antes	MMP-9 urina 6m	MMP-9 urina 7-12m
50	4	F	P	sim	2	segmentar	único	face	misto	12,00	12,00	12,00	42,21	7,05	44,26	313,00	55,28	44,94	1058,20	9,53	8,68
51	6	F	B	sim	4	nasal	único	face	misto	0,84		0,03	113,32		13,14	179,53		79,94	692,00		482,00
52	12	F	P	não	2	vulva	único	não face	misto	0,33	0,14	0,20	52,93	165,08	44,16			79,94	67,30	38,89	28,56
54	5	M	B	não	2	lábio	único	face	misto	0,08			11,07			108,11			36,88		
60	7	F	B	não	4	maxila	único	face	misto				16,64			229,65			2110,56		
62	10	F	P	sim	0	vulva	único	não face	misto	0,21		0,10	204,67		73,56	108,44		11,51	58,80		54,90
64	7	F	B	não	2	lábio	único	face	misto	0,15			95,98								
66	6	M	B	não	4	pálpebra	único	face	misto	0,24	0,25	0,19	34,93	38,40	74,93	225,42	130,90	70,22	542,84	215,01	10,02
71	9	F	B	não	4	vulva	único	não face	misto	0,07	0,08		32,88	15,03		17,11	41,08		38,58	23,82	
73	6	F	P	sim	8	maxila	múltiplo	face	misto	5,39	2,12	1,80	11,09	38,67	28,48	43,80	25,63	25,86	173,94	10,55	97,45
75	4	F	B	não	4	segmentar	único	face	prof	2,55		1,66	18,13		1,01	49,98		526,43	4,88		189,10
77	6	F	P	sim	4	pálpebra	múltiplo	face	prof	5,30	1,32		12,00			119,99	68,11		203,49	118,76	
83	15	F	B	não	4	mama	único	não face	prof	7,36	3,30		8,84			83,76	4,74		63,05	0,00	
86	22	F	P	não	8	maxila	único	face	misto	0,50	0,18	0,20	46,88	17,96	17,14		50,21	83,52		73,36	31,98
92	2	F	P	não	2	pálpebra	único	face	misto	0,57		1,30	10,64		11,09						
93	7	F	B	não	4	lábio	único	face	misto	0,39		0,16	16,31		12,30			52,28			329,15
95	40	F	B	não	2	lábio	único	face	misto	1,74	1,11	0,89	30,35	15,98	6,61	48,18	27,40	26,30	5,65	0,00	23,16
96	1	F	B	não	4	mama	único	não face	misto	4,99	4,50		125,60	85,50					77,92	194,58	
99	4	M	B	não	2	nasal	único	face	misto	0,07	0,13	0,03	11,85	9,74	39,98	152,49	216,73	174,41	64,68	14,24	3,96
100	12	F	P	não	8	lábio	único	face	prof	1,82	1,51	0,70	25,98	24,68	241,37	185,98	20,42		184,75	5,69	
102	13	F	P	não	2	lábio	único	face	misto	2,00			0,59								

VEGF: fator de crescimento do endotélio vascular; MMP-9: metaloproteinase 9; F: feminino; M: masculino; P: parda; B: branca; Pr: preta; prof: profundo

9 Apêndices

APÊNDICE 1 - Publicação: Rotter A, Samorano LP, Labinas GH, Alvarenga JG, Rivitti-Machado MC, Bouer M, Santos PCC, Silvestre DAM, Oliveira ZNP. Ultrasonography as an objective tool for assessment of infantile hemangioma treatment with propranolol. *International Journal of Dermatology*. 2016;6(2):190-194.

International Journal of
Dermatology

Report

Ultrasonography as an objective tool for assessment of infantile hemangioma treatment with propranolol

Anita Rotter¹, MD, Luciana Paula Samorano¹, MD, Gláucia Helena de Oliveira Labinas¹, MD, Juliana Gobbi Alvarenga¹, MD, Maria Cecília Rivitti-Machado¹, MD, Márcio Bouer², MD, Paulo C. C. Santos³, PhD, Daniel A. M. Silvestre³, PhD, and Zilda Najjar Prado de Oliveira¹, MD, PhD

¹Department of Dermatology, ²Department of Radiology, and ³Department of Laboratory of Medical Investigation, University of São Paulo Medical School, São Paulo, Brazil

Correspondence

Anita Rotter, MD
Av. Dr. Eneas de Carvalho Aguiar, 255,
3º andar, Cerqueira Cesar
CEP: 05403-900. São Paulo – SP
Brazil
E-mail: anita.rotter@gmail.com

Funding: This study has no funding support.

Conflicts of interest: None.

doi: 10.1111/ijd.13442

Abstract

Background Infantile hemangiomas (IHs) are the most common benign vascular tumors of childhood. Propranolol is an effective drug in treating IH. A reliable and complementary instrument is necessary to evaluate IH response to propranolol in addition to clinical and photographic assessments. Ultrasonography is a simple and non-invasive technique that enables precise measurements of tumor size and contributes to objective follow-up.

Objective To demonstrate the use of serial ultrasonography as an adjunctive tool for assessment of IH treatment with propranolol.

Patients and methods A retrospective study of 19 patients with IH treated with propranolol was conducted from January 2009 to March 2014. Data of individual IH volume at the beginning and at least 6 months after the onset of treatment and overall volume reduction by ultrasonographic measurement were obtained.

Results We observed a statistically significant IH volume reduction of approximately 0.51 cm³. This volume corresponds to an average reduction of 47% in the final volume compared with the initial volume.

Conclusion Ultrasonographic measurements contribute to demonstrate tumor regression and IH response to propranolol. Thus, ultrasonography is an important instrument to guide therapeutic strategies.

Introduction

Infantile hemangiomas (IHs) are the most common benign tumors of childhood, with an estimated prevalence of 10–12% in the general population.¹ They occur most frequently in premature babies and women. Eighty percent of patients present with a single lesion. The main areas affected are the head, neck, trunk, and extremities.² Most lesions appear during the first weeks of life, although 30% are already present at birth.³

These hemangiomas are classified based on their depth: superficial, deep, and mixed. The most rapid growth of IH occurs between 5.5 and 7.5 weeks of age.^{4,5} The proliferative phase can last up to 6 months of age. This phase is followed by stabilization (plateau) and then spontaneous regression (involution), which is estimated to occur after the first year of age.²

Most cases of IHs do not require treatment, but approximately 10% demand immediate intervention because of the inherent risks associated with tumor growth (complicated IHs), such as airway obstruction, ulceration, bleeding, visual impairment, congestive heart failure, and permanent disfigurement.

The treatment goal of IHs is to inhibit the growth and/or induce rapid regression of the lesion.^{1,3}

In 2008, Léauté-Labrèze *et al.*⁶ first described the clinical use of propranolol in IH. Treatment for IHs should be given in the proliferative phase and continued until no response is observed or until the lesion is completely involuted.^{7,8} Adverse effects of treatment include asymptomatic hypotension, hypoglycemia, bradycardia, bronchoconstriction, sleep disturbances, diarrhea, gastroesophageal reflux, and acrocyanosis.⁹

In follow-up visits, patients are subjected to full clinical evaluation, including observation on the clinical characteristics of the lesion, such as color changes and size reduction.^{7,10,11} Previously published data showed that image examinations, such as magnetic resonance imaging and ultrasound, contribute to treatment evaluation.^{3,12–14} Ultrasound is a non-invasive and simple method that provides precise measurements of tumor size, thickness, and volume. This method enables evaluation of skin layers involved, contiguous affected anatomical structures, and vascularization with Doppler technique.

Volumetric measurements are well suited to determine lesion size. Lesions often possess deep components that may be

difficult to assess using two-dimensional measurements, such as diameter and surface area. This study aimed to demonstrate the use of serial ultrasonography as an adjunctive tool for the assessment of IH treatment with propranolol.

Patients and methods

A retrospective study of 19 patients with IH was performed by analyzing their medical records. The study was conducted from January 2009 to March 2014 at the Pediatric Dermatology Clinic of Hospital das Clínicas of the University of São Paulo Medical School, Brazil.

All patients with IH who required propranolol treatment and underwent sequential ultrasonography evaluation were reviewed. Parents provided informed consent for the use of propranolol for IH treatment.

All procedures performed in this study were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

Data regarding the following parameters were collected: sex; self-declared ethnicity; topography and clinical characteristics of the lesion; predisposing factors; age at the

onset of treatment; side effects; individual IH volume at the beginning and at least 6 months after the onset of treatment; and overall volume reduction by ultrasonographic measurement.

The initial dose of propranolol was 1 mg/kg per day. In the absence of adverse events, the dose was increased to 2 mg/kg per day after 1 week and maintained until no further clinical and/or ultrasonographic regression of the lesion was observed. Propranolol was administered during daytime hours, followed by feeding shortly after administration. Parents were instructed to ensure that their child is fed regularly and to avoid prolonged fasts. The treatment duration for each patient ranged from 6 to 30 months. Therapeutic response was evaluated every 2–3 months by means of clinical examination, photographic images, and ultrasonographic measurements. IH volume was determined at the beginning and end of the study period. Ultrasonography was performed to measure tumor size. Color Doppler ultrasound was also conducted in every examination. The IH volume was measured in longitudinal, transverse, and anteroposterior axes in each hemisphere, and a correction factor of 0.5 was applied. All examinations were performed by a single experienced observer. A Toshiba Aplio XG ultrasound machine (Toshiba Medical Systems, Tokyo, Japan) with an

Table 1 Clinical, demographic data of the patients and individual volume reduction of infantile hemangioma during the treatment period

Case	Gender	Age at onset of treatment (months)	Location	Hemangioma subtype	Follow up period studied (months)	Initial volume (cm ³)	Final volume (cm ³)	Volume reduction (%)
1	F	32	Upper lip	Mixed	12	1.48	1.22	18
2	F	3	Lower lip	Mixed	15	0.26	0.04	85
3	F	1	Hemiface	Mixed	15	0.82	0.31	62
4	M	6	Neck	Mixed	9	1.38	0.15	89
5	M	7	Upper eyelid	Mixed	6	0.92	0.43	53
6	F	6	Lower lip and thorax	Deep	12	3.88	1.71	56
7	F	6	External auditory canal	Deep	6	5.16	2.93	43
8	F	7	Labium majus	Mixed	12	0.98	0.17	83
9	F	2	Periauricular	Mixed	21	5.87	0.89	85
10	F	8	Labium majus	Superficial	9	0.21	0.11	47
11	F	10	Labium majus	Mixed	6	0.21	0.10	55
12	F	7	Upper lip	Deep	6	0.15	0.07	50
13	F	48	Thorax and thigh	Mixed	9	0.46	0.32	31
14	F	3	Nose	Mixed	30	1.57	1.56	0.80
15	F	41	Lower lip and mandible	Mixed	18	0.68	0.23	66
16	M	5	Thigh	Mixed	15	0.12	0.08	32
17	F	14	Malar	Superficial	12	0.52	0.18	64
18	F	3	Upper eyelid	Mixed	6	0.58	0.40	30
19	F	2	Breast	Mixed	15	4.99	2.69	46

F, female; M, male.

intraoperative probe PLT-1202S of variable frequency (7–14 MHz) was used in this study.

Statistical analysis was performed using absolute and relative frequency for categorical variables and mean and standard deviation (SD) for numerical variables. Numerical variables were evaluated for normality using the Shapiro–Wilk test. Based on the results of the statistical analysis, we used the Wilcoxon signed-rank test to compare the measurements obtained at the beginning and at the end of the study period. Only the final measurements of the time-series treatments were considered. The global reduction volume range of IH was also calculated. In all cases, $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Nineteen patients aged 1–48 months (mean age: 10 months; SD ± 10) were included in the study. Seventeen patients were women (89%). Thirteen patients were Caucasian (68%), and six were Afro-Brazilian (32%). Treatment was initiated at a mean age of 11 months (range: 1 month–4 years old); treatment was initiated at age 6 months or younger (53%) for 10 patients. The topographical distribution of IH was as follows: 12 lesions on the face and neck; three on the genital area; and four in other

locations (Table 1). None of the patients had a twin or associated congenital malformations.

Among the 19 patients analyzed, two (10%) had superficial IH; three (16%) deep IH; and 14 (74%) mixed IHs.

Based on the clinical and photographic assessments, we observed significant lesion improvement with attenuation of staining, fading, and reduction in tumor size. Ultrasonographic evaluations showed IH volume reduction (Figs. 1 and 2).

Comparison results of ultrasonographic volume measurements of IH revealed reduction in individual volume and a statistically significant reduction in the overall volume during the study period ($P < 0.01$). The difference in IH volume was 0.51 cm^3 , which corresponds to an average reduction of 47%. During the treatment period, individual volume reductions of IH varied from 0.8% to 89% (Table 1; Figs. 1 and 2).

No adverse events were associated with the use of propranolol, and no patient interrupted the treatment.

Discussion

A significant clinical improvement of lesions with attenuation of staining and reduction in lesion size was observed, as indicated by ultrasonographic measurements. Patients were followed up for a period of 6–30 months and maintained uninterrupted

Figure 1 Case 17. (a) Clinical image at the onset of the treatment. (b) After 6 months of continuous treatment. (c) After 1 year. (d) Color Doppler ultrasonography at the onset of treatment (e) After 6 months. (f) After 1 year

regression of the tumor is not evident, and early drug suspension can lead to rebounds in tumor growth.

Another important aspect that should be considered in tumor measurements is patient tolerance. Younger children can typically tolerate examination well, but several patients still cry, which leads to a false increase in tumor measurements by ultrasound due to vasodilatation. In ideal conditions, children must be calm during the examination. Therefore, it is important that ultrasonography for IH be performed by a knowledgeable and experienced sonographer.

The absence of a control group and the small number of patients are limitations of this study. The lack of control lesions without propranolol treatment is justified by the ethical indications of treatment. The complications and risks of IHs were considered.

The patients were followed up for 6–30 months and maintained uninterrupted therapy. We observed a decrease of 47% in the average volume of lesions at the end of each individual follow-up period; this result is similar to those of previous studies. Notably, most of the patients in this study were less than 6 months old during their first treatment, which theoretically excludes the effect of spontaneous regression of IH as a confounding factor in the analysis of results.

Conclusion

This study investigated the use of ultrasonography as an objective tool for the evaluation of IH treatment with oral propranolol. We observed a significant total volume reduction of lesions after 6–30 months of continuous treatment, as indicated by ultrasonographic measurements. Ultrasonography provides valuable information that can contribute to better evaluation of the IH response to oral propranolol and enables a more accurate decision regarding treatment duration.

References

- Hermans DJ, Bauland CG, Zweegers J, et al. Propranolol in a case series of 174 patients with complicated infantile haemangioma: indications, safety and future directions. *Br J Dermatol* 2013; **168**: 837–843.
- Nina BID, Oliveira ZNP, Machado MCR, Macea JM. Presentation, progression and treatment of cutaneous hemangiomas – Experience of the Outpatients Clinic of Pediatric Dermatology – Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo. *An Bras Dermatol* 2006; **81**: 323–327.
- Talaat AA, Elbasiouny MS, Elgendy DS, et al. Propranolol treatment of infantile hemangioma: clinical and radiologic evaluations. *J Pediatr Surg* 2012; **47**: 707–714.
- Tollefson MM, Frieden IJ. Early growth of infantile hemangiomas: what parents' photographs tell us. *Pediatrics* 2012; **130**: e314–e320.
- Dickson P, Christou E, Wargon O. A prospective study of infantile hemangiomas with a focus on incidence and risk factors. *Pediatr Dermatol* 2011; **28**: 663–669.
- Léauté-Labrèze C, Dumas de la Roque E, Hubiche T, et al. Propranolol for severe hemangiomas of infancy. *N Engl J Med* 2008; **358**: 2649–2651.
- Luu M, Frieden IJ. Haemangioma: clinical course, complications and management. *Br J Dermatol* 2013; **169**: 20–30.
- Ozyoruk D, Zengin E. Propranolol treatment of complicated hemangiomas. *Indian J Pediatr* 2014; **81**: 368–370.
- Léauté-Labrèze C, Hoeger P, Mazereeuw-Hautier J, et al. A randomized, controlled trial of oral propranolol in infantile hemangioma. *N Engl J Med* 2015; **372**: 735–746.
- Marqueling AL, Oza V, Frieden IJ, et al. Propranolol and infantile hemangiomas four years later: a systematic review. *Pediatr Dermatol* 2013; **30**: 182–191.
- Janmohamed SR, van Oosterhout M, de Laat PC, et al. Scoring the therapeutic effects of oral propranolol for infantile hemangioma: a prospective study comparing the Hemangioma Activity Score (HAS) with the Hemangioma Severity Scale (HSS). *J Am Acad Dermatol* 2015; **73**: 258–263.
- Bingham MM, Saltzman B, Vo NJ, et al. Propranolol reduces infantile hemangioma volume and vessel density. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2012; **147**: 338–344.
- Lowe LH, Marchant TC, Rivard DC, et al. Vascular malformations: classification and terminology the radiologist needs to know. *Semin Roentgenol* 2012; **47**: 106–117.
- Kutz AM, Aranibar L, Lobos N, et al. Color Doppler ultrasound follow-up of infantile hemangiomas and peripheral vascularity in patients treated with propranolol. *Pediatr Dermatol* 2015; **32**: 468–475.
- Chen TS, Eichenfield LF, Friedlander SF. Infantile hemangiomas: an update on pathogenesis and therapy. *Pediatrics* 2013; **131**: 99–108.

APÊNDICE 2 – Trabalho aceito para publicação. Rotter A, et al. Infantile hemangioma: pathogenesis and propranolol mechanisms of action. JDDG – Journal of the German Society of Dermatology

Anita Rotter <anita.rotter@gmail.com>

JDDG - Decision on Manuscript ID JDDG-2017-RAMA-145.R1

JDDG <onbehalf+jddg+derma.de@manuscriptcentral.com>

14 de julho de 2017 06:32

Responder a: jddg@derma.de

Para: anita.rotter@gmail.com

Cc: tilo.biedermann@tum.de

14-Jul-2017

Dear Dr. Rotter:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Infantile hemangioma: pathogenesis and propranolol mechanisms of action" in its current form for publication in JDDG.

The comments of the Reviewers are included at the bottom of this letter.

Your article cannot be published until the publisher has received the appropriate signed license agreement. If we have not already received your completed and signed license form, the corresponding author will receive an email within the next few days from Wiley's Author Services system which will ask them to log in and will present them with the appropriate license for completion.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of JDDG, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,
Prof. Sergij Goerdts
Editor-in-Chief, JDDG
sergij.goerdts@umm.de

Reviewer(s)' Comments to Author:

Reviewer: 1

Comments to the Author

The authors have carefully revised the manuscript according to the reviewers' suggestions. I am convinced that this review will find a broad readership in the JDDG.

Reviewer: 2

Comments to the Author

All comments, as far as I can remember, have been considered in this revised version.
page 8, line 44: cytokine

Editor's Comments to Author:

Section Editor: Biedermann, Tilo

Comments to the Author:

(There are no comments.)