

Citocinas no líquido pleural após transplante pulmonar como marcadores de rejeição aguda*

Cytokine levels in pleural fluid as markers of acute rejection after lung transplantation

Priscila Cilene León Bueno de Camargo, José Eduardo Afonso Jr, Marcos Naoyuki Samano, Milena Marques Pagliarelli Acencio, Leila Antonangelo, Ricardo Henrique de Oliveira Braga Teixeira

Resumo

Nosso objetivo foi determinar os níveis de desidrogenase láctica, IL-6, IL-8 e VEGF, assim como a contagem total e diferencial de células no líquido pleural de transplantados de pulmão, correlacionando esses níveis com a ocorrência e a gravidade de rejeição após o procedimento. Foram analisadas amostras de líquido pleural coletadas de 18 pacientes em diferentes momentos (até o quarto dia pós-operatório). Os níveis de IL-6, IL-8 e VEGF apresentaram uma tendência de aumento paralelamente à gravidade de rejeição. Nossos resultados sugerem que esses níveis são indicadores de rejeição aguda do enxerto em transplantados de pulmão.

Descritores: Transplante de pulmão; Derrame pleural; Citocinas; Rejeição de enxerto.

Abstract

Our objective was to determine the levels of lactate dehydrogenase, IL-6, IL-8, and VEGF, as well as the total and differential cell counts, in the pleural fluid of lung transplant recipients, correlating those levels with the occurrence and severity of rejection. We analyzed pleural fluid samples collected from 18 patients at various time points (up to postoperative day 4). The levels of IL-6, IL-8, and VEGF tended to elevate in parallel with increases in the severity of rejection. Our results suggest that these levels are markers of acute graft rejection in lung transplant recipients.

Keywords: Lung transplantation; Pleural effusion; Cytokines; Graft rejection.

O transplante pulmonar (TP) é uma escolha terapêutica para pacientes com pneumopatias avançadas. Apesar do avanço no tratamento dos transplantados pulmonares, a rejeição aguda do enxerto ainda permanece comum, afetando até 55% desses pacientes no primeiro ano pós-operatório. A rejeição é o principal fator de risco para o desenvolvimento da síndrome de bronquiolite obliterante e parece estar relacionada com o desenvolvimento de resposta humoral com ativação de complemento e produção de anticorpos HLA contra o doador.⁽¹⁾ A biópsia transbrônquica (BTB) é o principal método para o diagnóstico de rejeição celular aguda. Vários estudos têm mostrado a correlação entre níveis séricos elevados de citocinas e complicações

no pós-operatório, além da associação desses níveis com edema de reperfusão, rejeição aguda e síndrome de bronquiolite obliterante.⁽²⁾ O objetivo do presente estudo foi correlacionar os níveis de desidrogenase láctica (DHL) e de citocinas pró-inflamatórias, assim como a contagem diferencial de células, no líquido pleural com a rejeição celular aguda em pacientes submetidos a TP. Nossa hipótese era de que níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias no líquido pleural seriam indicadores precoces de rejeição do enxerto no TP.

Entre agosto de 2006 e março de 2008, 20 pacientes submetidos a TP foram avaliados no estudo, sendo 18 incluídos. Dois pacientes foram excluídos da análise porque morreram

*Trabalho realizado na Divisão de Pneumologia, Instituto do Coração, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo (SP) Brasil.

Endereço para correspondência: Priscila Cilene León Bueno de Camargo. Avenida Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 44, 2º andar, Bloco 2, Sala 9, Cerqueira César, CEP 05403-900, São Paulo, SP, Brasil.

Tel. 55 11 2661-5248. E-mail: pclbcmargo@gmail.com

Apoio financeiro: Nenhum.

Recebido para publicação em 8/5/2014. Aprovado, após revisão, em 13/6/2014.

nas primeiras seis semanas. Os valores globais de DHL e de citocinas e a contagem de células no líquido pleural, sem qualquer referência à rejeição, foram relatados em um artigo anterior.⁽³⁾

Amostras de sangue e de líquido pleural foram recolhidas para avaliação 6 h após a cirurgia e diariamente até o 4º dia pós-operatório. Realizamos BTB na segunda e sexta semanas após o TP para a avaliação de rejeição, utilizando um critério de classificação (A0 = sem rejeição; A1 = rejeição mínima; A2 = rejeição leve; A3 = rejeição moderada; e A4 = rejeição grave) de acordo com a intensidade de infiltrado mononuclear perivascular no parênquima pulmonar. Para a análise final, o paciente foi classificado de acordo com o grau mais grave de rejeição nas duas biópsias.

Não foi realizada uma análise cega das biópsias, as quais seguiram a rotina assistencial do serviço por um patologista treinado, sendo analisadas pelo menos 5 amostras de tecido para garantir a representatividade do parênquima pulmonar.

Dos 18 pacientes do estudo, 3, 4, 8 e 3, respectivamente, foram classificados nas categorias A0, A1, A2 e A3.

Os níveis séricos de IL-6 e IL-8 foram indetectáveis em todas as amostras. Os níveis séricos de VEGF foram muito menores do que os níveis de VEGF no líquido pleural e não diferiram significativamente nos pacientes com diferentes graus de rejeição.

No presente estudo, os níveis séricos indetectáveis de citocinas sugerem que a resposta inflamatória no TP pode estar confinada primariamente no pulmão e na cavidade pleural. Resultados semelhantes foram relatados em outros estudos,^(2,4,5) observando-se que a elevação aguda dessas citocinas foi mais evidente nos pacientes que tiveram edema de reperfusão ou rejeição aguda.

A correlação entre os níveis de DHL e a contagem diferencial de células no líquido pleural está descrita na Tabela 1, apresentando valores maiores nos grupos de pacientes com rejeição.

Tabela 1 – Relação dos níveis de desidrogenase láctica e das contagens totais e diferenciais de células em amostras de líquido pleural coletadas em diferentes momentos com o grau de rejeição aguda.^a

Variáveis	Grau de rejeição aguda			
	A0	A1	A2	A3
DHL, mg/dL				
6 h	1.855 ± 594	3.176 ± 530**	2.310 ± 964	4.134 ± 1.487*
24 h	1.250 ± 1.028	1.605 ± 1.285	1.779 ± 1.233	2.214 ± 958
48 h	1.181 ± 293	1.455 ± 642	966 ± 503	1.638 ± 1.201
72 h	375 ± 46	655 ± 462	576 ± 159	711 ± 203***
96 h	316 ± 33	586 ± 434	498 ± 214	621 ± 233
Células totais, cels/mL				
6 h	1.679 ± 1.612	3.812 ± 2.387	4.606 ± 3.156	10.710 ± 6.394***
24 h	595 ± 786	2.764 ± 1.250****	2.359 ± 645****	4.723 ± 2.514****,*****
48 h	645 ± 116	897 ± 626	649 ± 421	2.457 ± 2.180
72 h	246 ± 323	316 ± 168	542 ± 456	599 ± 680
96 h	167 ± 223	418 ± 288	435 ± 399	482 ± 120***
Neutrófilos				
6 h	1.573 ± 1.485	3.580 ± 2.281	4.368 ± 3.074	9.884 ± 5.245*****
24 h	537 ± 707	2.471 ± 942****	1.314 ± 1.255****	4.478 ± 2.553****
48 h	588 ± 147	812 ± 642	590 ± 450	2.266 ± 2.255
72 h	210 ± 274	266 ± 155	475 ± 431	374 ± 393
96 h	144 ± 192	258 ± 252	367 ± 339	235 ± 195
Linfócitos				
6 h	90 ± 112	161 ± 56	156 ± 126	1.078 ± 1.455
24 h	52 ± 72	136 ± 140	71 ± 28	191 ± 74***
48 h	45 ± 32	65 ± 62	48 ± 50	145 ± 90***
72 h	36 ± 50	45 ± 24	36 ± 4	133 ± 166
96 h	23 ± 32	78 ± 61	41 ± 43	59 ± 62

A0: sem rejeição; A1: rejeição mínima; A2: rejeição leve; A3: rejeição moderada; e DHL: desidrogenase láctica. ^aValores expressos em média ± dp. *p < 0.05 (A3 > A0 e A2). **p < 0.05 (A1 > A0). ***p < 0.05 (A3 > A0). ****p < 0.05 (A3, A2 e A1 > A0). *****p < 0.05 (A3 > A1 e A2). *****p < 0.05 (A3 > A0, A1 e A2).

Encontramos níveis elevados de IL-6 e IL-8 no líquido pleural amostrado 6 h após o TP, com subsequente redução até o 4º dia pós-operatório. Tal variação não ocorreu com os níveis de VEGF. Pacientes com níveis mais elevados de rejeição tenderam a ter níveis mais elevados dessas citocinas (Tabela 2). Pacientes classificados como A3 tinham níveis mais elevados de IL-6 e IL-8 em todos os momentos quando comparados com aqueles com graus mais baixos de rejeição. Os níveis de VEGF foram maiores para os pacientes dos grupos A3, A2 e A1 quando comparados com aqueles do grupo A0 na amostra retirada após 6 h do TP.

Devido ao trauma cirúrgico e a presença de um dreno, há inflamação do espaço pleural, o que poderia explicar os níveis elevados de citocinas. Em nosso estudo, é interessante notar que, apesar da redução progressiva dos marcadores inflamatórios com o tempo, os níveis de citocinas pró-inflamatórias permaneceram elevados durante os quatro primeiros dias, e a irritação causada pelo dreno deixado no local por até 96 h é uma possível explicação para esse fato, o qual, no entanto, não explica as diferenças observadas nos subgrupos. Especulamos que os níveis de citocinas presentes nos pacientes considerados A0 representam o aumento de citocinas resultante

do trauma cirúrgico e do uso de drenos. Esse nível de inflamação diminui com o tempo, como foi evidenciado pela redução nos níveis de IL-6 e IL-8 no líquido pleural. Os níveis de citocinas nos pacientes do subgrupo A3 foram muito mais elevados do que nos outros subgrupos de rejeição, o que pode ser um indicador precoce de rejeição.

Foram encontradas correlações positivas entre os níveis de IL-6 com os níveis de DHL no líquido pleural ($r = 0,49$; $p = 0,030$) e com a contagem de neutrófilos ($r = 0,90$; $p = 0,036$), enquanto os níveis de VEGF correlacionaram-se fortemente com a contagem de neutrófilos ($r = 0,91$; $p = 0,030$) e de leucócitos totais ($r = 0,88$; $p = 0,048$). Por outro lado, foi encontrada uma forte correlação negativa entre os níveis de IL-8 no líquido pleural e a contagem de linfócitos ($r = -0,97$; $p = 0,007$). Além disso, uma forte correlação positiva foi encontrada entre os níveis de IL-6 no líquido pleural com aqueles de IL-8 ($r = 0,70$; $p < 0,001$) e de VEGF ($r = 0,71$; $p < 0,001$), assim como houve uma ligeira correlação entre os níveis de IL-8 e de VEGF ($r = 0,49$; $p = 0,027$). No presente estudo, não houve correlação entre o grau de rejeição aguda e o grau de disfunção do enxerto primário nas primeiras 72 h após o TP.

Tabela 2 – Relação dos níveis de IL-6, IL-8 e VEGF em amostras de líquido pleural coletadas em diferentes momentos com o grau de rejeição aguda.^a

Variáveis	Grau de rejeição aguda			
	A0	A1	A2	A3
IL-6, pg/mL				
6 h	14.717 (10.719-18.816)	27.368 (20.445-41.316)	38.521 (29.543-45.367)	49.854 (42.854-53.415)*
24 h	6.384 (2.304-10.464)	13.410 (10.973-17.608)	12.060 (8.886-17.824)	21.337 (17.779-48.322)**
48 h	7.642 (2.707-12.576)	11.402 (9.370-13.303)	12.211 (9.075-13.477)	15.010 (12.717-46.503)**
72 h	5.010 (2.227-7.793)	7.731 (5.301-9.687)	4.891 (3.748-6.303)	8.506 (4.871-8.605)
96 h	2.879 (2.196-3.562)	7.372 (6.292-8.461)***	4.838 (3.963-8.047)***	6.151 (4.593-7.709)***
IL-8, pg/mL				
6 h	1.318 (1.020-1.617)	1.706 (1.018-1.956)	1.696 (1.286-1.941)	2.216 (2.110-2.323)****
24 h	1.266 (996-1.536)	1.177 (767-1.608)	1.224 (799-1.706)	2.187 (2.119-2.254)****
48 h	1.091 (760-1.423)	1.455 (765-1.523)	1.037 (788-1.169)	2.036 (1.922-2.150)****
72 h	965 (579-1.351)	1.472 (377-1.633)	945 (682-1.163)	1.935 (1.775-2.096)****
96 h	981 (482-1.481)	464 (244-1.127)	690 (288-1.005)	1.859 (1.775-1.943)****
VEGF, pg/mL				
6 h	72 (34-110)	343 (290-508)***	297 (145-504)***	566 (153-879)***
24 h	123 (18-228)	188 (115-284)	279 (77-445)	382 (107-745)
48 h	121 (20-221)	123 (95-172)	283 (84-435)	123 (54-406)
72 h	142 (17-267)	143 (112-214)	294 (116-382)	123 (39-406)
96 h	144 (8-280)	134 (115-336)	280 (191-425)	280 (81-445)

A0: sem rejeição; A1: rejeição mínima; A2: rejeição leve; e A3: rejeição moderada. ^aValores expressos em mediana (intervalo interquartilico). * $p < 0.05$ (A3 > A0 e A1). ** $p < 0.05$ (A3 > A0). *** $p < 0.05$ (A3, A2 e A1 > A0). **** $p < 0.05$ (A3 > A2, A1 e A0).

Nos pacientes submetidos a TP, a inflamação do parênquima pulmonar conduz a um aumento do edema intersticial, com níveis elevados de citocinas. Uma vez que os vasos linfáticos são cortados, mais fluido intersticial sai dos pulmões, atravessando a pleura visceral, podendo levar a níveis elevados de citocinas, que foram observados nos pacientes com rejeição.

Uma limitação do estudo foi o pequeno número de pacientes em cada subgrupo. No entanto, é evidente que os níveis de citocinas inflamatórias foram mais elevados nos pacientes com grau de rejeição A3 em comparação com aqueles de outros subgrupos. Destacamos também que o pequeno tamanho da amostra pode ser responsável pela falta de significância estatística observada nos níveis de citocinas entre os pacientes dos subgrupos A1 e A2. Além disso, os resultados podem ter sido influenciados pelo fato de que a coleta do líquido pleural e a BTB ocorreram em momentos distintos. Esses dados são antigos, e um estudo maior baseado neles está em andamento.

Demonstramos que níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias no líquido pleural de pacientes submetidos a TP podem ser marcadores de rejeição aguda do enxerto, em particular, de grau moderado a severo. Nesse contexto, é possível que a determinação de citocinas no líquido pleural seja útil na identificação de pacientes que irão desenvolver rejeição. Dessa forma, o tratamento

poderia ser iniciado mais cedo, levando a redução da lesão no parênquima pulmonar.

Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer a colaboração do Dr. Richard W. Light na elaboração do presente estudo. Este trabalho foi apresentado na forma de resumo no Congresso Anual da *European Respiratory Society* na cidade de Barcelona, Espanha, em 2010.

Referências

1. Martinu T, Howell DN, Palmer SM. Acute cellular rejection and humoral sensitization in lung transplant recipients. *Semin Respir Crit Care Med*. 2010;31(2):179-88. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0030-1249113>
2. Hoffman SA, Wang L, Shah CV, Ahya VN, Pochettino A, Olthoff K, et al. Plasma cytokines and chemokines in primary graft dysfunction post-lung transplantation. *Am J Transplant*. 2009;9(2):389-96. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-6143.2008.02497.x>
3. Teixeira RH, Antonangelo L, Vargas FS, Caramori ML, Afonso JE Jr, Acencio MM, et al. Cytokine profile in pleural fluid and serum after lung transplantation. *Transplant Proc*. 2010;42(2):531-4. <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2010.01.033>
4. Mathur A, Baz M, Staples ED, Bonnell M, Speckman JM, Hess PJ, et al. Cytokine profile after lung transplantation: correlation with allograft injury. *Ann Thorac Surg*. 2006;81(5):1844-9; discussion 1849-50.
5. Mal H, Dehoux M, Sleiman C, Boczkowski J, Lesèche G, Pariente R, et al. Early release of proinflammatory cytokines after lung transplantation. *Chest*. 1998;113(3):645-51. <http://dx.doi.org/10.1378/chest.113.3.645>

Sobre os autores

Priscila Cilene León Bueno de Camargo

Médica Pneumologista. Divisão de Pneumologia, Instituto do Coração, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo (SP) Brasil.

José Eduardo Afonso Jr

Médico Assistente. Divisão de Pneumologia, Instituto do Coração, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo (SP) Brasil.

Marcos Naoyuki Samano

Médico Assistente. Divisão de Cirurgia Torácica, Instituto do Coração, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo (SP) Brasil.

Milena Marques Pagliarelli Acencio

Biologista Chefe. Laboratório de Pleura, Instituto do Coração, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo (SP) Brasil.

Leila Antonangelo

Médica Chefe. Serviço de Citologia, Divisão de Laboratório Central, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo (SP) Brasil.

Ricardo Henrique de Oliveira Braga Teixeira

Médico Coordenador Clínico. Grupo de Transplante de Pulmão, Instituto do Coração, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo (SP) Brasil.