ALESSANDRO CAVALCANTI LIANZA

**Avaliação prospectiva da função cardíaca sistólica e
diastólica em pacientes com artrite idiopática juvenil pré
e pós terapia anti-TNF**

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

Programa de Ciências Médicas
Área de concentração: Processos inflamatórios e
alérgicos

Orientador: Prof. Dr. Clovis Artur Almeida da Silva

**São Paulo
2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Lianza, Alessandro Cavalcanti

Avaliação prospectiva da função cardíaca sistólica e diastólica em pacientes com artrite idiopática juvenil pré e pós terapia anti-TNF / Alessandro Cavalcanti Lianza. -- São Paulo, 2014.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências Médicas. Área de Concentração: Processos Inflamatórios e Alérgicos.

Orientador: Clovis Artur Almeida da Silva.

Descritores: 1.Artrite juvenil 2.Ecocardiografia 3.Ecocardiografia Doppler
4. Pediatria 5. Marcadores biológicos 6. Peptídeo natriurético encefálico 7.
Troponina T

USP/FM/DBD-393/14

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese a todos meus familiares, os de sangue e os da vida; em especial à minha mãe Risalba Cavalcanti de Lima, mulher trabalhadora que ensinou aos seus filhos o valor dos estudos, do trabalho honesto e da compaixão, valores que carregamos conosco por toda a vida.

À minha tia Vera Lúcia Soares de Lima, que com sua honestidade ímpar nos ensinou o verdadeiro valor da “paz de espírito”.

Aos meus amados Emanuella, Mário Lúcio e Alan pelo apoio em todos os momentos da minha vida.

Aos meus amados sobrinhos, em especial a minha sobrinha e afilhada Maria Eduarda, menina cheia de vida e vontades que, com sua alegria, contagia todos ao seu redor.

Aos meus amados avós, Manoel e Olivia Soares (in memoriam) com quem passei momentos maravilhosos na minha infância e com quem aprendi valores éticos e morais.

À minha tia Rideusa, mulher forte e independente, e seus filhos, Janaína, Fábio e Isaac Jr. (in memoriam), com quem vivi momentos felizes da minha vida.

Aos meus amados cachorros, Rufus e Ralph, que me alegam na tristeza e me amam incondicionalmente.

À Nádia Emi Aikawa, minha “irmã nipônica”, que com sua doçura e paciência, me apoiou e ajudou em todos os passos desta tese.

AGRADECIMENTOS

Ao meu querido orientador, Prof. Dr. Clóvis Artur Almeida da Silva, pela confiança, paciência, alegria e carinho durante todo esse período. Pelos ensinamentos e pela praticidade, por me acolher como filho e me incentivar a crescer profissional e pessoalmente. Querido Dr. Clóvis, todos os agradecimentos não seriam suficientes para demonstrar a minha profunda gratidão. Posso dizer, com certeza, em nome de todos seus orientandos, que somos todos seus filhos e que é um prazer conviver com sua alegre presença.

À minha amada casa, Instituto da Criança do HC-FMUSP, local tão especial, onde fiz minha especialização em pediatria, e onde tenho amigos há mais de 15 anos; onde aprendi questões éticas e profissionais e onde me tornei um médico de verdade!

Aos meus amigos do SADT do Instituto da Criança, em especial à Gabriela Nunes Leal, “menina-mulher” que com seu ânimo e persistência melhora tudo ao seu redor. Gabriela, você é excepcional!

À todos meus assistentes da cardiologia pediátrica do Instituto do Coração, local onde continuei meu crescimento pessoal e profissional, e aprendi a trabalhar nas adversidades e a não perder a esperança. Agradeço em especial à Dr^a. Maria Angélica Binotto, com quem

inicieu meu interesse em pesquisa; aos queridos médicos e amigos, Mônica Shimoda, Eliza Rumiko; ao Prof. Dr. Edmar Atik e Dr^a. Nana Miura Ikari pelo carinho e paciência com quem tratava cada residente e paciente.

Aos meus amigos e assistentes do setor de ecocardiografia pediátrica do Instituto do Coração, pessoas especiais que me ensinaram a técnica e a paixão pela ecocardiografia, em especial às Dr^{as}. Gláucia Maria Penha Tavares, Zilma de Sá Verçosa, Claudia Castro e Renata de Sá Cassar.

À Prof^a. Dr^a. Vera Aiello, pessoa ímpar, que criou e mantém todo o serviço de anatomia patológica do Incor e que está sempre disponível para os que precisam de sua ajuda. Dr^a. Vera, o Incor não seria o mesmo sem a senhora!

Aos meus queridos Prof. Dr. José Lazaro de Andrade e Dr^a. Samira Saady Morhy por serem responsáveis pelo meu aprendizado na arte da ecocardiografia, e por me estimular à pesquisa. Pessoas queridas com quem divido a alegria de valores profissionais e pessoais comuns.

Ao meu amigo Jozélio de Carvalho, pessoa essencial no meu desenvolvimento como pesquisador.

Aos meus amigos do CEDMAC, onde nossos pacientes recebem tratamento e carinho, e onde estabelecemos uma vibrante parceria; em especial ao querido Dr. Júlio Moraes e a nossa querida Prof^a. Dr^a. Eloisa Silva Dutra

de Oliveira Bonfá, mulher de personalidade forte e objetiva, que movimenta vários campos de pesquisa no HC-FMUSP. Professora Eloisa, nada disso seria possível sem a sua imensa participação. Muito obrigado!

Aos meus amigos do setor de ecocardiografia do Hospital Israelita Albert Einstein, pelo apoio e incentivo constante à melhoria profissional, em especial à sempre sorridente e cativante Dr^a. Samira Saady Morhy, e aos meus queridos Edgar Lira Filho, Marcelo Valente, Wercules Antônio de Oliveira, Ana Clara Tude e Cláudio Fischer.

Aos meus amigos da Clínica JP da Silva, em especial ao Dr. José Pedro da Silva, cirurgião exemplar, que além de indiscutível capacidade técnica, é dono de uma perseverança ímpar em prol dos melhores resultados possíveis, e de sua esposa, a Dr^a. Luciana da Fonseca da Silva, que com sua emoção e força de vontade tornou-se uma das maiores cirurgiãs cardíacas do nosso país. Agradeço muito todo o aprendizado e incentivo pessoal e profissional.

Aos meus amigos do setor de ecocardiografia do Hospital do Coração, onde divido um aprendizado contínuo, em especial a minha querida Dr^a. Tamara Cortez Martins, à Dr^a. Simone Pedra, Dr. Marcos Vinicius Capellini e à Dra. Vera Gimenez.

À todos meus pacientes, que tornaram possível este estudo e que são o motivo fundamental de toda pesquisa.

*“O único lugar onde o
sucesso vem antes do
trabalho é no dicionário.”*

(Albert Einstein)

*“É melhor ser alegre que ser
triste*

*Alegria é a melhor coisa que
existe*

*É assim como a luz no
coração”*

(Vinícius de Moraes)

Esta dissertação 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. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

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

Lista de Abreviaturas e Siglas

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

Lista de Gráficos

Resumo

Abstract

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVO.....	6
3 MÉTODOS.....	8
3.1. População de Estudo.....	9
3.2. Critérios de Inclusão.....	10
3.3. Critérios de Exclusão.....	10
3.4. Métodos.....	11
3.5. Protocolo de Avaliação da AIJ.....	11
3.6. Protocolo de Avaliação Cardíaca	13
3.7. Ecocardiograma.....	13
3.8. Doppler Convencional.....	15
3.9. Doppler Tecidual.....	17
3.10. Peptídeo Natriurético tipo B e Troponina T.....	20
3.11. Análise Estatística.....	21
4 RESULTADOS.....	23
4.1. Dados Demográficos e Características da AIJ Pré Terapia Anti-TNF.....	24
4.2. Avaliação Prospectiva dos Pacientes com AIJ sob Terapia com Anti-TNF.....	29
5 DISCUSSÃO.....	32
7 REFERÊNCIAS.....	37
ANEXOS	

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIJ=	Artrite idiopática juvenil
ANOVA=	<i>Analysis of variance</i>
anti-TNF =	Terapia anti-fator de necrose tumoral
BL =	Baseline
BNP=	Fragmento biologicamente ativo C terminal
CAPPesq=	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HC-FMUSP
CHAQ =	<i>Childhood Health Assessment Questionnaire</i>
DDVD =	Diâmetro diastólico de ventrículo direito
DDVE =	Diâmetro diastólico de ventrículo esquerdo
DMARDs=	Drogas modificadoras do curso da doença
DSVE =	Diâmetro sistólico de ventrículo esquerdo
EVA=	Escala visual analógica
ICC=	Insuficiência cardíaca congestiva
ILAR=	Liga Internacional contra o Reumatismo
PCR=	Proteína C reativa
PP =	Parede posterior
pró-BNP =	Pró-hormônio natriurético atrial do tipo B
S=	Septo
TD=	Tempo de desaceleração
TRIV=	Tempo de relaxamento isovolumétrico
VD =	Ventrículo direito
VE =	Ventrículo esquerdo
VHS =	Velocidade de hemossedimentação

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Dados demográficos, parâmetros ecocardiográficos e biomarcadores cardíacos em pacientes com AIJ antes da terapia da terapia anti-TNF e controles.....	25
Tabela 2-	Dados demográficos, parâmetros da doença e tratamento em pacientes com AIJ com níveis de NT-proBNP elevados e normais, antes da terapia com anti-TNF.....	27
Tabela 3-	Análise prospectiva dos parâmetros ecocardiográficos e biomarcadores nos 21 pacientes com AIJ durante a terapia anti-TNF.....	30

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Modo M das cavidades cardíacas com mensuração dos diâmetros das cavidades e estimativa da fração de ejeção.....	14
Figura 2-	Doppler convencional com padrão normal de criança em paciente com AIJ, antes da introdução da terapia anti-TNF.	16
Figura 3-	Doppler convencional com mensuração do tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) em paciente com AIJ, antes da introdução da terapia anti-TNF.....	17
Figura 4-	Doppler tecidual da parede septal com padrão normal das ondas e', a' e S' em paciente com AIJ antes da introdução da terapia anti-TNF.....	19
Figura 5-	Esquema demonstrando alterações das curvas do Doppler convencional e tecidual de acordo com os padrões de disfunção diastólica.....	20

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1-	Correlação positiva entre o nível elevado do NT-proBNP com o número de articulações ativas	28
Gráfico 2-	Correlação positiva entre o nível elevado de NT-proBNP e de VHS	29

RESUMO

Lianza AC. *Avaliação prospectiva da função cardíaca sistólica e diastólica de pacientes com artrite idiopática juvenil pré e pós terapia anti-TNF* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

INTRODUÇÃO: A artrite idiopática juvenil (AIJ) pode acometer o sistema cardiovascular em até 45% dos pacientes, principalmente nas formas mais graves. A insuficiência cardíaca congestiva ocorre em 3,9% dos adultos com artrite reumatoide (AR), havendo relatos em literatura da piora da função cardíaca em pacientes com AR em uso de terapia anti-TNF. Entretanto, não há dados em literatura sobre a segurança cardiovascular desta terapia em crianças. **OBJETIVOS:** Avaliação global da função cardíaca em pacientes com AIJ sob terapia anti-TNF. **MÉTODOS:** 25 pacientes com AIJ de curso poliarticular ativo e 22 indivíduos saudáveis foram submetidos a avaliação clínica e ecocardiográfica com Doppler convencional e tecidual e mensuração dos níveis dos biomarcadores cardíacos [pró-peptídeo natriurético N-terminal (NT-proBNP) e troponina T] no tempo basal (BL - pré-terapia anti-TNF). Os pacientes com AIJ foram avaliados a cada 3 meses por um período de 24 meses. **RESULTADOS:** Pacientes com AIJ e controles foram equivalentes em relação a idade ($p=0,898$) e gênero feminino ($p=0,38$). No BL, o tempo de relaxamento isovolumétrico ($p=0,03$), a velocidade da onda e' no septo ($p=0,014$) e da onda S' septal ($p=0,03$) foram significativamente reduzidos em pacientes com AIJ comparados a controles. As frequências dos níveis elevados de NT-proBNP e troponina T foram similares nesses dois grupos ($p=0,297$ e $p=0,756$), permanecendo dentro da normalidade durante toda a avaliação prospectiva, exceto por um paciente com elevação discreta da troponina T. Durante a terapêutica anti-TNF, nenhum dos 21 pacientes apresentou falência cardíaca, alteração da fração de ejeção e de outros parâmetros do Doppler. Só um paciente apresentou hipertensão pulmonar discreta. Avaliação adicional demonstrou que os pacientes com AIJ que apresentaram níveis elevados de NT-proBNP no BL tinham mais articulações ativas ($p=0,025$), VHS mais elevado ($p=0,034$) e maiores pontuações do JADAS-27 ($p=0,014$). **CONCLUSÃO:** Há segurança cardiovascular a longo prazo em pacientes com AIJ submetidos a terapia anti-TNF. Níveis elevados de NT-proBNP foi associado com atividade inflamatória na AIJ, reforçando uma interpretação mais cuidadosa deste biomarcador em pacientes com doença ativa.

Descritores: Artrite juvenil; Ecocardiografia; Ecocardiografia Doppler; Pediatria; Marcadores biológicos; Peptídeo natriurético encefálico; Troponina T.

ABSTRACT

Lianza AC. *Prospective evaluation of systolic and diastolic heart function in juvenil idiopathic arthritis under anti-TNF* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2014.

INTRODUCTION: Juvenile idiopathic arthritis (JIA) may cause heart damage in up to 45% of patients. Congestive cardiac failure may occur in 3,9% of adults with rheumatoid arthritis. It is described in literature, that some patients may presente with heart failure due to anti-TNF therapy. There is no data regarding cardiovascular safety in JIA patients. **OBJECTIVE:** To perform global assessment of long-term cardiac function in juvenile idiopathic arthritis (JIA) patients under TNF blockage therapy. **METHODS:** 25 polyarticular-course JIA patients pre-anti-TNF and 22 healthy controls underwent conventional/tissue Doppler echocardiography and cardiac biomarkers measurements [N-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-pro-BNP) and troponin T] at baseline (BL). Twenty-one JIA patients completed six evaluations during two consecutive years. Clinical/laboratorial evaluations were assessed before and during TNF blockage therapy. **RESULTS:** JIA patients and controls were comparable regarding current age ($p=0.898$) and female gender ($p=0.38$). At BL isovolumetric relaxation time of left ventricle ($p=0.03$), ventricular septum velocity (VS), E' wave ($p=0.014$) and VS S wave ($p=0.03$) were significantly reduced in JIA patients compared to controls. Frequencies of elevated NT-pro-BNP and troponin T levels were similar in JIA and controls ($p=0.297$ and $p=0.756$) and levels remained within normal range throughout the study, except for one patient with mild troponin T elevation. During TNF blockage therapy, none of the 21 participants had heart failure, ejection fraction or other parameters alterations in conventional and tissue Doppler. Only one had mild pulmonary hypertension. Further analysis revealed that JIA patients with elevated levels of NT-pro-BNP at BL had significantly more active joints ($p=0.025$), higher ESR ($p=0.034$) and higher JADAS-27 ($p=0.014$). **CONCLUSIONS:** Long-term TNF blockage safety was demonstrated in JIA patients in spite of the observed subclinical diastolic involvement. Elevated cardiac biomarker in these patients was associated with inflammatory parameters reinforcing the need for a careful interpretation of this finding in patients with active disease

Descriptors: Arthritis, juvenile. Echocardiography; Echocardiography Doppler; Pediatrics; Biological markers; Natriuretic peptide,brain; Troponin T.

1 INTRODUÇÃO

A artrite idiopática juvenil (AIJ) é a doença reumatológica crônica mais prevalente da infância e adolescência^{1,2}. Esta pode evoluir para limitações articulares e incapacitação funcional permanente, necessitando de tratamento agressivo com drogas de base ou drogas anti-reumáticas de ação lenta e imunossupressores³.

Apesar desta terapêutica agressiva, cerca de 20% dos pacientes com AIJ não respondem a essas terapias e necessitam de agentes biológicos⁴. Atualmente, a terapia anti-fator de necrose tumoral (anti-TNF) vem sendo usada com sucesso em pacientes com AIJ. O etanercepte, um receptor solúvel de TNF-alfa, foi um dos primeiros a ser aprovado pelo *Food and Drugs Administration* para uso crônico nestes pacientes com remissão em até 75%^{5,6,7}. Outras drogas anti-TNF como o adalimumabe, que é um anticorpo monoclonal humanizado, também podem ser usadas em pediatria. Este agente biológico foi aprovado para uso em crianças acima de quatro anos de idade de acordo ao *Food and Drugs Administration*^{8,9}.

O envolvimento cardíaco na AIJ ocorre em 45% dos pacientes, habitualmente nas formas sistêmica e poliarticular, sendo mais freqüente a pericardite, seguidas por miocardite, perimiocardite e valvulite¹⁰. Os episódios são agudos com duração de uma semana a três meses, mas existe descrição de casos que prolongaram-se em até três anos. O maior risco de cardite na AIJ ocorre nos primeiros três anos da doença e o de recorrências nos primeiros cinco anos¹¹. A pericardite constrictiva é excepcionalmente descrita^{12,13,14}.

Insuficiência cardíaca congestiva (ICC) pode ocorrer em até 13% das crianças e adolescentes com AIJ, sendo freqüentemente associada a dor abdominal e vômitos^{11,12,14}. Por sua vez, ICC ocorre em 3,9% dos adultos com artrite reumatóide (AR). A literatura é controversa em relação a terapia anti-TNF e a segurança cardiovascular, com alguns trabalhos demonstrando piora da ICC com seu uso¹⁵, enquanto outros demonstram adequada segurança cardiovascular^{16,17}. Até o presente momento, não há descrição de toxicidade destas drogas em pacientes com AIJ submetidos a esta terapia.

Nesse sentido, a avaliação da função cardíaca é algo importante de ser realizado nesta população em que a terapia anti-TNF é cogitada. A avaliação ecocardiográfica é o método de escolha para análise da morfologia e função do coração em pacientes com AR¹⁸. Mais recentemente, tem-se voltado a atenção para a avaliação da função diastólica nesta doença, principalmente pela detecção de envolvimento miocárdico subclínico¹⁹. A função diastólica pode ser avaliada por duas modalidades de Doppler: convencional e tecidual. O Doppler convencional avalia o fluxo mitral e tricuspídeo; bem como o tempo de relaxamento isovolumétrico e o tempo de desaceleração da onda E do fluxo mitral e/ou tricuspídeo¹⁸. Por sua vez, o Doppler tecidual permite avaliar as velocidades miocárdicas de ambos os ventrículos^{19,20}. O uso do Doppler convencional apresenta limitações nas seguintes condições: freqüência cardíaca elevada (achado comum em crianças), alteração da pré e pós-carga (como, por exemplo, hipovolemia ou hipertensão arterial) ou mesmo pseudo-normalização da função diastólica (grau II de disfunção diastólica)²¹. No caso

do Doppler tecidual estes aspectos não são relevantes, pois as velocidades miocárdicas independem destes fatores, podendo ser usado com relativa segurança na vigência de taquicardia^{22,23,24,25}, além de apresentar uma alta resolução espacial e temporal das velocidades miocárdicas, sendo particularmente útil na avaliação da função diastólica ventricular em vários segmentos^{24,25}. Poucos dados existem na literatura em relação a avaliação de função diastólica usando o Doppler tecidual nos pacientes com AR^{26,27} e, principalmente, em crianças e adolescentes com AIJ.

Outra forma de avaliar a função cardíaca é através do uso de biomarcadores cardíacos, como o NT-proBNP e a troponina T. A elevação dos peptídeos natriuréticos, que são hormônios contra-reguladores envolvidos na homeostase do volume circulante e no remodelamento cardiovascular, está relacionada a um maior risco de morte e eventos cardiovasculares na população geral²⁸. O pró-hormônio natriurético atrial do tipo B (pró-BNP) é liberado pelas células musculares do ventrículo esquerdo em resposta ao seu estiramento, sendo convertido em dois fragmentos, um fragmento biologicamente ativo C terminal (BNP), participando na homeostase do volume circulante e no remodelamento cardíaco; e um outro N terminal, sem atividade biológica, mas de fácil mensuração laboratorial. Desta forma, o NT-proBNP é um marcador de disfunção ventricular, sendo atualmente utilizado no diagnóstico diferencial de ICC. Nas doenças reumáticas, o NT-proBNP já foi demonstrado como um preditor independente de mortalidade em 10 anos na AR^{29,30}.

Outro aspecto relevante é que evidências sugerem que os agentes anti-TNF seriam capazes de reduzir esse aumento de risco cardiovascular na AR. Um estudo avaliando os valores de NT-proBNP em pacientes com AR sugere que esses pacientes podem experimentar um declínio no risco cardiovascular pelo uso de bloqueadores de TNF ³¹. A relação entre níveis elevados de NT-proBNP com maior atividade inflamatória de outras doenças reumatológicas também tem sido sugerida, como em trabalho realizado pelo nosso grupo de reumatologia em pacientes adultos com espondilite anquilosante ³². Outro marcador de acometimento miocárdico e, consequentemente de disfunção cardíaca, é a troponina T^{33,34}. Na literatura, não parece haver consenso em relação ao uso da troponina na AR, visto descrição de casos com falso-positivos na presença de fator reumatóide^{35,36,37}.

Assim sendo, a ausência de estudos avaliando função cardíaca pelo Doppler tecidual, NT-proBNP e troponina T em pacientes com AIJ pré e após o uso de terapia anti-TNF estimulou a realização do presente estudo.

2 OBJETIVOS

1. Avaliar longitudinalmente a função cardíaca pelo ecocardiograma e biomarcadores em pacientes com AIJ submetidos a terapia anti-TNF.
2. Avaliar associações entre elevação dos biomarcadores e: dados demográficos, manifestações clínicas, alterações laboratoriais e ecocardiográficas, capacidade física e tratamento.

3.1. População de Estudo

No período de janeiro de 2008 a dezembro de 2012, 25 pacientes com AIJ foram selecionados para o estudo. Todos preenchiam critérios para a forma poliarticular, com curso ativo, de acordo com os critérios da Liga Internacional contra o Reumatismo (ILAR)³⁸. Estes pacientes eram refratários às drogas modificadoras do curso da doença (DMARDs) não biológicos e eram atendidos na Unidade de Reumatologia Pediátrica do Instituto da Criança e da Divisão de Reumatologia do Hospital das Clínicas da FMUSP. A idade variou de 2,2 a 17,8 anos, com mediana de duração da doença de 2,7 anos (0,4-9,9 anos) e frequência de gênero feminino de 56%.

O grupo controle incluiu 22 pacientes saudáveis voluntários entre 6 e 17 anos, com frequência de gênero feminino de 40,9%.

Todos os pacientes e controles saudáveis ou seus respectivos responsáveis assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HC-FMUSP (CAPPesq) (número 1218/07) e recebeu apoio da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (2009/51897-5 e 2010/10749-0) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (número 301411/2009-3 302724/2011-7).

3.2. Critérios de Inclusão

1. Paciente com AIJ segundo os critérios de classificação ILAR ³⁸, com forma poliarticular (cinco ou mais articulações após seis meses do início da doença) e com curso ativo (presença de edema articular ou presença de duas ou mais características: dor a mobilização passiva, dor a palpação e/ou limitação a palpação).
2. Refratariedade à terapêutica com DMARDs não biológicos.

3.3. Critérios de Exclusão

1. Pacientes com ICC.
2. Pacientes com história de infarto agudo do miocárdio.
3. Pacientes com arritmias avaliados por eletrocardiograma.
4. Hipertensão arterial sistêmica (de acordo ao critério do 4º Consenso do Diagnóstico, para Avaliação e Tratamento da Pressão Arterial na Criança e Adolescente)³⁹.

3.4. Métodos

O estudo avaliou parâmetros da função cardíaca sistólica e diastólica através de dados do ecocardiograma com Doppler convencional e tecidual, biomarcadores (NT-proBNP e troponina T), exame físico e eletrocardiograma. Os dados referentes a atividade clínica e dano cumulativo da AIJ além das terapêuticas utilizadas, características demográficas e presença de fatores de risco cardiovasculares tradicionais também foram avaliados. As avaliações foram realizadas antes do início da terapia anti-TNF e após, a cada 3 meses por 24 meses.

3.5. Protocolo de Avaliação da AIJ

Os pacientes com AIJ foram clinicamente avaliados em relação ao número de articulações ativas e o número de articulações comprometidas.

As avaliações global do médico e do paciente com AIJ foram determinadas pela escala visual analógica (EVA) que varia de 0 a 10 cm: nota zero (doença inativa) e 10 (doença muito ativa). Os critérios para classificação da classe funcional, revisados pelo ACR em 1991⁴⁰, foram divididos em: I – paciente completamente capaz de realizar todas as atividades de vida diária (auto-cuidado, escola/trabalho, recreacionais/lazer); II – capaz de auto-cuidado e atividades escolares/trabalho, porém limitado

em atividades recreacionais/lazer; III- capaz de realizar auto-cuidado, porém limitado em atividades escolares/trabalho e recreacionais/lazer; IV – limitado em todas as atividades de vida diária⁴⁰. O *Childhood Health Assessment Questionnaire* (CHAQ) foi também aplicado nos pacientes. Este instrumento permite a avaliação funcional da AIJ e foi validado para o português brasileiro ⁴¹.

Utilizamos, ainda, uma ferramenta composta, o JADAS-27 (The Juvenile Arthritis Disease Activity Score) com avaliação de 27 articulações ⁴², definido como a soma de 4 componentes: EVA do médico ou do paciente, medida em uma escala de 10 cm, onde 0 é sem atividade e 10, atividade máxima; avaliação global de bem-estar do paciente ou responsável medida em uma EVA, onde 0 é muito bem e 10, péssimo; número de articulações ativas e medida da velocidade de hemossedimentação (VHS) (resultado variando de 0 a 57 pontos).

A dose atual e tempo de uso de cada medicamento (prednisona, metotrexate, levofloxacin, ciclosporina, cloroquina, ciclofosfamida e/ou azatioprina) foram determinados (em miligramas). O anti-TNF também foi determinado para cada paciente (adalimumabe ou etanercepte).

Atividade laboratorial da AIJ foi determinada através da VHS de acordo com o método de Westergren e da proteína C reativa (PCR) por nefelometria.

3.6. Protocolo de Avaliação Cardíaca

Todos os pacientes foram avaliados através do exame físico cardiovascular detalhado, bem como quanto a presença de fatores de risco tradicionais para doença cardiovascular tais como: história familiar, presença de hipertensão arterial, de acordo com o 4º Consenso do Diagnóstico, para Avaliação e Tratamento da Pressão Arterial na criança e adolescente ³⁹ e diabetes mellitus de acordo a *International Society for Pediatric and Adolescents Diabetes* ⁴³.

3.7. Ecocardiograma

O ecocardiograma foi realizado em um aparelho da marca Toshiba, modelo Aplio 500 (Toshiba America Medical Systems, Tustin, CA, USA), utilizando transdutores eletrônicos multifrequenciais de acordo com a superfície corpórea do paciente. Todos os pacientes foram monitorizados com eletrodos para eletrocardiograma do próprio aparelho e em seguida, posicionados em decúbito lateral esquerdo, conforme padronização da Sociedade Americana de Ecocardiografia. As avaliações incluíram: método bidimensional, com cortes padrões, modo M (unidimensional) e Doppler (convencional e tecidual).

A fração de ejeção do ventrículo esquerdo foi estimada através dos volumes diastólico e sistólico do ventrículo esquerdo, obtidas pelo modo M ou bidimensional (Figura 1), utilizando método de Teichholz, segundo as fórmulas:

$$\text{Volume Diastólico (ml)} = 7 \times \text{Diâmetro diastólico}^3 \div 2,4 + \text{diâmetro diastolico}$$

$$\text{Volume Sistólico (ml)} = 7 \times \text{Diâmetro sistólico}^3 \div 2,4 + \text{diâmetro sistólico}$$

$$\text{Fração de Ejeção} = \text{Volume diastólico} - \text{volume sistólico} \div \text{volume diastolico} \times 100\%$$

Figura 1- Modo M das cavidades cardíacas com mensuração dos diâmetros das cavidades e estimativa da fração de ejeção

A função sistólica do VE foi avaliada através do cálculo da fração de ejeção, sendo considerados normais valores $\geq 55\%$

3.8. Doppler Convencional

No corte apical 4-câmaras e apical 5-câmaras coloca-se a amostra do Doppler pulsado na ponta das valvas mitral e tricúspide, avaliando, assim, o fluxo das duas. O padrão normal de enchimento ventricular é caracterizado por uma rápida aceleração de fluxo sangüíneo do átrio ao ventrículo (onda E), seguida de uma rápida desaceleração e outra onda de menor amplitude (onda A), mantendo uma relação E/A maior que 1,32 em adolescentes e adultos. Define-se como tempo de desaceleração (TD), o intervalo entre o pico da onda E até o momento em que uma linha que segue a desaceleração faz interseção com a linha de base (Figura 2). Foi avaliado, ainda, o tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV), o qual consiste no intervalo de tempo entre o fechamento da valva aórtica e a abertura da valva mitral. O TRIV é medido com a amostra do Doppler pulsado (3 a 5 mm) entre folheto anterior da valva mitral e valva aórtica, avaliando os dois fluxos simultâneos (Figura 3). A velocidade de varredura do Doppler foi de 100mm/seg e ajustes de ganho foram realizados para maximizar o sinal. A média de três medidas consecutivas foi considerada.

Os valores normais de pico das ondas E e A, bem como do TD e TRIV foram avaliados de acordo com a padronização da faixa etária pertinente ^{44,45}.

Figura 2. Doppler convencional com padrão normal de criança em paciente com AIJ, antes da introdução da terapia anti-TNF.

Figura 3. Doppler convencional com mensuração do tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) em paciente com AIJ, antes da introdução da terapia anti-TNF.

3.9. Doppler Tecidual

No corte apical 4 e 5-câmaras, a amostra do Doppler tecidual foi posicionada na porção basal do septo e da parede lateral do ventrículo esquerdo, próximo ao anel valvar mitral e em seguida na parede lateral do ventrículo direito, próximo ao anel valvar tricuspídeo. O ganho e filtro foram otimizados para garantir um sinal tecidual claro. Posteriormente, medidas das velocidades das ondas e', a' e sistólica (S), foram determinadas. A

velocidade de varredura foi de 100 mm/seg e as médias de três ciclos consecutivos foram consideradas (Figura 4). Os valores foram avaliados de acordo com tabelas próprias à idade ^{44,45,46,47,48}.

A disfunção diastólica foi classificada em graus de acordo com a Sociedade Americana de Ecocardiografia ²⁰. Em adultos, no grau leve ou alteração de relaxamento, observa-se redução da velocidade da onda E do fluxo mitral, com aumento da onda A, e consequente diminuição da relação entre as ondas E e A. Observa-se, ainda, aumento do TD e prolongamento do TRIV. No Doppler tecidual, há redução da velocidade da onda e', assim como no Doppler convencional do fluxo mitral ou tricúspideo. Caso haja progressão da disfunção, observaremos padrão de velocidade das ondas E e A próximo ao normal, daí o grau moderado de disfunção diastólica ser denominado de padrão pseudonormal, contudo, o TD está mais curto que o habitual, e quando o paciente realiza manobra de Valsalva, o padrão E/A fica semelhante ao encontrado na alteração de relaxamento. O Doppler tecidual é de grande valia neste quadro, pois, nele mantém-se a redução da velocidade da onda e'. No grau importante ou padrão restritivo, observa-se uma velocidade muito elevada da onda E e um encurtamento importante do TD, com consequente relação E/A muito elevada além da redução do TRIV (Figura 5). Em crianças, o padrão normal de onda E e A é semelhante ao padrão restritivo dos adultos, contudo, não é observada redução das velocidades do Doppler tecidual como visto na disfunção diastólica importante (Figura 5).

Figura 4 - Doppler tecidual da parede septal com padrão normal das ondas e', a' e S' em paciente com AIJ antes da introdução da terapia anti-TNF.

Figura 5. Esquema demonstrando alterações das curvas do Doppler convencional e tecidual de acordo com os padrões de disfunção diastólica.

3.10. Peptídeo Natriurético tipo B e Troponina T

Os ensaios para troponina T e pro-BNP foram realizados com kits Roche Diagnóstica® para sistema Elecsys 1010/2010® (Roche Diagnostics, Alemanha).

O NT-proBNP (fragmento N-terminal do peptídeo natriurético) e a troponina T foram dosados pela técnica de imunoensaio de eletroquimioluminescência (electrochemiluminescence immunoassay ou “ECLIA”).

A técnica consiste em adicionar 20µl ou 15µl de soro na placa de leitura do aparelho Elecsys, anticorpos policlonais específicos contra NT-proBNP e troponina T serão adicionados e os mesmos são marcados com a substância quimioluminescente. As microparticulas formadas são fixadas magneticamente. Os elementos não fixados são removidos. Em seguida uma corrente elétrica induz a emissão de luz que será medida por um fotomultiplicador. Os resultados são determinados conforme uma curva de calibração. Essa curva é gerada especificamente no analisador por uma calibração de 2 pontos e uma curva principal incluída no código de barras do reagente. Os resultados do NT-proBNP serão expressos em pg/ml. Os valores de referência para este kit foi de 125 pg/ml. Para troponina T, foram considerados negativos valores menores que 0,010 ng/ml.

3.11. Análise Estatística

As variáveis categóricas foram comparadas utilizando o teste de Fisher. As variáveis contínuas foram apresentadas em média e desvio padrão ou em mediana (variação) e comparadas usando o teste t de Student ou o teste de Mann-Whitney, respectivamente. A avaliação evolutiva dos

parâmetros ecocardiográficos e dos biomarcadores de cada paciente foi feita com o análise de variáveis (ANOVA) com o teste de Friedman com medidas repetidas (two-way ANOVA), seguida por uma análise post-hoc para determinar o tempo exato onde a diferença ocorreu. As correlações entre os níveis de NT-proBNP e: parâmetros clínicos ou ecocardiográficos da AIJ foram feitas com o teste de Spearman. A significância estatística foi fixada em $p < 0,05$.

4.1. Dados Demográficos e Características da AIJ Pré Terapia Anti-TNF

Os 25 pacientes com AIJ pré-terapia com anti-TNF e os 22 controles saudáveis foram comparáveis em relação à mediana de idade atual [10,3 (2,2- 17,8) vs. 9,5 (6-17) anos, $p=0,898$] e a frequência do gênero feminino (56 vs. 40,9%, $p=0,385$). A mediana da duração da doença foi de 2,7 (0,4- 9,9) anos.

Em relação aos dados ecocardiográficos, a mediana do TRIV pelo Doppler convencional [76 (56-89) vs. 81,75 (71-96) ms, $p=0,03$], a velocidade da onda e' septal ao Doppler tecidual [0,12 (0,1-0,16) vs. 0,14 (0,12-0,16) m/s, $p=0,014$] e da onda S' septal ao Doppler tecidual [0,08 (0,06-0,11) vs. 0,08 (0,07-0,12) m/s, $p=0,03$] apresentaram diferença estatisticamente significante entre o grupo com AIJ antes da terapia anti-TNF *versus* controles saudáveis (Tabela 1).

Tabela 1 – Dados demográficos, parâmetros ecocardiográficos e biomarcadores cardíacos em pacientes com AIJ antes da terapia da terapia anti-TNF e controles.

Variáveis	Pacientes com AIJ (n=25)	Controles (n=22)	P
Dados demográficos			
Sexo feminino, n (%)	14 (56)	9 (40.9)	0,385
Idade atual, anos	10,3 (2,2-17,8)	9,5 (6-17)	0,898
Duração da doença, anos	2,7 (0,4-9,9)		
Parâmetros ecocardiográficos			
<i>Doppler convencional</i>			
Onda E, m/s	1 (0,6-1,43)	1,01 (0,77-1,33)	0,974
Onda A, m/s	0,55 (0,35-0,7)	0,53 (0,34-0,76)	0,272
TD, ms	176 (129-275)	177,5 (129-222)	0,806
TRIV, ms	76 (56-89)	81,5 (71-96)	0,030
<i>Doppler tecidual</i>			
Parede livre do VE			
Onda e', m/s	0,17 (0,14-0,25)	0,18 (0,13-0,28)	0,153
Onda a', m/s	0,07 (0,05-0,12)	0,07 (0,05-0,1)	0,677
Onda S', m/s	0,1 (0,06-0,15)	0,1 (0,07-0,15)	0,482
Septo ventricular			
Onda e', m/s	0,12 (0,1-0,16)	0,14 (0,12-0,16)	0,014
Onda a', m/s	0,06 (0,04-0,1)	0,07 (0,04-0,08)	0,79
Onda S', m/s	0,08 (0,06-0,11)	0,08 (0,07-0,12)	0,03
Parede livre do VD			
Onda e', m/s	0,16 (0,11-0,23)	0,15 (0,12-0,2)	0,579
Onda a', m/s	0,1 (0,06-0,17)	0,1 (0,07-0,13)	0,983
Onda S', m/s	0,14 (0,08-0,17)	0,14 (0,09-0,17)	0,296
Diâmetro das cavidades e FE			
DDVE, mm	40,9 (26-51,2)	41 (32,2-48)	0,749
DSVE, mm	24,1 (15-33)	24 (20-32)	0,782
DDVD, mm	15 (9,1-21,4)	15,6 (13,4-21)	0,258
S, mm	6,3 (3,7-8,1)	6 (5-8)	0,536
PP, mm	6,3 (4-9)	6,2 (4,6-7,8)	0,662
FE, %	70 (60-78)	70,8 (57,7-79)	0,631

Biomarcadores cardíacos			
Troponin T, µg/l	0,003 (0,003-0,01)	0,003 (0,003-0,005)	0,756
NT-proBNP, pg/mL	73 (7-1107)	42,5 (9-213)	0,156
NT- proBNP > 125 pg/mL	7 (28)	3 (13,6)	0,297

Dados são expressos em n (%) e mediana (variação). TD: tempo de desaceleração; TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico. FE: fração de ejeção; DDVE: diâmetro diastólico de ventrículo esquerdo; DSVE: diâmetro sistólico de ventrículo esquerdo; DDVD: diâmetro diastólico de ventrículo direito; S: septo; PP: parede posterior; VE: ventrículo esquerdo; VD: ventrículo direito.

A mediana dos valores dos biomarcadores cardíacos – troponina T e NT-proBNP - foram similares nos 2 grupos (AIJ no baseline (BL) vs. controles). A presença de níveis elevados do NT-proBNP (NT-proBNP $\geq$ 125 pg/ml) foram comparáveis nos grupos do AIJ (28%) *versus* controles (13,6%) (Tabela 1).

Quando comparados níveis elevados do NT-proBNP com atividade da AIJ no BL, foi demonstrado que estes níveis estavam associados com maior número de articulações ativas (8 vs. 3, $p=0,025$), níveis mais altos de VHS (55 vs. 29 mm/1° hora, $p=0,034$) e pontuação mais elevada de JADAS-27 (23 vs. 11, $p=0,014$). Nenhuma outra associação foi demonstrada entre níveis elevados de NT-proBNP e dados demográficos, ecocardiográficos, outros parâmetros da AIJ e tratamento atual. Desta forma, demonstramos correlações positivas entre níveis elevados de NT-proBNP e: número de articulações ativas ($r=+0,59$, $p=0,002$; Gráfico 1); VHS ($r=+0,51$, $p=0,009$; Gráfico 2) e JADAS-27 ($r=+0,69$, $p<0,0001$) (Tabela 2). Não conseguimos demonstrar correlação positiva entre níveis elevados de NT-proBNP e outros dados ecocardiográficos ($p>0,05$). Após o período de 24 meses com a

terapia anti-TNF, nenhuma correlação foi detectada entre JADAS-27 e biomarcadores cardíacos ou parâmetros ecocardiográficos ($p>0,05$). Três controles saudáveis apresentaram NT-pro-BNP > 125 pg/ml, sem evidências de doença inflamatória ou infecciosa.

Tabela 2 – Dados demográficos, parâmetros da doença e tratamento em pacientes com AIJ com níveis de NT-proBNP elevados e normais, antes da terapia com anti-TNF.

	NT-ProBNP ≥ 125 pg/mL (n=7)	NT-ProBNP < 125pg/mL (n=18)	P
Dados demográficos			
Sexo feminino, n (%)	2 (28,6)	9 (50)	0,407
Idade atual, anos	7,8 (4,3-17,8)	10,5 (2,2-17,3)	0,785
Idade no diagnóstico, anos	4,2 (3,2-14,1)	6,9 (1,5-13,3)	0,976
Duração da doença, anos	3,2 (0,4-9,2)	2,5 (0,4-9,9)	0,976
Parâmetros da AIJ			
Rigidez matinal, min	5 (0-60)	2,8 (0-180)	0,92
Número de articulações ativas	8 (2-20)	3 (0-26)	0,025
Número de articulações limitadas	8 (1-24)	7 (0-31)	0,856
VHS, mm/1°h	55 (25-65)	29 (4-61)	0,034
PCR, mg/L	49,9 (0,8-332,9)	11,1 (0,2-150)	0,102
VAS do paciente, cm	4 (0-10)	2,5 (0-8)	0,607
VAS do médico, cm	4 (3-7)	3 (0-8)	0,079
CHAQ	0,625 (0-2,375)	0,563 (0-2,125)	0,88
Tratamento			
AINH	7 (100)	17 (94,4)	1,0
Glicocorticóides	2 (28,6)	6 (33,3)	1,0
Methotrexate	6 (85,7)	17 (94,4)	0,49
Leflunomida	2 (28,6)	3 (16,7)	0,597
Ciclosporina	2 (28,6)	5 (27,8)	1,0

Gráfico 1 : Correlação positiva entre o nível elevado do NT-proBNP com o número de articulações ativas ($r = + 0,59$, $p = 0,002$).

Gráfico 2: Correlação positiva entre o nível elevado de NT-proBNP e de VHS ($r=+0,51, p=0,009$).

4.2. Avaliação Prospectiva dos Pacientes com AIJ sob Terapia com Anti-TNF

Durante a avaliação prospectiva dos pacientes com a terapia anti-TNF, um paciente foi excluído por síndrome de ativação macrofágica e três outros por baixa adesão ao tratamento.

A Tabela 3 mostra uma avaliação prospectiva dos parâmetros ecocardiográficos (Doppler convencional, Doppler tecidual e diâmetros das cavidades com fração de ejeção) nos 21 pacientes restantes, com AIJ e durante a terapia com anti-TNF.

A mediana da onda a' septal apresentou um discreto aumento em 18 e 24 meses ($p=0,026$). A mediana da onda S' septal apresentou uma discreta redução em 3 e 6 meses e um discreto aumento em 12, 18 e 24 meses ($p=0,007$); contudo, todos os valores permaneceram dentro dos limites da normalidade (Tabela 3).

Tabela 3 - Análise prospectiva dos parâmetros ecocardiográficos e biomarcadores nos 21 pacientes com AIJ durante a terapia anti-TNF.

Variáveis	Basal	3M	6M	12M	18M	24M	P
Doppler convencional- Fluxo mitral							
Onda E, m/s	1,05 (0,6-1,43)	1,01 (0,79-1,25)	0,99 (0,62-1,47)	1,0 (0,68-1,5)	1,0 (0,68-1,4)	1,03 (0,7-1,4)	0,765
Onda A, m/s	0,55 (0,35-0,7)	0,55 (0,35-1,6)	0,58 (0,34-1,0)	0,49 (0,4-0,77)	0,56 (0,3-0,81)	0,54 (0,34-0,7)	0,703
TD, ms	176 (129-275)	172 (125-249)	183 (103-230)	192 (117-242)	188 (131-258)	183 (131-242)	0,855
TRIV, ms	76 (56-89)	72 (58-97)	76 (55-92)	76,5 (53-97)	72 (53-97)	79 (63-89)	0,751
Doppler tecidual- Parede lateral do VE							
Onda e', m/s	0,17 (0,14-0,25)	0,17 (0,15-0,26)	0,17 (0,14-0,22)	0,16 (0,12-0,22)	0,15 (0,12-0,22)	0,17 (0,1-0,24)	0,051
Onda a', m/s	0,07 (0,05-0,1)	0,07 (0,04-0,11)	0,07 (0,05-0,13)	0,07 (0,06-0,13)	0,08 (0,05-0,1)	0,07 (0,05-0,11)	0,521
Onda S', m/s	0,1 (0,06-0,15)	0,09 (0,05-0,17)	0,1 (0,06-0,18)	0,1 (0,06-0,18)	0,1 (0,07-0,15)	0,09 (0,07-0,15)	0,655
Septo Ventricular							
Onda e', m/s	0,12 (0,1-0,16)	0,12 (0,1-0,16)	0,13 (0,09-0,16)	0,13 (0,08-0,17)	0,13 (0,08-0,18)	0,13 (0,08-0,17)	0,273
Onda a', m/s	0,06 (0,04-0,08)	0,06 (0,04-0,08)	0,06 (0,04-0,08)	0,06 (0,04-0,1)	0,07 (0,04-0,11)	0,07 (0,05-0,1)	0,026
Onda S', m/s	0,08 (0,06-0,11)	0,07 (0,05-0,09)	0,07 (0,04-0,09)	0,08 (0,05-0,1)	0,08 (0,05-0,1)	0,08 (0,07-0,1)	0,007

Diâmetros cardíacos e FE•							
DDVE, mm	40,9 (26-51,2)	40 (29-49,2)	41 (30-51)	42 (30-54)	42 (27,7-52)	43 (32,8-52)	<0,001
DSVE, mm	24,2 (15-33)	25 (17-34,7)	25 (17-33)	24 (17-35)	25 (18-33)	25,6 (18-33)	0,033
DDVD, mm	15,1 (9,1-21,4)	15,2 (10-22)	15 (10-23)	15 (10-21,4)	17 (12-21)	17,8 (12-26)	0,026
FE, %	70 (60-78)	70 (56-78)	69 (60-78)	72 (62,5-77)	68,6 (61,5-81)	69,6 (62,2-81)	0,153
DDVE, mm	40,9 (26-51,2)	40 (29-49,2)	41 (30-51)	42 (30-54)	42 (27,7-52)	43 (32,8-52)	<0,001
Biomarcadores cardíacos							
Troponina T, > 0,01 µg/l	0,003 (0,003-0,01)	0,003 (0,003-0,01)	0,003 (0,003-0,01)	0,003 (0,003-0,005)	0,003 (0,003-0,018)	0,003 (0,003-0,02)	0,014
NT-proBNP, > 125pg/mL	73 (9-1107)	52 (5-537)	38 (8-226)	87 (15-711)	38 (6-163)	36 (12-126)	0,585

Valores normais dos parâmetros ecocardiográficos estão de acordo com a idade e o peso baseados nas recomendações da Sociedade Americana de Ecocardiografia (42,43); TD: tempo de desaceleração; TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico; VE: ventrículo esquerdo; VD: ventrículo direito; FE: fração de ejeção; DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo; DSVE: diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo; DDVD: diâmetro diastólico do ventrículo direito; S: septo; PP: parede posterior.

A mediana do DDVE, DSVE e DDVD aumentaram de forma significativa durante os 24 meses de observação ($p < 0,05$), mantendo-se, contudo, nos parâmetros normais.

A mediana dos níveis da troponina T apresentou aumento significativo em 18 e 24 meses ($p = 0,014$), provavelmente, devido a um aumento discreto ($0,02 \mu\text{g/l}$), observado em um paciente (Tabela 3).

A mediana dos parâmetros ecocardiográficos da parede lateral do ventrículo direito (ondas e', a' e S'), bem como a espessura do septo e da parede posterior permaneceram estáveis durante os 24 meses ($p > 0,05$).

Este foi o primeiro estudo que avaliou prospectivamente a função cardíaca sistólica e diastólica em pacientes com AIJ sob terapia anti-TNF, no qual houve evidente demonstração de segurança cardiovascular à longo prazo, apesar do envolvimento diastólico subclínico.

O desenho do nosso projeto, com inclusão de um grupo homogêneo de pacientes com AIJ (todos do tipo poliarticular com curso ativo, refratário a DMARDs não biológicos) e a inclusão de um grupo controle equiparável permitiu uma avaliação mais completa, considerando o crescimento das estruturas cardíacas com o crescimento somático dos nossos pacientes ^{44,45}. A avaliação longitudinal usando o ecocardiograma concomitantemente com parâmetros laboratoriais e uso de critérios rigorosos de exclusão permitiram um estudo mais preciso sobre a segurança cardiovascular da terapia anti-TNF em pacientes com AIJ.

Uma limitação do presente estudo foi o tamanho reduzido da nossa amostra, o qual pode ser explicado pela inclusão de pacientes com formas mais graves e refratárias da doença. Outra limitação foi a não utilização dos intervalos de tempo nas curvas do Doppler tecidual, para avaliação da função cardíaca. Contudo no início do nosso estudo, a utilização destes recursos não estava bem estabelecida na população pediátrica e, tendo em vista o caráter prospectivo de longo prazo, não incluímos tais achados para garantir a homogeneidade dos dados coletados.

O envolvimento cardíaco é comum em pacientes com AIJ de curso ativo e inclui pericardite, miocardite e valvulite ^{10,11,12}, com ampla e variada

apresentação clínica, variando de falência cardíaca à acometimento diastólico subclínico.

Ao contrário da função sistólica, que está relacionada a contração miocárdica, sendo de mais fácil percepção; a função diastólica, que está relacionada a capacidade de relaxamento miocárdica, é um processo de avaliação mais complexa em adultos e, principalmente, em crianças onde a frequência cardíaca mais elevada dificulta sua verificação; desta forma, disfunção diastólica em crianças pode ser detectada tardiamente, quando já estejam sintomáticas. A disfunção diastólica é caracterizada por um conjunto de achados ecocardiográficos e não por parâmetros isolados ^{20,21}.

A literatura é controversa em relação ao envolvimento diastólico em pacientes com AIJ. Nossos dados, no tempo basal, não demonstraram disfunção diastólica estabelecida, apesar de que o encurtamento do TRIV e a redução da velocidade da onda e' no septo podem estar relacionado a alguns componentes da disfunção diastólica, notadamente, complacência e relaxamento ^{21,23,45}. Em trabalho publicado por Oguz e colaboradores ⁴⁹, houve relato de alterações graves da função diastólica enquanto outros observaram alterações leves ^{12,50,51,52} em pacientes com AIJ e AR. A função sistólica é descrita como normal na maioria dos trabalhos ^{49,50}. O raciocínio comum a todos, foi a necessidade de acompanhamento cardiovascular na AR e AIJ.

O papel do tratamento da artrite (corticosteróides, AINhs e imunossupressores) na função cardíaca ainda não está claro em pediatria, embora existam evidências de pressão arterial elevada em pacientes com

AIJ relacionado ao uso de corticosteróides e AINHs, secundária a retenção hidrosalina ⁵³. Em pacientes adultos com AR, o uso de corticosteróides e outros imunossupressores, como azatioprina, ciclosporina e leflunamida foram associados com o aumento de risco cardiovascular ⁵³.

Nosso trabalho demonstrou que o uso prolongado do anti-TNF não comprometeu a função cardíaca em pacientes com AIJ, com descrito em estudos prospectivos em pacientes adultos com AR ⁵⁴. O aumento do diâmetro das cavidades cardíacas com valor significativo é esperado com o crescimento das crianças; a fração de ejeção manteve-se estável durante todo o estudo.

Nós complementamos outros estudos de função cardíaca em AIJ^{12,49,50} por associarmos biomarcadores cardíacos em nossas avaliações, com demonstração de ausência de efeitos deletérios no músculo cardíaco, uma vez que o NT-proBNP, que é um excelente marcador de dano miocárdico em população geral e com risco cardiovascular aumentado ²⁸, não apresentou alterações significantes durante os 24 meses do estudo. Apesar deste marcador poder ser associado com parâmetros de atividade da doença, sem outro fator cardiovascular, conforme já demonstrado em outro trabalho do nosso grupo com pacientes adultos portadores de espondilite anquilosante submetidos a terapia anti-TNF³². De fato, há evidência que citocinas pró-inflamatórias, como o TNF e interleucina-1, possam estimular a produção de BNP na ausência de comprometimento da função ventricular esquerda⁵⁵. Contudo, esta correlação ainda não está bem esclarecida em pacientes pediátricos e mais estudos são necessários.

Assim sendo, o presente estudo inédito evidenciou uma adequada segurança cardiovascular à longo prazo em pacientes com AIJ submetidos à terapia anti-TNF.

6. REFERÊNCIAS

1. Bruns A, Hilario MO, Jennings F, Silva CA, Natour J. Quality of life and impact of the disease on primary caregivers of juvenile idiopathic arthritis patients. *Joint Bone Spine*, 2007.
2. Savioli C, Silva CA, Ching LH, Campos LM, Prado EF, Siqueira JT. Dental and facial characteristics of patients with juvenile idiopathic arthritis. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo* 2004; 59: 93-8.
3. Kuczynski E, Silva CA, Cristofani LM, Kiss MH, Odone Filho V, Assumpcao FB Jr. Quality of life evaluation in children and adolescents with chronic and/or incapacitating diseases: a Brazilian study. *An Pediatr (Barc)* 2003; 58: 550-5.
4. Lovell DJ, Ruth NM. Pediatric clinical research. *Curr Opin Rheumatol* 2005; 17: 265-70.
5. Lovell DJ, Giannini EH, Reiff A, Cawkwell GD, Silverman ED, Nocton JJ, Stein LD, Gedalia A, Ilowite NT, Wallace CA, Whitmore J, Finck BK. Etanercept in children with polyarticular juvenile rheumatoid arthritis. *Pediatric Rheumatology Collaborative Study Group. N Engl J Med* 2000; 342: 763-9.
6. Lovell DJ, Giannini EH, Reiff A, Jones OY, Schneider R, Olson JC, Stein LD, Gedalia A, Ilowite NT, Wallace CA, Lange M, Finck BK,

- Burge DJ; Pediatric Rheumatology Collaborative Study Group. Long-term efficacy and safety of etanercept in children with polyarticular-course juvenile rheumatoid arthritis: interim results from an ongoing multicenter, open-label, extended-treatment trial. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 218-26.
7. Lovell DJ, Reiff A, Jones OY, Schneider R, Nocton J, Stein LD, Gedalia A, Ilowite NT, Wallace CA, Whitmore JB, White B, Giannini EH; Pediatric Rheumatology Collaborative Study Group. Long-term safety and efficacy of etanercept in children with polyarticular-course juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 1987-94.
8. Marzan, KA. Role of adalimumab in the management of children and adolescents with juvenile idiopathic arthritis and other rheumatic conditions. *Adolesc Health Med Ther* 2012; 3: 85-93
9. Suehiro RM, Aikawa NE, Carvalho JF, Silva CA. Terapia com agentes biológicos na criança e no adolescente. *Rev Paul Pediatr* 2010; 28: 227-36
10. Pietrewicz E, Urban M. Early atherosclerosis changes in children with juvenile idiopathic arthritis. *Pol Merkur Lekarski* 2007; 22: 211-4.
11. Facó MM, Nukumizu LA, Moraes AJP, Barros PCB, Troster EJ, Silva

- CAA. Avaliação dos óbitos e necrópsias em pacientes internados em um Serviço de Reumatologia Pediátrica por um período de 10 anos. *Rev Brasil Reumatol* 2005; 45: 55-63.
- 12.Gupta M, Syamasundar Rao P. Cardiac function in juvenile rheumatoid arthritis. *J Postgrad Med* 2004; 50: 266-7.
- 13.Svantesson H, Björkhem G, Elborgh R. Cardiac involvement in juvenile rheumatoid arthritis. *Acta Paediatr Scand* 1983; 72: 345-50.
- 14.Silva CA, Kiss MH. Manifestações extra-articulares iniciais em 80 pacientes com artrite reumatóide juvenil (ARJ) forma sistêmica. *Pediatria (São Paulo)* 1998; 20: 83-92.
- 15.Setoguchi S, Schneeweiss S, Avorn J, Katz JN, Weinblatt ME, Levin R, et al. Tumor necrosis factor-alpha antagonist use and heart failure in elderly patients with rheumatoid arthritis. *Am Heart J* 2008; 156:336-41.
- 16.Listing J, Strangfeld A, Kekow J, Schneider M, Kapelle A, Wassenberg S, et al. Does tumor necrosis factor alpha inhibition promote or prevent heart failure in patients with rheumatoid arthritis? *Arthritis Rheum* 2008; 58:667-77.

-
- 17.Cole J, Busti A, Kazi S. The incidence of new onset congestive heart failure and heart failure exacerbation in Veteran's Affairs patients receiving tumor necrosis factor alpha antagonists. *Rheumatol Int* 2007; 27:369-73.
- 18.Hagendorff A, Pfeiffer D. Echocardiographic functional analysis of patients with rheumatoid arthritis and collagen diseases. *Z Rheumatol* 2005; 64:239-48.
- 19.Di Franco M, Paradiso M, Mammarella A, Paoletti V, Labbadia G, Coppotelli L, Taccari E, Musca A. Diastolic function abnormalities in rheumatoid arthritis. Evaluation by echo Doppler transmitral flow and pulmonary venous flow: relation with duration of disease. *Ann Rheum Dis* 2000; 59:227-20.
- 20.Rakowski H, Appleton C, Chan KL, Dumensil JG, Honos G, Jue J, Koipillai C, Lepage S, Martin RP, Mercier LA, O'Kelley B, Prieur T, Sanfilippo A, Sasson Z, Alvarez N, Pruitt R, Thomson C, Tomlison C. Canadian consensus recommendation for the measurements and reporting of diastolic dysfunction by echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr* 1996; 9:736-60.
- 21.Otto, C M, Fundamentos de ecocardiografia clínica 2005, Elsevier.

-
- 22.Ommen SR, Nishimura RA, Appleton C, Miller FA, Oh JK, Redfield MM, Tajik AJ. Clinical utility of Doppler echocardiography and tissue Doppler imaging in the estimation of left ventricular filling pressures: A comparative simultaneous Doppler-catheterization study. *Circulation* 2000; 102:1788-94.
- 23.Nagueh SF, Middleton KJ, Kopelen H, Zoghbi WA, Quinones MA. Doppler tissue imaging: A new non-invasive technique for evaluation of left ventricular relaxation and estimation of filling pressures. *J Am Coll Cardiol* 1997; 30:1527-33.
- 24.Mandinov L, Eberli FR, Seiler C, Hess OM. Diastolic heart failure. *Cardiovasc Res* 2000; 45:813-25.
- 25.Nagueh SF, Mikati I, Kopelen H, Middleton KJ, Zoghbi WA, Quinones MA. Doppler estimation of left ventricular filling pressure in sinus tachycardia. A new application of Tissue Doppler imaging. *Circulation* 1998; 20:1644-50.
- 26.Birdane A, Cengiz K, Ata N, Cavusoglu Y, Kasifoglu T, Dongan SM, Gorenek B, Goktekin O, Unalir A, Timuralp B. Tissue Doppler Imaging in the evaluation of the Left and Right Ventricular diastolic functions in Rheumatoid Arthritis. *Echocardiography* 2007; 24:485-93.

-
27. Montecucco C, Gobbi G, Perlini S, Rossi S, Grandi AM, Caporali R, Finardi G. Impaired diastolic function in active rheumatoid arthritis. Relation with disease duration. *Clin Exp Rheumatol* 1998; 17:407-12.
28. Wang, TJ; Larson, MG; Levy, D; Benjamin, EJ; Leip, EP; Omland, T; Wolf, PA; Vasan, RS. Plasma Natriuretic Peptide Levels and the Risk of Cardiovascular Events and Death, *N Eng J Med* 2004; 350:655-63.
29. Provan S, Angel K, Semb AG, Atar D, Kvien TK. NT-proBNP predicts mortality in patients with rheumatoid arthritis: results from 10-year follow-up of the EURIDISS study. *Ann Rheum Dis*. 2010; 69:1946-50.
30. Yasuda, M; Yasuda, D; Tomooka, K; Nobunaga, M. Plasma Concentrations of Human Atrial Natriuretic Hormone in Patients with Connective Tissue Diseases, *Clin Rheumatol* 1992, 12:231-35.
31. Peters MJL, Welsh P, McInnes IB, Wolbink G, Dijkmans BA, Sattar N, Nurmohamed MT. Tumour necrosis factor α blockade reduces circulating N-terminal pro-brain natriuretic peptide levels in patients with active rheumatoid arthritis: results from a prospective cohort study. *Ann Rheum Dis* 2010; 69:1281-5.
32. Moraes JC, Ribeiro AC, Saad CG, Lianza AC, Silva CA, Bonfá E. NT-proBNP levels may be influenced by inflammation in active ankylosing

- spondylitis receiving TNF blockers: a pilot study. Clin Rheumatol 2013; 32:879-83.
- 33.Muller-Bardorff M, Hallermayer K, Schoder A, Ebert Ch, Borgya A, Gerhardt W. Improved troponin T ELISA specific for cardiac troponin T isoforms: assay development and analytical and clinical validation. Clin Chem 1997; 43:458-66.
- 34.Baum H, Braun S, Gerhardt W. Multicenter evaluation of a second-generation assay for cardiac troponin T. Clin Chem 1997; 43:1877-84.
- 35.Katwa G, Komatireddy G, Walker SE. False positive elevation of cardiac Troponin I in seropositive rheumatoid arthritis. J Rheumatol 2001; 29:2665.
- 36.Kenny PR, Finger DR. Falsely elevated cardiac troponin-I in patients with seropositive rheumatoid arthritis. J Rheumatol 2005; 32:1258-61.
- 37.Al-Awadhi AM, Olusi S, Hasan EA, Abdullah A. Serum concentration of cardiac Troponin I in patients with rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, primary Sjogren's syndrome and Graves' disease. Singapore Med J 2007; 48:847-9

-
38. Petty RE, Southwood TR, Manners P, Baum J, Glass DN, Goldenberg J, He X, Maldonado-Cocco J, Orozco-Alcala J, Prieur AM, Suarez-Almazor ME, Woo P. International League of Associations for Rheumatology classification of juvenile idiopathic arthritis: second revision, Edmonton, 2001. *J Rheumatol* 2004; 31:390-2.
39. The fourth report on the diagnosis, evaluation, and treatment of high blood pressure in children and adolescents. *Pediatrics* 2004; 114: 555-76.
40. Hochberg MC, Chang RW, Dwosh I et al. The American College of Rheumatology 1991 revised criteria for the classification of global functional status in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1992; 35:498.
41. Machado CS, Ruperto N, Silva CH, Ferriani VP, Roscoe I, Campos LM, Oliveira SK, Kiss MH, Bica BE, Sztajnbok F, Len CA, Melo-Gomes JA. Paediatric Rheumatology International Trials Organization. The Brazilian version of the Childhood Health Assessment Questionnaire (CHAQ) and the Child Health Questionnaire (CHQ). *Clin Exp Rheumatol* 2001; 19:S25-9.
42. Consolaro A, Ruperto N, Bazso A, Pistorio A, Magni-Manzoni S, Filocamo G et al, Paediatric Rheumatology International Trials Organisation. Development and validation of a composite disease

activity score for juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 2009; 61: 658-66.

43. Craig ME, Hatterlsley A, Donaghue K. International Society for Pediatric and Adolescents Diabetes. ISPAD Clinical Practice Consensus Guideline 2006-2007. Definition, epidemiology and classification. *Pediatr Diabetes* 2006; 7:343-51.

44. EIDEM BW, MCMAHON CJ, COHEN RR et al: Impact of cardiac growth on Doppler tissue imaging velocities: a study in healthy children. *J Am Soc Echocardiogr* 2004; 17: 212-21.

45. FROMMELT, PC: Echocardiographic measures of diastolic function in pediatric heart disease. *Curr Opin Cardiol* 2006; 21: 194-9.

46. Swaminathan S, Ferrer P, Wolff GS, Gomez-Marin O, Rusconi PG. Usefulness of Tissue Doppler echocardiography for evaluating ventricular function in children without heart disease. *The American Journal of Cardiology* 2003; 91: 571-4.

47. Kapusta L, Thijssen JM, Cuypers MHM, Petronella GM, Daniels P, Daniels O. Assessment of myocardial velocities in healthy children using Tissue Doppler Imaging Ultrassound in *Med & Biol* 2000; 26: 229-37.

-
- 48.Lindqvist P, Waldenstrom A, Henein M, Morner S, Kazzam E. Regional and Global Right Ventricular Function in Healthy Individuals Aged 20-90 years: A pulsed Doppler Tissue Imaging Study. *Echocardiography* 2005; 22: 305-34.
- 49.Oguz D, Ocal B, Ertan U, Narin H, Karademir S, Senocak F. Left ventricular diastolic functions in juvenile rheumatoid arthritis. *Pediatr Cardiol* 2000;21:374-7.
- 50.Bharti BB, Kumar S, Kapoor A, Agarwal A, Mishra R, Sinha N (2004) Assessment of left ventricular systolic and diastolic function in juvenile rheumatoid arthritis. *J Postgrad Med* 50:262-5.
- 51.Alkady EA, Helmy HA, Mohamed-Hussein AA. Assessment of cardiac and pulmonary function in children with juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatol Int* 2012; 32:39-46.
- 52.Abul MH, Erguven, M, Ozben B, Ayhan Y. The forgotten chamber: right ventricular functions in juvenile idiopathic arthritis. *Pediatr Cardiol* 2012; 33:739-43.
- 53.Solomon DH, Avorn J, Katz JN, Weinblatt ME, Setogouchi S, Levin R, Schneeweiss S. Immunosuppressive medications and hospitalization

for cardiovascular events for patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2006; 54:3790-8.

54.Jain A, Singh JA. Harms of TNF inhibitors in rheumatic diseases: a focused review of the literature. *Immunotherapy* 2013; 5:265-99

55.Ma KK, Ogawa T, de Bold AJ. Selective upregulation of cardiac brain natriuretic peptide at the transcriptional and translational levels by pro-inflammatory cytokines and by conditioned medium derived from mixed lymphocyte reactions via p38 MAP kinase. *J Mol Cell Cardiol* 2004; 36:505-13.

Anexo I – “Long-term evaluation of cardiac function in juvenile idiopathic arthritis under anti-TNF therapy.

Publicado na revista Clinical and Experimental Rheumatology.

Long-term evaluation of cardiac function in juvenile idiopathic arthritis under anti-TNF therapy

A.C. Lianza¹, N.E. Aikawa^{2,3}, J.C.B. Moraes³, G.N. Leal¹, S.S. Morhy¹, J.L. Andrade¹, E. Bonfa³, C.A. Silva^{2,3}

¹Radiology Unit, ²Paediatric Rheumatology Unit and ³Division of Rheumatology, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Brazil.

Abstract

Objective

This paper aims to perform global assessment of long-term cardiac function in juvenile idiopathic arthritis (JIA) patients under TNF blockage therapy.

Methods

Twenty-five polyarticular-course JIA patients pre-anti-TNF and 22 healthy controls underwent conventional/tissue Doppler echocardiography and cardiac biomarkers measurements (N-terminal pro-brain natriuretic peptide [NT-pro-BNP] and troponin T) at baseline (BL). Twenty-one JIA patients completed six evaluations during two consecutive years. Clinical/laboratorial evaluations were assessed before and during TNF blockage therapy.

Results

JIA patients and controls were comparable regarding current age ($p=0.898$) and female gender ($p=0.38$). At BL isovolumetric relaxation time of left ventricle ($p=0.03$), ventricular septum (VS), E' wave ($p=0.014$) and VS S wave velocity ($p=0.03$) were significantly reduced in JIA patients compared to controls. Frequencies of elevated NT-pro-BNP and troponin T levels were similar in JIA and controls ($p=0.297$ and $p=0.756$) and levels remained within normal range throughout the study, except for one patient with mild troponin T elevation. During TNF blockage therapy, none of the 21 participants had heart failure, ejection fraction or other parameters alterations in conventional and tissue Doppler. Only one had mild pulmonary hypertension. Further analysis revealed that JIA patients with elevated levels of NT-pro-BNP at BL had significantly more active joints ($p=0.025$) and higher ESR ($p=0.034$).

Conclusion

Long-term TNF blockage safety was demonstrated in JIA patients in spite of the observed subclinical diastolic involvement. Elevated cardiac biomarker in these patients was associated with inflammatory parameters reinforcing the need for a careful interpretation of this finding in patients with active disease.

Key words

juvenile idiopathic arthritis, anti-TNF, cardiac function, safety, NT- pro-BNP, troponin T

Alessandro C. Lianza, MD
 Nadia E. Aikawa, MD, PhD
 Julio C.B. Moraes, MD, PhD
 Gabriela N. Leal, MD
 Samira S. Morhy, MD, PhD
 José L. Andrade, MD, PhD
 Eloisa Bonfa, MD, PhD *
 Clovis A. Silva, MD, PhD*

*These authors made an equal contribution to this study.

Please address correspondence and reprint requests to:

Prof. Clovis Artur Almeida da Silva,
 Rua Araioses 152/81,
 Vila Madalena,
 05442-010 São Paulo, SP, Brazil.
 E-mail: clovisaasilva@gmail.com

Received on January 12, 2014; accepted in revised form on April 7, 2014.

© Copyright CLINICAL AND EXPERIMENTAL RHEUMATOLOGY 2014.

Introduction

Juvenile idiopathic arthritis (JIA) is a heterogeneous group of diseases that include chronic arthritis of unknown origin, which begins before 16 years of age (1-3). Extra-articular manifestations were described in 30% and may involve the cardiovascular system (2-5).

Cardiac involvement in JIA occurs in up to 30%, especially in systemic and polyarticular subtypes (5, 7). Pericarditis, the most common cardiac manifestation, was reported in up to 30% and it is generally asymptomatic. Diastolic dysfunction has been reported to be frequent in these patients (6-9). Myocarditis with congestive heart failure and endocarditis were described in 8% of this population (5).

In rheumatoid arthritis adult patients the use of biologic agents was associated with heart failure in retrospective studies (10). On the other hand, two large prospective evaluations showed an overall lower risk of cardiac dysfunction in those patients (11, 12). TNF blockage is also indicated in refractory JIA with polyarticular course (13-16), however there are no data regarding prospective echocardiography and cardiac biomarkers evaluations in JIA patients under these biologic therapies.

Therefore, the objective of this study was to perform a global assessment of the long-term cardiac function in JIA patients under TNF blockage therapy.

Patients and methods

During the enrolment period, from January 2008 to December 2012, 25 JIA patients were eligible for a two years prospective study. All of them fulfilled the International League Against Rheumatism criteria and were followed at the Paediatric Rheumatology Unit of Children's Institute of Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. All of them were refractory to non-biologic disease-modifying anti-rheumatic drugs (DMARDs) and eligible for anti-TNF therapy. Twenty-two healthy subjects were included in the control group. None of the patients or controls had structural cardiac disease, symptoms of heart failure or arrhythmias.

All participants were evaluated at base-

line for demographic data, echocardiography and cardiac biomarkers. Among the 25 JIA patients evaluated at baseline, one patient was excluded 4 months after the beginning of TNF blockage treatment for macrophage activation syndrome (17) and 3 others for poor adherence. Thereafter, 21 JIA patients were evaluated prospectively for cardiac function, clinical and laboratorial assessments, health related quality of life and treatment at baseline, and at 3, 6, 12, 18 and 24 months after anti-TNF treatment. None of them had symptoms of heart failure or arrhythmia.

This study was approved by the Local Ethics Committee of our University Hospital and an informed consent was obtained from all participants or their legal guardians.

Cardiac assessment

– Echocardiography

Echocardiography was performed using a Toshiba Aplio 500 machine (Toshiba America Medical Systems, Tustin, CA, USA) with a 2.5-MHz or 7-MHz electronic transducer according to the subject's weight. A comprehensive echocardiographic study was performed, including bidimensional, M-mode, conventional and tissue Doppler imaging. All the subjects were evaluated in a supine position by the same examiner blinded for the clinical presentation.

The pattern of ventricular filling was assessed by the maximum velocity of blood flow through atrioventricular valves during early diastole (E wave), deceleration time of E wave and maximum velocity of blood flow through atrioventricular valves during atrial contraction (A wave). The two other Doppler parameters used were: Deceleration Time (DT), defined as the interval between the E wave peak and baseline; Isovolumetric Relaxation Time (IVRT), the time interval between closing of the aortic valve and the opening of the mitral valve.

E/A velocity ratio greater than 1.32 is indicative of normal filling pattern. Mild diastolic dysfunction is associated with IVRT prolongation, while IVRT shortening suggests severe dysfunction with reduced ventricular compliance (18, 19). Myocardial velocities were obtained

Funding: This study was sponsored by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP #2009/51897-5 and 2010/10749-0 to E. Bonfa), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (n. 301411/2009-3 to E. Bonfa and n. 302724/2011-7 to CAS), Federico Foundation (E. Bonfa and C.A. Silva).
Conflicts of interests: none declared.

by tissue Doppler at the septum, right and left ventricles' free walls. E' and A' represent myocardial velocities during early and late diastole and S wave during systole. E' wave lower than 10 cm/s in the left ventricle free wall and 8 cm/s in the septum are related to mild diastolic dysfunction (20, 21).

Normal values of echocardiographic parameters according to age and weight were based on the American Society of Echocardiography Recommendations and Guidelines (20).

– Cardiac biomarkers

Cardiac biomarkers included dosage of N-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-pro-BNP, cut-off ≥ 125 pg/mL for elevated values) and troponin T (cut-off >0.01 μ g/l for myocardial damage) by electrochemiluminescence immunoassay (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Plasma samples were stored at -80°C until analysis. A blinded technician analysed all the samples in a single run on the same plate to minimise inter-assay variations. The coefficient of variation on batch intra-assay analyses was 1.4%.

Clinical and laboratorial assessments, disease scores and therapy of JIA patients

Clinical assessments of JIA patients included: number of active joints (swelling within a joint, or limitation in the range of joint movement with joint pain or tenderness), number of limited joints, patient and physician global assessment of arthritis activity measured in cm on a 10 cm horizontal visual analogue scale (VAS), morning stiffness duration and validated Brazilian version of Childhood Health Assessment Questionnaire (CHAQ) (22). Laboratorial assessment included erythrocyte sedimentation rate (ESR) (Westergreen method) and C-reactive protein (CRP) (nephelometry). The Juvenile Arthritis Disease Activity Score with 27-joint reduced count (JADAS-27) (23), defined as the linear sum of the scores of 4 components (physician global assessment of disease activity, measured on a 10-cm VAS where 0 is no activity and 10 is maximum activity; parent/patient global assessment of well-being, measured on a 10-cm VAS

Table I. Demographic data, echocardiography parameters and cardiac biomarkers in juvenile idiopathic arthritis (JIA) patients before anti-TNF therapy and healthy controls.

Variables	JIA patients (n=25)	Controls (n=22)	p-value
Demographic data			
Female gender, n (%)	14 (56)	9 (40.9)	0.385
Current age, years	10.3 (2.2–17.8)	9.5 (6–17)	0.898
Disease duration, years	2.7 (0.4–9.9)		
Echocardiography parameters			
Conventional Doppler			
E wave, m/s	1 (0.6–1.43)	1.01 (0.77–1.33)	0.974
A wave, m/s	0.55 (0.35–0.7)	0.53 (0.34–0.76)	0.272
DT	176 (129–275)	177.5 (129–222)	0.806
IVRT	76 (56–89)	81.5 (71–96)	0.030
Tissue Doppler			
Left ventricular free wall			
E' wave, m/s	0.17 (0.14–0.25)	0.18 (0.13–0.28)	0.153
A' wave, m/s	0.07 (0.05–0.12)	0.07 (0.05–0.1)	0.677
S wave, m/s	0.1 (0.06–0.15)	0.1 (0.07–0.15)	0.482
Ventricular septum			
E' wave, m/s	0.12 (0.1–0.16)	0.14 (0.12–0.16)	0.014
A' wave, m/s	0.06 (0.04–0.1)	0.07 (0.04–0.08)	0.79
S wave, m/s	0.08 (0.06–0.11)	0.08 (0.07–0.12)	0.03
Right ventricular free wall			
E' wave, m/s	0.16 (0.11–0.23)	0.15 (0.12–0.2)	0.579
A' wave, m/s	0.1 (0.06–0.17)	0.1 (0.07–0.13)	0.983
S wave, m/s	0.14 (0.08–0.17)	0.14 (0.09–0.17)	0.296
Chamber diameter and EF			
LVED, mm	40.9 (26–51.2)	41 (32.2–48)	0.749
LVSD, mm	24.1 (15–33)	24 (20–32)	0.782
RVED, mm	15 (9.1–21.4)	15.6 (13.4–21)	0.258
S, mm	6.3 (3.7–8.1)	6 (5–8)	0.536
PW, mm	6.3 (4–9)	6.2 (4.6–7.8)	0.662
EF, %	70 (60–78)	70.8 (57.7–79)	0.631
Cardiac biomarkers			
Troponin T	0.003 (0.003–0.01)	0.003 (0.003–0.005)	0.756
NT-pro-BNP, pg/mL	73 (7–1107)	42.5 (9–213)	0.156
Elevated Pro-BNP > 125 pg/mL	7 (28)	3 (13.6)	0.297

Data are expressed as n (%) and median (range); DT: deceleration time; IVRT: isovolumetric relaxation time; EF: ejection fraction; LVED: left ventricular diastolic diameter; LVSD: left ventricular systolic diameter; RVED: right ventricular diastolic diameter; S: ventricular septum; PW: posterior wall.

where 0 is very well and 10 is very poor; number of active joints; and ESR) (range: 0–57 points), was calculated in all JIA patients. Current treatment with non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), prednisone, DMARDs (methotrexate and leflunomide), immunosuppressive drugs (cyclosporine) and anti-TNF agents (adalimumab and etanercept) were determined.

Statistical analysis

Categorical variables were compared using Fisher's exact test. Continuous variables were presented as mean $\pm$ standard deviation or median (range) and compared using a two-sided Student's *t*-test or Mann-Whitney U-test. The prospective analysis of echocardiography parameters was performed by Friedman

repeated measures analysis of variance (ANOVA) on ranks, followed by a *post-hoc* analysis to determine where the difference occurred between the groups. Correlations between NT-pro-BNP levels and JIA parameters and echocardiography measurements were analysed by Spearman's rank correlation coefficient. The statistical significance was set at *p*-value <0.05 .

Results

JIA patients at baseline and healthy controls

Demographic data, echocardiographic parameters and cardiac biomarkers in 25 JIA patients before anti-TNF therapy and 22 healthy controls are included in Table I. The median of current age and frequency of female gender were

Table II. Demographic data, disease parameters and treatment in juvenile idiopathic arthritis patients with high and normal N-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-pro-BNP) levels at baseline.

	NT-Pro-BNP ≥125pg/mL (n=7)	NT-Pro-BNP <125pg/mL (n=18)	p-value
Demographic data			
Female gender, n (%)	2 (28.6)	9 (50)	0.407
Current age, years	7.8 (4.3–17.8)	10.5 (2.2–17.3)	0.785
Age at diagnosis, years	4.2 (3.2–14.1)	6.9 (1.5–13.3)	0.976
Disease duration, years	3.2 (0.4–9.2)	2.5 (0.4–9.9)	0.976
JIA parameters			
Morning stiffness, min	5 (0–60)	2.8 (0–180)	0.92
Number of active joints, n (%)	8 (2–20)	3 (0–26)	0.025
Number of limited joints, n (%)	8 (1–24)	7 (0–31)	0.856
ESR, mm/1 st h	55 (25–65)	29 (4–61)	0.034
CRP, mg/L	49.9 (0.8–332.9)	11.1 (0.2–150)	0.102
Patient's VAS, cm	4 (0–10)	2.5 (0–8)	0.607
Physician's VAS, cm	4 (3–7)	3 (0–8)	0.079
JADAS-27	23 (12.7–29.5)	11 (3–30.5)	0.014
CHAQ	0.625 (0–2.375)	0.563 (0–2.125)	0.88
Treatment			
NSAID	7 (100)	17 (94.4)	1.0
Glucocorticoids	2 (28.6)	6 (33.3)	1.0
Methotrexate	6 (85.7)	17 (94.4)	0.49
Leflunomide	2 (28.6)	3 (16.7)	0.597
Cyclosporine	2 (28.6)	5 (27.8)	1.0

Data are expressed as n (%) and median (range); ESR: erythrocyte sedimentation rate; CRP: C-reactive protein; VAS: visual analogue scale; JADAS-27: Juvenile Arthritis Disease Activity Score with 27-joint reduced count; CHAQ: Childhood Health Assessment Questionnaire; NSAID: non-steroidal anti-inflammatory drug.

similar in both groups (10.3 vs. 9.5, $p=0.898$; 56% vs. 40.9%, $p=0.385$; respectively) (Table I).

Regarding the echocardiographic parameters at baseline, the median of IVRT by conventional Doppler (76 [56–89] vs. 81.5 [71–96] ms, $p=0.03$), the ventricular septum (VS) E' (0.12 [0.1–0.16] vs. 0.14 [0.12–0.16] m/s, $p=0.014$) and VS S waves by tissue Doppler were significantly lower in JIA patients vs. controls (0.08 [0.06–0.11] vs. 0.08 [0.07–0.12], $p=0.03$) (Table I). The medians of troponin T and NT-pro-BNP cardiac biomarkers were similar in both groups at BL. Likewise, the frequency of elevated NT-pro-BNP levels was comparable in JIA (28%) vs. health controls (13.6%), ($p=0.297$) (Table I).

Further comparison of JIA patients with elevated and normal NT-pro-BNP levels at baseline showed a significantly higher number of active joints (8 vs. 3, $p=0.025$), ESR (55 vs. 29 mm/1st hour, $p=0.034$) and JADAS-27 (23 vs. 11, $p=0.014$) in the former group. No association was observed between elevated and normal NT-pro-BNP levels and demographic data, other JIA param-

eters and concomitant treatment (Table II). Moreover at baseline, positive correlations were observed between NT-pro-BNP levels and number of active joints ($r=+0.59$, $p=0.002$) and between NT-pro-BNP levels and ESR ($r=+0.51$, $p=0.009$). With regard to JADAS, at baseline there was a positive correlation solely with NT-pro-BNP levels ($r=+0.69$, $p<0.0001$) and not with echocardiography ($p>0.05$). After 24 months of anti-TNF therapy, no correlation was observed between JADAS and serum biomarkers or echocardiographic parameters ($p>0.05$).

Only 3 healthy controls had NT-pro-BNP higher than 125 pg/mL, without any evidence of infectious disease.

Prospective evaluation of JIA patients under TNF blockage

Table III shows a prospective analysis of conventional and tissue Doppler echocardiography in 21 JIA patients before and during anti-TNF therapy. The median of septum A' wave increased slightly at 18 and 24 months ($p=0.026$) and the median of septum S' wave had a mild decrease at 3 and 6 months, and

a mild increase at 12, 18 and 24 months ($p=0.007$). Of note, all values remained within normal range (Table III). Mild pulmonary hypertension was observed in only one (4.7%) of 21 JIA patients after 12 month of anti-TNF therapy (estimated systolic pulmonary artery pressure=40 mmHg).

The median of LVED, LVSD and RVED increased significantly during the 24 months ($p<0.05$) although in the normal range. The median of troponin T levels increased significantly at 18 and 24 months ($p=0.014$), probably due to the slight elevation (0.02 µg/l) observed in one patient (Table III). The median of echocardiographic parameters of the right ventricular free wall (E', A' and S waves), as well as ventricular septum and posterior wall thickness were similar during the 24 months ($p>0.05$).

Discussion

To our knowledge, this was the first study to assess prospectively cardiac function in JIA patients under TNF blockage therapy, and clearly showed long-term cardiovascular safety.

The strength of our study was the homogenous group of polyarticular course JIA refractory to DMARDs (1) and inclusion of an age-matched healthy control group since the heart growth occurs at childhood and reference values change according to age (20). The prospective design using echocardiographic concomitantly with laboratorial parameters and the rigorous exclusion criteria applied gave an unique opportunity to a more accurate determination of the cardiovascular safety of the TNF-blockage therapy in JIA patients. One limitation of this study was the small sample size. We also have not evaluated time intervals using TDI derived measurements, such as the IVRT, since this parameter was not standardised for pediatric population at our initial enrollment. Due to the prospective nature of this study, we had to maintain the same assessment with TDI wave velocities for all patients in order to sustain homogeneity of data collection.

Cardiac involvement is common in active JIA patients and includes pericarditis, myocarditis and valvulitis (5) with a wide range of clinical manifestations

Table III. Prospective analysis of conventional and tissue Doppler echocardiography in 21 juvenile idiopathic arthritis patients before and during anti-TNF therapy.

Variables	Baseline	3M	6M	12M	18M	24M	p-value
Conventional Doppler-Mitral inflow*							
E wave, m/s	1.05 (0.6–1.43)	1.01 (0.79–1.25)	0.99 (0.62–1.47)	1.0 (0.68–1.5)	1.0 (0.68–1.4)	1.03 (0.7–1.4)	0.765
A wave, m/s	0.55 (0.35–0.7)	0.55 (0.35–1.6)	0.58 (0.34–1.0)	0.49 (0.4–0.77)	0.56 (0.3–0.81)	0.5 (0.34–0.7)	0.703
DT	176 (129–275)	172 (125–249)	183 (103–230)	192 (117–242)	188 (131–258)	183 (131–242)	0.855
IVRT	76 (56–89)	72 (58–97)	76 (55–92)	76.5 (53–97)	72 (53–97)	79 (63–89)	0.751
Tissue Doppler*							
Left ventricular free wall							
E' wave, m/s	0.17 (0.14–0.25)	0.17 (0.15–0.26)	0.17 (0.14–0.22)	0.16 (0.12–0.22)	0.15 (0.12–0.22)	0.17 (0.1–0.24)	0.051
A' wave, m/s	0.07 (0.05–0.1)	0.07 (0.04–0.11)	0.07 (0.05–0.13)	0.07 (0.06–0.13)	0.08 (0.05–0.1)	0.07 (0.05–0.11)	0.521
S wave, m/s	0.1 (0.06–0.15)	0.09 (0.05–0.17)	0.1 (0.06–0.18)	0.1 (0.06–0.18)	0.1 (0.07–0.15)	0.09 (0.07–0.15)	0.655
Ventricular septum							
E' wave, m/s	0.12 (0.1–0.16)	0.12 (0.1–0.16)	0.13 (0.09–0.16)	0.13 (0.08–0.17)	0.13 (0.08–0.18)	0.13 (0.08–0.17)	0.273
A' wave, m/s	0.06 (0.04–0.08)	0.06 (0.04–0.08)	0.06 (0.04–0.08)	0.06 (0.04–0.1)	0.07 (0.04–0.11)	0.07 (0.05–0.1)	0.026
S wave, m/s	0.08 (0.06–0.11)	0.07 (0.05–0.09)	0.07 (0.04–0.09)	0.08 (0.05–0.1)	0.08 (0.05–0.1)	0.08 (0.07–0.1)	0.007
Chamber diameter and EF*							
LVED, mm	40.9 (26–51.2)	40 (29–49.2)	41 (30–51)	42 (30–54)	42 (27.7–52)	43 (32.8–52)	<0.001
LVSD, mm	24.2 (15–33)	25 (17–34.7)	25 (17–33)	24 (17–35)	25 (18–33)	25.6 (18–33)	0.033
RVED, mm	15.1 (9.1–21.4)	15.2 (10–22)	15 (10.23)	15 (10–21.4)	17 (12–21)	17.8 (12–26)	0.026
EF, %	70 (60–78)	70 (56–78)	69 (60–78)	72 (62.5–77)	68.6 (61.5–81)	69.6 (62.2–81)	0.153
Cardiac biomarkers							
Troponin T, >0.01µg/l	0.003 (0.003–0.01)	0.003 (0.003–0.01)	0.003 (0.003–0.01)	0.003 (0.003–0.005)	0.003 (0.003–0.018)	0.003 (0.003–0.02)	0.014
NT pro-BNP, >125pg/mL	73 (9–1107)	52 (5–537)	38 (8–226)	87 (15–711)	38 (6–163)	36 (12–126)	0.585

Normal range values of echocardiographic parameters according to age and weight were based on the American Society of Echocardiography Recommendations and Guidelines (18); DT: deceleration time; IVRT: isovolumetric relaxation time; EF: ejection fraction; LVED: left ventricular diastolic diameter; LVSD: left ventricular systolic diameter; RVED: right ventricular diastolic diameter; S: ventricular septum.

varying from heart failure to asymptomatic diastolic dysfunction.

Diastolic evaluation is a complex process in adults, requiring a group of altered parameters. In children and adolescents, some of these findings may not appear, and specific findings may not be present until they become symptomatic. Our data, at baseline, do not reveal an overt diastolic dysfunction, however, the reduced velocity of the septum E wave and shortening of the IVRT may indicate involvement of some diastolic components, particularly compliance and relaxation (19, 21). In contrast, Oguz *et al.* (7), reported serious abnormalities in diastolic function whereas others also observed mild alterations in JIA (6, 8, 9) and adults with rheumatoid arthritis (23). Additionally, systolic function was normal in JIA patients, as observed by other authors (7, 26).

The role of concomitant treatments (steroids, NSAIDs and immunosuppressive agents) in cardiac function is not clear in the pediatric population, although there are some evidences of elevated blood pressure in JIA patients related to steroid therapy and NSAIDs intake, leading to salt and water retention (9). In adult patients with RA, oral glucocorticoids as well as other immunosuppressive agents such as azathio-

prine, cyclosporine, and leflunomide were associated with an increased cardiovascular risk, in contrast to MTX (27, 28).

Importantly, the long-term use of TNF blockage did not hamper heart function of JIA patients, as described in a prospective study in RA adult patients (25). The significant increase observed in left and right ventricle diameters are consistent with children's growth.

We extended previous studies of cardiac function in JIA (6–9, 26) and further demonstrated using serum cardiac biomarkers that anti-TNF therapy does not seem to have a deleterious effect in cardiac function since NT-pro-BNP is an excellent predictor for systolic heart failure in the general population and high-risk cardiovascular groups (29).

Of note, this marker was associated with disease activity parameters with no other evidence of cardiovascular disease, as also reported by our group in adults with active ankylosing spondylitis receiving TNF blockers (30). This correlation is still poorly known in pediatric population and further studies are necessary. In fact, there is some evidence that pro-inflammatory cytokines, such as TNF and interleukin-1, could stimulate BNP production in the absence of left ventricular function impairment (31).

Conclusion

In conclusion, long-term anti-TNF cardiovascular safety was demonstrated in JIA patients in spite of the observed mild subclinical diastolic involvement. Elevated cardiac biomarker in these patients was associated with inflammatory parameters reinforcing the need for a careful interpretation of this finding in patients with active disease.

Key messages

- Long-term TNF blockage is safe in terms of cardiovascular aspect in JIA patients in spite of subclinical diastolic involvement;
- Elevated cardiac biomarker in JIA patients may be associated with inflammatory parameters.

References

1. PETTY RE, SOUTHWOOD T, MANNERS P *et al.*: International League of Associations for Rheumatology classification of juvenile idiopathic arthritis: second revision, Edmonton, 2001. *J Rheumatol* 2004; 31: 390–2.
2. RAVELLI A, MARTINI A: Juvenile idiopathic arthritis. *Lancet* 2007; 369: 767–78.
3. COJOCARU M, COJOCARU IM, SILOSI I, VRABIE CD, TANASESCU R: Extra-articular manifestations in rheumatoid arthritis. *Mae-dica* (Buchar) 2010; 5: 286–91.
4. VERAZZA S, NEGRO G, MARAFON D, CONSOLARO A, MARTINI A, RAVELLI A: Possible discontinuation of therapies after clinical

- remission in juvenile idiopathic arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2013; 31: S98-101.
5. TAMASHIRO MS, AIKAWA NE, CAMPOS LM, CRISTOFANI LM, ODONE-FILHO V, SILVA CA: Discrimination of acute lymphoblastic leukemia from systemic-onset juvenile idiopathic arthritis at disease onset. *Clinics* (Sao Paulo) 2011; 66: 1665-9.
 6. GUPTA M, SYAMASUNDAR RAO P: Cardiac function in juvenile rheumatoid arthritis. *J Postgrad Med* 2004; 50: 266-7.
 7. OGUZ D, OCAL B, ERTAN U, NARIN H, KARADEMIR S, SENOC AK F: Left ventricular diastolic functions in juvenile rheumatoid arthritis. *Pediatr Cardiol* 2000; 21: 374-7.
 8. BHARTI BB, KUMAR S, KAPOOR A, AGARWAL A, MISHRA R, SINHA N: Assessment of left ventricular systolic and diastolic function in juvenile rheumatoid arthritis. *J Postgrad Med* 2004; 50: 262-5.
 9. ALKADY EA, HELMY HA, MOHAMED-HUSSEIN AA: Assessment of cardiac and pulmonary function in children with juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatol Int* 2012; 32: 39-46.
 10. SETOGUCHI S, SCHNEEWEISS S, AVORN J *et al.*: Tumor necrosis factor- α antagonist use and heart failure in elderly patients with rheumatoid arthritis. *Am Heart J* 2008; 156: 336-41.
 11. LISTING J, STRANGFELD A, KEKOW J *et al.*: Does tumor necrosis factor α inhibition promote or prevent heart failure in patients with rheumatoid arthritis? *Arthritis Rheum* 2008; 58: 667-77.
 12. COLE J, BUSTI A, KAZI S: The incidence of new onset congestive heart failure and heart failure exacerbation in Veteran's Affairs patients receiving tumor necrosis factor α antagonists. *Rheumatol Int* 2007; 27: 369-73.
 13. LOVELL DJ, GIANNINI EH, REIFF A *et al.*: Etanercept in children with polyarticular juvenile rheumatoid arthritis. Pediatric Rheumatology Collaborative Study Group. *N Engl J Med* 2000; 342: 763-9.
 14. HASKES PJ, UZIEL Y, LAXER RM: The safety profile of biologic therapies for juvenile idiopathic arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2010; 6: 561-71.
 15. MORI M, TAKEI S, IMAGAWA T *et al.*: Safety and efficacy of long-term etanercept in the treatment of methotrexate-refractory polyarticular-course juvenile idiopathic arthritis in Japan. *Mod Rheumatol* 2012; 22: 720-6.
 16. HUGLE B, BURGOS-VARGAS R, INMAN RD *et al.*: Long-term outcome of anti-tumor necrosis factor α blockade in the treatment of juvenile spondyloarthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2014; 32: 424-31.
 17. AIKAWA EA, CARVALHO JF, BONFÁ E, LOTITO AP, SILVA CA: Macrophage activation syndrome associated with etanercept in a child with systemic onset juvenile idiopathic arthritis. *Isr Med Assoc J* 2009; 11: 635-6.
 18. MANDINOV L, EBERLI FR, SEILER C, HESS OM: Diastolic heart failure. *Cardiovasc Res* 2000; 45: 813-25.
 19. NAGUEH S, APPLETON CP, GILLEBERT TC *et al.*: Recommendations for the evaluation of left ventricular diastolic function by Echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr* 2009; 22: 107-33.
 20. EIDEM BW, MCMAHON CJ, COHEN RR *et al.*: Impact of cardiac growth on Doppler tissue imaging velocities: a study in healthy children. *J Am Soc Echocardiogr* 2004; 17: 212-21.
 21. FROMMELT PC: Echocardiographic measures of diastolic function in pediatric heart disease. *Curr Opin Cardiol* 2006; 21: 194-9.
 22. MACHADO CS, RUPERTO N, SILVA CH *et al.*: Paediatric Rheumatology International Trials Organisation. The Brazilian version of the Childhood Health Assessment Questionnaire (CHAQ) and the Child Health Questionnaire (CHQ). *Clin Exp Rheumatol* 2001; 19 (Suppl. 23): S25-S29.
 23. CONSOLARO A, RUPERTO N, BAZZO A *et al.*: Paediatric Rheumatology International Trials Organisation. Development and validation of a composite disease activity score for juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 2009; 61: 658-66.
 24. LIANG KP, MYASOEDOVA E, CROWNSON CS *et al.*: Increased prevalence of diastolic dysfunction in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2010; 69: 1665-70.
 25. JAIN A, SINGH JA: Harms of TNF inhibitors in rheumatic diseases: a focused review of the literature. *Immunotherapy* 2013; 5: 265-99.
 26. ABUL MH, ERGUVEN M, OZBEN B, AYHAN Y: The forgotten chamber: right ventricular functions in juvenile idiopathic arthritis. *Pediatr Cardiol* 2012; 33: 739-43.
 27. SOLOMON DH, AVORN J, KATZ JN *et al.*: Immunosuppressive medications and hospitalization for cardiovascular events in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 3790-8.
 28. RAAB A, SENGLER C, NIEWERTH M *et al.*: Comorbidity profiles among adult patients with juvenile idiopathic arthritis: results of a biologic register. *Clin Exp Rheumatol* 2013; 31: 796-802.
 29. WANG TJ, LARSON MG, LEVY D *et al.*: Plasma natriuretic peptide levels and the risk of cardiovascular events and death. *N Engl J Med* 2004; 350: 655-63.
 30. MORAES JC, RIBEIRO AC, SAAD CG, LIANZA AC, SILVA CA, BONFÁ E: NT-pro-BNP levels may be influenced by inflammation in active ankylosing spondylitis receiving TNF blockers: a pilot study. *Clin Rheumatol* 2013; 32: 879-83.
 31. MA KK, OGAWA T, DE BOLD AJ: Selective upregulation of cardiac brain natriuretic peptide at the transcriptional and translational levels by pro-inflammatory cytokines and by conditioned medium derived from mixed lymphocyte reactions via p38 MAP kinase. *J Mol Cell Cardiol* 2004; 36: 505-13.

Anexo 2: NT-proBNP levels may be influenced by inflammation in active ankylosing spondylitis receiving TNF blockers: a pilot study.

Artigo publicado na revista Clinical Rheumatology

NT-proBNP levels may be influenced by inflammation in active ankylosing spondylitis receiving TNF blockers: a pilot study

Julio C. B. Moraes · Ana C. M. Ribeiro ·
Carla G. S. Saad · Alessandro C. Lianza ·
Clovis A. Silva · Eloísa Bonfá

Received: 4 July 2012 / Revised: 2 January 2013 / Accepted: 21 January 2013
© Clinical Rheumatology 2013

Abstract N-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP) is a strong marker of cardiovascular disease with recent evidence that inflammation may also influence its levels; discrimination of this confounding variable is of particular interest in rheumatic diseases. Therefore, we evaluated NT-proBNP in ankylosing spondylitis (AS) patients pre- and post-TNF blocker to determine the possible association between NT-proBNP levels and inflammatory parameters. Forty-five consecutive AS patients without previous/current cardiovascular disease or systolic myocardial dysfunction, who were eligible to anti-TNF therapy, were prospectively enrolled. All patients received TNF blockers and they were evaluated for circulating NT-proBNP levels, clinical and laboratory parameters of disease activity, traditional cardiovascular risk factors, and conventional and tissue Doppler imaging echocardiography at baseline (BL) and 6 months after (6M) treatment. At BL, all patients had active AS, NT-proBNP levels had a median of 36 (20–72)pg/mL and 11 % were high in spite of no systolic alteration. Multiple linear regression analysis revealed that this peptide, at BL, was independently correlated with erythrocyte sedimentation rate (ESR) ($p<0.001$), age ($p=$

0.01), and pulse pressure ($p=0.01$). After 6M, all disease parameters improved and NT-proBNP levels were significantly reduced [24 (16–47)pg/mL, $p=0.037$] compared to BL. Changes in NT-proBNP were positively correlated with ESR changes ($r=0.41$, $p=0.006$). Cardiovascular risk factors remained stable during follow-up. In conclusion, our data suggest that elevations of NT-proBNP should be interpreted with caution in active AS patients with no other evidence of cardiovascular disease. The short-term reduction of NT-proBNP levels in these patients receiving anti-TNF therapy appears to reflect an improvement in inflammatory status.

Keywords Ankylosing spondylitis · Anti-TNF · Cardiovascular disease · Inflammation · NT-proBNP

Introduction

Cardiovascular risk is increased in ankylosing spondylitis (AS) but not fully explained by traditional risk factors [1–3]. Inflammatory mediators, such as TNF and IL-6, may underlie this process by affecting endothelial cell function [4, 5].

N-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP) is a counterregulatory hormone involved in the homeostasis of circulating volume and cardiovascular remodeling associated with increased risk of death and cardiovascular events in the general population [6]. NT-proBNP was shown to be an independent predictor of 10-year mortality in rheumatoid arthritis (RA) [7].

In RA, a strong body of evidence suggests that anti-TNF agents are able to reduce the cardiovascular burden, and a study evaluating NT-proBNP levels suggested that RA

ClinicalTrials.govnumber:NCT01072058

J. C. B. Moraes (✉) · A. C. M. Ribeiro · C. G. S. Saad ·
C. A. Silva · E. Bonfá
Division of Rheumatology, Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo, Av. Dr. Arnaldo, 455-3o andar-
Reumatologia, sala 3190, São Paulo, SP 01246-903, Brazil
e-mail: juliocbmoraes@yahoo.com.br

A. C. Lianza
Division of Radiology, Faculdade de Medicina da Universidade
de São Paulo, São Paulo, Brazil

patients could experience a decline in cardiovascular risk using TNF blockers [8].

Accordingly, a recent study suggested that NT-proBNP is possibly correlated with inflammatory markers and disease activity in RA; however, the inclusion of subjects with previous cardiovascular disease hampers the interpretation of these findings [9]. Alternatively, the presence of inflammation might be considered a noncardiac explanation for the observed elevation in NT-proBNP levels, which is supported by in vitro studies [10, 11].

TNF is also a pivotal cytokine in AS pathophysiology, and anti-TNF therapy is widely used for this disease [1]. However, no data are available regarding NT-proBNP levels in active AS and the possible influence of inflammation control by TNF blockage.

Therefore, we prospectively evaluated NT-proBNP levels in active AS patients without evidence of clinical and echocardiographic systolic myocardial dysfunction pre- and post-TNF blockage. We also assessed the possible relationship between NT-proBNP and inflammatory status with a parallel evaluation of myocardial function.

Methods

Forty-five consecutive AS patients (New York criteria) who had inadequate responses to non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and/or to disease-modifying anti-rheumatic drugs and who were eligible to receive anti-TNF agents were enrolled [12]. ASAS/EULAR recommendations for anti-TNF use were followed for eligibility criteria [13]. All patients received TNF blockers (adalimumab, etanercept, or infliximab in their regular regimen). None of them had current/previous history of heart failure, arrhythmia, coronary disease, age >70 years old, creatinine >1.5 mg/dL, cardiac valve abnormalities, and blood pressure $\geq 160 \times 100$ mmHg.

Patients were prospectively evaluated at baseline (BL) and 6 months (6M) after anti-TNF therapy for demographic, clinical, laboratory, and treatment data. The study was approved by local ethics committee, and all patients signed informed consent.

Disease and activity data

Disease activity was assessed by the Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index (BASDAI) and Ankylosing Spondylitis Disease Activity Scores using erythrocyte sedimentation rate (ESR) and C-reactive protein (CRP) (ASDAS-ESR and ASDAS-CRP). ESR was measured by modified Westergreen method and CRP by nephelometric method. Functional and quality-of-life improvements were assessed by the Bath Ankylosing Spondylitis Function

Index and the Ankylosing Spondylitis Quality of Life Score, respectively [12].

Cardiovascular risk factors

Dyslipidemia was determined according to the National Cholesterol Education Program [14]. Hypertension was defined as blood pressure $\geq 140/90$ mmHg or the use of anti-hypertensive agents. A fasting glucose level ≥ 7 mmol/L or the use of hypoglycemic agents defined diabetes. Smoking status was categorized into current smokers and non-smokers. The body mass index was calculated by the formula weight/squared height. Waist circumference was also measured (normal range, up to 102 cm for males and 88 cm for females).

NT-proBNP

NT-proBNP was measured by electrochemiluminescence immunoassay (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Plasma samples, stored at -80°C , were analyzed by a blinded technician in a single run with samples grouped on the same plate to minimize inter-assay variations. The coefficient of variation on batch analyses was 1.4 %. The cutoff was ≥ 100 pg/mL for elevated values.

Echocardiography

The study was performed using a GE Vingmed System Vivid-3 Expert machine (GE medical system, Wauwatosa, WI, USA) and a 2.5-MHz electronic transducer. All echocardiography evaluations were performed with the patient in supine position by the same examiner blinded to patient data. M-mode and two-dimensional imaging followed by conventional and tissue Doppler imaging (TDI) were performed. Normal values for Doppler-derived diastolic measurements according to age were obtained from the Recommendations of the American Society of Echocardiography [15]. The electrocardiography study was performed just before the echocardiography for all subjects.

Statistical analysis

All values were expressed as means (SD) for normally distributed variables or medians and interquartile ranges (IQRs) for variables with a non-normal distribution. Correlations between NT-proBNP, AS, and cardiovascular variables at baseline were calculated using Spearman rank order correlation. Mann–Whitney test or *t* test was used to observe differences between patients with high or normal NT-proBNP levels at baseline, as appropriate. Paired sample *t* tests or the Wilcoxon signed-rank test were used to observe differences between measurements at BL and 6M, as appropriate. Fisher

exact test was used to compare categorical variables. Multi-variable linear regression analysis was performed using those variables that exhibited a statistically significant association with NT-proBNP. This included evaluation of the following variables: age, gender, ESR, and pulse pressure. Similar analyses were performed to evaluate the correlations between changes in circulating levels of NT-proBNP with changes in inflammatory and disease activity parameters. All analyses used a two-sided significance level of 0.05.

Results

Baseline characteristics

Table 1 illustrated patients' characteristics at baseline regarding demographic, disease parameters, and treatment.

Cardiovascular risk factors

Prevalence of traditional cardiovascular risk factors during follow-up is illustrated in Table 1. Cardiovascular risk factors remained stable throughout study period. None of the AS patients had clinical cardiovascular events during the follow-up.

Prospective clinical and laboratory evaluation

At BL, all patients had active disease and moderate/high CRP and ESR. Treatment with anti-TNF induced clinical

response at 6M, as measured by significant decreases in disease parameters (Table 1).

Conventional and TDI echocardiography evaluation

No patient had systolic ventricular dysfunction, and no significant differences were identified when the values of conventional and TDI parameters were compared pre- and posttreatment ($p>0.05$). With regard to systolic function, all parameters were within normal range and remained unchanged during follow-up as well as electrocardiography studies. The proportion of subjects with subclinical diastolic dysfunction grade I remained stable during study period (Table 1). The newly diagnosed ventricular diastolic dysfunction, in five patients, was mild with isolated velocity alterations without other concomitant structural atrial changes and in all but one NT-proBNP levels decreased.

Prospective assessment of NT-proBNP levels

NT-proBNP levels were elevated in five (11.1 %) patients prior to treatment. A higher ASDAS-CRP and ASDAS-ESR, and trend to higher BASDAI, ESR, and CRP levels were observed in patients with increased NT-proBNP compared to those with normal levels (Table 2). Further analysis in all patients revealed positive correlations of baseline NT-proBNP levels with: ESR ($r=0.46$, $p=0.002$), age ($r=0.45$, $p=0.002$), female gender ($r=0.39$, $p=0.01$), and pulse pressure ($r=0.37$, $p=0.01$). Upon multivariate analyses, ESR

Table 1 Prospective evaluation of disease parameters and traditional cardiovascular risk factors in 45 ankylosing spondylitis patients receiving TNF blockage therapy

Data are presented as the means (SD) or medians (IQR)

NSAID non-steroidal anti-inflammatory drugs, *BASDAI* Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index, *ASDAS* Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score, *BASFI* Bath Ankylosing Spondylitis Function Index, *ASQoL* Ankylosing Spondylitis Quality of Life Score, *CRP* C-reactive protein, *ESR* erythrocyte sedimentation rate, *NT-proBNP* N-terminal pro-brain natriuretic peptide, *BP* blood pressure

	Baseline	6 months	<i>p</i> value
Age (years)	37.1 (12)	—	—
Male gender (%)	73.3	—	—
Disease duration (years)	11.6 (9)	—	—
NSAID use (%)	100	100	1.0
Prednisone use (%)	24	11	0.17
BASDAI	5.1 (2.2)	3.0 (2.6)	<0.001
ASDAS-CRP	3.6 (1.1)	1.9 (1.1)	<0.001
ASDAS-ESR	3.0 (1.1)	1.7 (1.1)	<0.001
BASFI	5.3 (2.5)	3.5 (2.9)	<0.001
ASQoL	11.5 (6–14)	5.0 (2–12)	0.01
CRP (mg/dL)	1.86 (0.88–4.08)	0.26 (0.09–0.58)	<0.001
ESR (mm/h)	15.5 (9–30.5)	5 (2–8)	<0.001
NT-proBNP (pg/mL)	36 (20–72)	24 (16–47)	0.037
Ventricular diastolic dysfunction (%)	28.9	40	0.37
Systolic BP (mmHg)	125 (114–134)	124 (110–135)	0.10
Diastolic BP (mmHg)	75 (64–85)	73 (61.5–84.5)	0.21
Pulse pressure (mmHg)	51.5 (12.5)	50.1 (11.2)	0.45
Body mass index (kg/m ²)	25.9 (4.3)	26.1 (4.4)	0.15
Waist circumference (cm)	89.1 (10.9)	89.5 (10.8)	0.87
Dyslipidemia (%)	37.8	24.4	0.13

Table 2 Comparison of disease parameters in ankylosing spondylitis patients with high and normal NT-proBNP levels at baseline

	NT-proBNP ≥100 pg/mL (n=5)	NT-proBNP <100 pg/mL (n=40)	p
BASDAI	6.7 (1.6)	4.9 (2.2)	0.08
ASDAS-CRP	4.7 (1.1)	3.4 (1.0)	0.01
ASDAS-ESR	4.4 (1.3)	2.8 (1.0)	0.002
CRP (mg/dL)	5.38 (1.67–8.21)	1.84 (0.75–3.99)	0.09
ESR (mm/h)	53 (23.5–71.5)	15 (8–28)	0.06
NT-proBNP (pg/mL)	125 (105–186)	33 (17–54)	<0.001

Data are presented as the means (SD) or medians (IQR)

NT-proBNP N-terminal pro-brain natriuretic peptide, *BASDAI* Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index, *ASDAS* Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score, *CRP* C-reactive protein, *ESR* erythrocyte sedimentation rate

($p<0.001$), age ($p=0.02$), and pulse pressure ($p=0.03$) remained independently associated with NT-proBNP levels.

Prospective evaluation demonstrated that NT-proBNP levels decreased significantly from BL to 6M (Table 1), characterizing a -31.4% (-57.4 to 14.3%) change in the median NT-proBNP levels. Overall, NT-proBNP decreased in 30 (67 %) patients; from these, 25 (56 %) patients had normal levels and five (11 %) patients had high levels before treatment. In the latter group, four patients achieved normal range values at 6M. Changes in NT-proBNP levels at 6M were significantly correlated with ESR changes ($r=0.41$, $p=0.006$) but not with changes in CRP, BASDAI and ASDAS-ESR, pulse pressure, or systolic blood pressure.

Discussion

To our knowledge, this is the first study to demonstrate a decrease in NT-proBNP levels in active AS patients after anti-TNF therapy and a positive longitudinal correlation between NT-proBNP and ESR changes in these patients.

Alteration in the levels of this biomarker is an excellent predictor for systolic heart failure in the general population and high-risk cardiovascular groups, and is independently related to mortality even in absence of cardiac dysfunction [6, 16]. Our finding that a small proportion of AS patients at baseline had high NT-proBNP levels without clinical symptoms points toward a possible unrecognized risk in this population. A reduction in this peptide induced by anti-TNF therapy was reported in RA patients suggesting a potential cardiovascular risk benefit of this drug [8].

Frequency of high levels of NT-proBNP was as expected low, mainly due to the mean age below 40 years old and absence of systolic dysfunction in this population; these

characteristics were, in fact, essential to discriminate the influence of inflammation per se. Likewise, maintenance of NSAID throughout the study was important to exclude a possible improvement in NT-proBNP levels related with a cardiovascular benefit due to NSAID withdraw. In the same way, the reduction in prednisone use observed in this study does not seem to be a relevant factor for NT-proBNP changes since a recent review showed that low dose of corticosteroids has no effect in cardiac dysfunction of RA patients [17].

Echocardiography longitudinal evaluation of all patients had the advantage to exclude systolic dysfunction, a known confounding parameter in NT-proBNP evaluation [10]. Moreover, in this population, frequencies of cardiovascular risk factors observed were similar to the reported previously in AS patients and they remained unchanged during follow-up [18]. The few newly diagnosed cases of subclinical ventricular diastolic dysfunction during follow-up were mild and not paralleled by an increase in NT-pro-BNP levels suggesting a limited clinical relevance. Long-term closer vigilance for cardiovascular endpoints is, however, recommended for these patients since the observation period of present study was limited.

The novel finding of significant association of increased levels of NT-proBNP in AS patients with higher disease activity scores suggests that inflammation may be an alternative pathway that induces NT-proBNP release, as also reported in RA patients [9]. Reinforcing this hypothesis, for the first time, we identified a parallel decrease in NT-proBNP levels and ESR in active AS patients under anti-TNF treatment.

In fact, there is some evidence that proinflammatory cytokines, such as TNF and interleukin-1 (IL-1), could stimulate the production of BNP in the absence of left ventricular function impairment [19]. Administration of TNF and IL-1 induced BNP secretion independent of hemodynamic influence in cultured neonatal rat cardiocytes. These cytokines stimulated a selective, highly significant upregulation of gene expression and promoter activity regarding BNP secretion [20]. Supporting this notion, inflammation was shown to be a noncardiac cause of increased NT-proBNP in non-rheumatic patients without heart failure [10]. The decrease in levels of this peptide in our study with unchanged cardiac function reinforces this statement; control of inflammatory status may be able to reduce NT-proBNP levels even in absence of an effective improvement in ventricular diastolic dysfunction.

The NT-proBNP cutoff of ≥ 100 pg/mL was used because these levels were demonstrated to be significantly related to mortality, morbidity, and cardiovascular events [21, 22]. Therefore, the prospective reduction of NT-proBNP observed herein may suggest a long-term potential cardiovascular benefit in active AS patients using TNF blocker.

A limitation of the present study was the small sample size which may have hampered the identification of a significant NT-proBNP association with other disease activity scores or CRP improvement. Reinforcing this possibility, a tendency of higher values of BASDAI, CRP, and ESR in patients with high NT-proBNP levels was also observed.

In conclusion, elevations of NT-proBNP levels should be interpreted with caution in active AS patients with no evidence of cardiovascular disease. The short-term reduction of NT-proBNP levels in these patients receiving anti-TNF therapy appears to reflect an improvement in inflammatory status. The clinical relevance of these findings needs to be confirmed in larger longitudinal studies with long-term follow-up.

Acknowledgments This study was supported by Agency for Promotion of Research, Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (grants 06/61303-7 to Centro de Dispensação de Medicação de Alto Custo and 2009/51897-5 to EB), National Counsel of Technological and Scientific Development (grants 302724/2011-7 to CAS and 305468/2006-5 to EB), and Federico Foundation (grants to CGSS, CAS, and EB). Authors wish to thank Dr. Vilma Trindade Viana, Elaine Pires Leon, Dr. Nairo Sumita, Dr. Alexandre Fortini, and Paschoalina Romano (Rheumatology Laboratory and Laboratory Division of Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP) for technical assistance.

Disclosures None.

References

1. Heeneman S, Daemen MJAP (2007) Cardiovascular risks in spondyloarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 19:358–362
2. Lautermann D, Braun J (2002) Ankylosing spondylitis—cardiac manifestations. *Clin Exp Rheumatol* 20:S11–S15
3. Bremander A, Petersson IF, Bergman S, Englund M (2011) Population-based estimates of common comorbidities and cardiovascular disease in ankylosing spondylitis. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 63:550–556
4. Libby P (2008) Role of inflammation in atherosclerosis associated with rheumatoid arthritis. *Am J Med* 121:S21–S31
5. Gonzalez-Gay MA, Gonzalez-Juanatey C, Martin J (2005) Rheumatoid arthritis: a disease associated with accelerated atherogenesis. *Semin Arthritis Rheum* 35:8–17
6. Wang TJ, Larson MG, Levy D et al (2004) Plasma natriuretic peptide levels and the risk of cardiovascular events and death. *N Eng J Med* 350:655–663
7. Provan S, Angel K, Semb AG et al (2010) NT-proBNP predicts mortality in patients with rheumatoid arthritis: results from 10-year follow-up of the EURIDISS study. *Ann Rheum Dis* 69:1946–1950
8. Peters MJL, Welsh P, McInnes IB et al (2010) Tumour necrosis factor α blockade reduces circulating N-terminal pro-brain natriuretic peptide levels in patients with active rheumatoid arthritis: results from a prospective cohort study. *Ann Rheum Dis* 69:1281–1285
9. Armstrong DJ, Gardiner PV, O’Kane MJ (2010) Rheumatoid arthritis patients with active disease and no history of cardiac pathology have higher brain natriuretic peptide (BNP) levels than patients with inactive disease or healthy control subjects. *Ulster Med J* 79:82–84
10. Jensen J, Ma LP, Fu MLX et al (2010) Inflammation increases NT-proBNP and the NT-proBNP/BNP ratio. *Clin Res Cardiol* 99:445–452
11. Meirovich YF, Veinot JP, de Bold MLK et al (2008) Relationship between natriuretic peptides and inflammation: proteomic evidence obtained during acute cellular cardiac allograft rejection in humans. *J Heart Lung Transplant* 27:31–37
12. Sieper J, Rudwaleit M, Baraliakos X et al (2009) The assessment of spondyloarthritis international society (ASAS) handbook: a guide to assess spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis* 68:ii1–ii44
13. Zochling J, van der Heijde D, Burgos-Vargas R et al (2006) ASAS/EULAR recommendations for the management of ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 65:442–452
14. Lippy RJ (2003) The National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines. *J Manag Care Pharm* 9:2–5
15. Nagueh SF, Appleton CP, Gillebert TC et al (2009) Recommendations for the evaluation of left ventricular diastolic function by echocardiography. *Eur J Echocardiogr* 10:165–193
16. Kragelund C, Grønning B, Køber L, Hildebrandt P, Steffensen R (2005) N-terminal pro-B-type natriuretic peptide and long-term mortality in stable coronary heart disease. *N Eng J Med* 352:666–675
17. Ruyssen-Witrand A, Fautrel B, Saraux A, Le Loët X, Pham T (2011) Cardiovascular risk induced by low-dose corticosteroids in rheumatoid arthritis: a systematic literature review. *Joint Bone Spine* 78(1):23–30
18. Han C, Robinson DW, Hackett MV et al (2006) Cardiovascular disease and risk factors in patients with rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, and ankylosing spondylitis. *J Rheumatol* 33:2167–2172
19. Ma KK, Ogawa T, Bold AJD (2004) Selective upregulation of cardiac brain natriuretic peptide at the transcriptional and translational levels by pro-inflammatory cytokines and by conditioned medium derived from mixed lymphocyte reactions via p38 MAP kinase. *J Mol Cell Cardiol* 36:505–513
20. de Bold AJ (2009) Cardiac natriuretic peptides gene expression and secretion in inflammation. *J Investig Med* 57:29–32
21. Tsushida K, Tanabe K (2008) Plasma brain natriuretic peptide concentrations and the risk of cardiovascular events and death in general practice. *J Cardiol* 52:212–223
22. Brune K, Katus HA, Moecks J, Spanuth E, Jaffe AS, Giannitsis E (2008) N-terminal pro-B-type natriuretic peptide concentrations predict the risk of cardiovascular adverse events from anti-inflammatory drugs: a pilot study. *Clin Chem* 54:1149–1157