



REVISTA BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA

www.reumatologia.com.br



Artigo original

Níveis séricos de proteína de células de Clara de 16 kDa e comprometimento pulmonar em pacientes com esclerose sistêmica



Anna Olewicz-Gawlik^{a,*}, Dorota Trzybulska^a, Barbara Kuznar-Kaminska^b,
Katarzyna Katulska^c, Aleksandra Danczak-Pazdrowska^d,
Halina Batura-Gabryel^b e Pawel Hrycaj^a

^a Departamento de Reumatologia e Imunologia Clínica, Poznan University of Medical Sciences, Poznan, Polônia

^b Departamento de Pneumologia, Alergologia e Pneumologia Oncológica, Poznan University of Medical Sciences, Poznan, Polônia

^c Departamento de Radiologia Geral e Neurorradiologia, Poznan University of Medical Sciences, Poznan, Polônia

^d Departamento de Dermatologia, Poznan University of Medical Sciences, Poznan, Polônia

INFORMAÇÕES SOBRE O ARTIGO

Histórico do artigo:

Recebido em 22 de abril de 2014

Aceito em 30 de abril de 2015

On-line em 17 de julho de 2015

Palavras-chave:

CC16

Doença intersticial pulmonar

Esclerose sistêmica

R E S U M O

Objetivo: Avaliar a utilidade clínica das medições séricas da proteína de células de Clara de 16-kDa (CC16) em relação ao sistema de estadiamento para doença pulmonar intersticial associada a esclerose sistêmica (DPI-ES).

Materiais e métodos: Foram determinados os níveis séricos de CC16 por ELISA em 28 pacientes com ES e 30 controles saudáveis e correlacionados com o sistema de estadiamento para DPI-ES em pacientes com ES. O envolvimento pulmonar foi avaliado funcionalmente (pletismografia corporal, capacidade de difusão de monóxido de carbono) e radiologicamente (extensão média da doença na tomografia computadorizada de alta resolução dos pulmões, TCAR) em pacientes com ES.

Resultados: Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas nos níveis séricos de CC16 entre pacientes com ES e controles saudáveis apenas em não tabagistas. No entanto, as concentrações séricas de CC16 eram significativamente elevadas em pacientes com extensão >20% na TCAR em comparação com pacientes com extensão < 20% na TCAR ($p=0,01$). Os níveis séricos de CC16 se correlacionaram positivamente com a extensão média da doença na TCAR ($p=0,04$) e com a extensão de padrão reticular na TCAR ($p < 0,01$) e negativamente com a capacidade pulmonar total (CPT) ($p=0,03$) e com os resultados do teste de caminhada de seis minutos ($p < 0,01$).

Conclusões: Os níveis de CC16 podem ser considerados como biomarcadores séricos suplementares para a DPI-ES.

© 2015 Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob a licença de CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

* Autor para correspondência.

E-mail: anolegaw@wp.pl (A. Olewicz-Gawlik).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.rbr.2015.04.001>

0482-5004/© 2015 Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob a licença de CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Serum Clara cell 16-kDa protein levels and lung impairment in systemic sclerosis patients

A B S T R A C T

Keywords:

CC16
Interstitial lung disease
Systemic sclerosis

Objective: To assess clinical utility of serum Clara cell 16-kDa protein (CC16) measurements in relation with staging system for systemic sclerosis associated interstitial lung disease (SSc-ILD).

Materials and methods: Serum levels of CC16 were determined by ELISA in 28 SSc patients and 30 healthy controls, and correlated with staging system for SSc-ILD in SSc patients. Lung involvement was assessed functionally (body plethysmography, diffusing capacity of the lung for carbon monoxide) and radiologically (an average disease extent on high resolution computed tomography of the lungs, HRCT) in SSc patients.

Results: We observed statistically significant differences in serum CC16 levels between SSc patients and healthy controls only in non-smokers. However, serum CC16 concentrations were significantly elevated in patients with HRCT extent >20% in comparison to patients with HRCT extent <20% ($p=0.01$). They correlated positively with average disease extent on HRCT ($p=0.04$), an extent of a reticular pattern on HRCT ($p<0.01$), and negatively with a total lung capacity (TLC) ($p=0.03$) and the results of the 6-min walk test ($p<0.01$).

Conclusions: CC16 levels can be considered as a supplemental serum biomarker for SSc-ILD.

© 2015 Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introdução

A esclerose sistêmica (ES) é uma doença autoimune crônica do tecido conjuntivo caracterizada por vasculopatia, inflamação e fibrose progressiva da pele e órgãos internos. As principais causas de morbidade e mortalidade em pacientes com ES são duas síndromes pulmonares relacionadas com a ES: hipertensão arterial pulmonar (HAP-ES) e doença pulmonar intersticial (DPI-ES).¹ Para avaliar a DPI-ES, são feitas tomografias computadorizadas de alta resolução (TCAR) e testes de função pulmonar. Além disso, foram descritos alguns marcadores sorológicos da DPI-ES específicos do pulmão.²⁻⁴ Esse grupo inclui a proteína de células de Clara de 16 kDa (CC16). Essa é uma das principais proteínas secretadas pelas células de Clara e há cada vez mais evidências de seu papel protetor contra a resposta inflamatória pulmonar.⁵

A CC16 é uma proteína homodimérica de 15,8 kDa codificada por um gene localizado no cromossomo 11.⁶ Tem potentes propriedades imunossupressoras e anti-inflamatórias naturais. A CC16 mostrou modular a resposta inflamatória, incluindo a inibição da atividade da fosfolipase A2 citosólica e interferon- γ *in vitro*.⁷ Foram observadas alterações nas concentrações séricas de CC16 em pacientes com diferentes doenças que afetam os pulmões, incluindo uma diminuição nos níveis de CC16 na asma brônquica e um aumento na sarcoidose e na fibrose pulmonar idiopática.^{8,9} A proteína também foi observada após a exposição a irritantes pulmonares.¹⁰ Além disso, descobriu-se que o nível sérico de CC16 é um indicador de fibrose pulmonar ativa em pacientes com ES.¹¹ Em relação a esse achado, no presente estudo foram avaliados os níveis séricos de CC16 e foi examinada a associação com a avaliação de DPI-ES em pacientes com ES.

Materiais e métodos

Foram recrutados para o estudo 28 pacientes consecutivos com ES (25 mulheres e três homens entre 24 e 70 anos), de acordo com os critérios de classificação do American College of Rheumatology.¹² Todos os pacientes foram também analisados com os critérios de classificação para ES de 2013.¹³ Os pacientes foram ainda classificados em dois subgrupos, de acordo com o acometimento cutâneo; com base na extensão do seu envolvimento de pele, podiam ter a forma cutânea difusa (EScd) ou cutânea limitada (EScl) da doença.¹⁴ Os controles saudáveis ($n=30$) eram voluntários não tabagistas e foram estatisticamente pareados por sexo e idade (18-29, 30-44, 45-54 e 55-70 anos). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade de Ciências Médicas de Poznan e foi obtido um consentimento informado de todos os participantes. O protocolo de pesquisa está de acordo com os princípios da Declaração de Helsinque da World Medical Association.

A avaliação clínica compreendeu o histórico de saúde completo e exames físicos, que incluíram a avaliação da úlcera e a avaliação do envolvimento da pele com o Escore de Rodnan Modificado.¹⁵ Foi calculado o escore de atividade da esclerose sistêmica (Systemic Sclerosis Activity Score) da European League Against Rheumatism (EULAR) Scleroderma Trials and Research (EUSTAR) de todos os pacientes com ES. A duração da doença foi medida a partir do início do primeiro sintoma, com exceção do fenômeno de Raynaud, consistente com ES. O envolvimento pulmonar foi avaliado funcionalmente (pletismografia corporal, capacidade de difusão do monóxido de carbono [CDCO] e teste de caminhada de seis minutos) e radiologicamente (tomografia computadorizada de alta resolução do pulmões, TCAR), conforme proposto por Goh et al.¹⁶ Além disso, as imagens tomográficas também foram

avaliadas à procura dos seguintes achados: extensão média da doença, extensão do padrão reticular, extensão do padrão de vidro fosco e presença de faveolamento. Todos os exames de TCAR foram avaliados por um radiologista especialista em TCAR e DPI. Para descrever os pacientes com ES como “sem comprometimento da função pulmonar”, definiu-se que três parâmetros funcionais – capacidade pulmonar total (CPT), capacidade vital (CV) e CDCO – deveriam estar acima de 80% previsto. Foram coletadas amostras de sangue dos pacientes no momento do exame clínico, em jejum. O soro obtido foi armazenado a -70°C antes da feitura dos testes. A atividade inflamatória foi determinada pela velocidade de hemossedimentação (VHS, Westergren), concentração de proteína C-reativa de alta sensibilidade (PCR, ensaio de imunoadsorção enzimática [ELISA], Biocheck, EUA) e níveis dos componentes do complemento C3 e C4 (imunoeletroforese radial). Os títulos de anticorpos antinucleares (ANA) foram avaliados por uma reação de imunofluorescência indireta com dois biochips por campo contendo células HEP-20-10 e tecido de fígado de macaco (Euroimmun, Alemanha). Os anticorpos para antígenos nucleares extraíveis (ENA) foram determinados com o teste tipo blot ANA Profile 3 (Euroimmun, Alemanha). As concentrações séricas de CC16 foram medidas com kits ELISA comercialmente disponíveis (BioVendor, República Checa), de acordo com o protocolo do fabricante.

Os dados demográficos dos pacientes foram analisados por meio de estatística descritiva e a distribuição normal dos dados foi aferida com o teste de Kolmogorov-Smirnov. Os resultados são apresentados ao longo do artigo como a média \pm desvio padrão (DP) para dados de distribuição normal ou como a mediana (intervalo interquartil, IQR) para dados sem distribuição normal. As associações entre os diferentes valores foram examinadas com a análise da correlação de postos de Spearman. As diferenças entre os grupos foram calculadas com o teste U de Mann-Whitney. Um valor de p inferior a 0,05 foi considerado estatisticamente significativo. Todas as análises estatísticas foram feitas com o software Statistica (StatSoft, Inc., 2011), versão 10, www.statsoft.com.

Resultados

Dentre os 28 pacientes com ES, 11 tinham ES_{cd} (nove mulheres e dois homens) e 17 tinham ES_{cl} (16 mulheres e um homem). Dez pacientes (35,7%) tinham um Escore de Rodnan Modificado de mais de 14 e sete (25%) tinham doença ativa, de acordo com o escore de atividade da EUSTAR. Um paciente (3,6%) tinha HAP-ES e nenhum tinha função renal prejudicada. Em 27 pacientes (96,4%) os testes de função pulmonar apresentaram diminuição na CDCO, a CV estava diminuída em quatro (14,3%) e a CPT em um (3,6%). Não houve caso de asma brônquica ou sarcoidose concomitante no grupo pesquisado. A comparação entre a ES_{cd} e a ES_{cl} não revelou diferenças estatisticamente significativas nos testes de função pulmonar em relação à porcentagem predita da CPT, CV e CDCO. Alterações significativas na TCAR (extensão da DPI > 5%) em 53,6% dos pacientes e extensão da DPI > 20% estavam presentes em 32,1% dos pacientes com ES. Não foram encontrados pacientes com a extensão indeterminada da doença na TCAR.

Tabela 1 – Características clínicas, laboratoriais e radiológicas dos pacientes com esclerose sistêmica

Duração da doença (meses)	51,5 \pm 12,1
Escore de Rodnan modificado	13 (17)
Anticorpos antinucleares	25 (89,3)
Anticorpos antitopoisomerase	10 (35,7)
Anticorpos anticentrômero	15 (53,6)
Velocidade de hemossedimentação (mm/h)	25 (22)
Proteína C-reativa (mg/L)	0 (5,4)
Componente do complemento C3 (g/L)	1162 (236)
Componente do complemento C4 (g/L)	191 (66)
Escore de atividade da esclerose sistêmica EUSTAR	2 (3)
TCAR	15 (25)
Extensão da doença, %	10 (15)
Extensão do padrão reticular, %	5 (10)
Extensão do padrão de vidro fosco, %	9 (32,1)
Presença de faveolamento	58,4 (16,5)
Capacidade pulmonar total (%p)	108,2 (21)
Capacidade vital (%p)	98,3 (19,7)
Teste de caminhada de 6 minutos, distância (m)	375 (90)
Tratamento com ciclofosfamida	9 (32,1)
Tratamento com metotrexato	5 (17,9)
Tratamento com azatioprina	2 (7,1)
Tabagista atual	6 (21,4)

TCAR, tomografia computadorizada de alta resolução. Dados apresentados como a mediana (intervalo interquartil), média \pm desvio padrão ou como n (%).

Outras características do grupo de pacientes no momento da análise são mostradas na [tabela 1](#).

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos níveis séricos de CC16 entre pacientes com ES (mediana de 9,9 (7,3) ng/mL) e controles saudáveis (mediana de 8,4 (3,7) ng/mL) ([fig. 1](#)) ou entre os subgrupos ES_{cd} e ES_{cl}. No entanto, a exclusão dos tabagistas dessa análise revelou concentrações séricas significativamente elevadas de CC16 nos pacientes com ES não tabagistas em comparação com os controles [mediana de 10,2 (5,8) vs. 8,4 (3,7) ng/mL, $p=0,03$] ([fig. 2](#)). Em todo o grupo com ES investigado, as concentrações de CC16 também estiveram associadas à idade dos pacientes

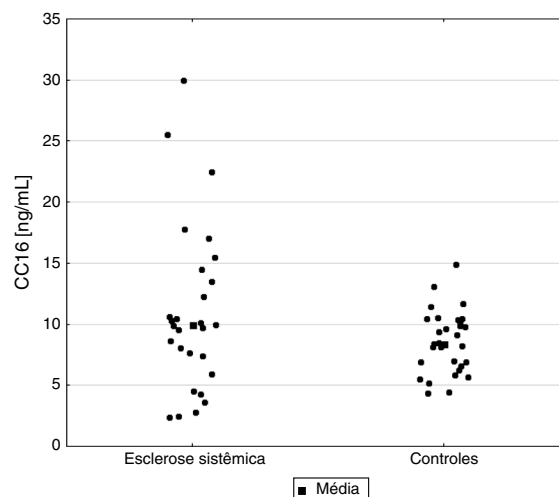


Figura 1 – Concentrações séricas de CC16 (ng/mL) nos controles saudáveis (n = 30) e em pacientes com esclerose sistêmica (n = 28).

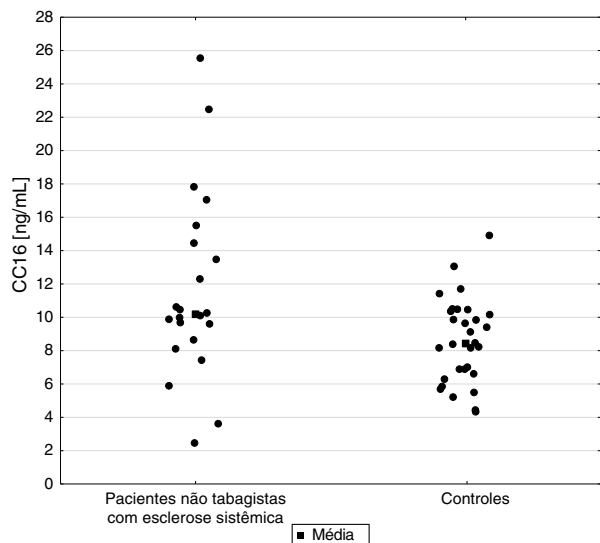


Figura 2 – Concentrações séricas de CC16 (ng/mL) em pacientes não tabagistas com esclerose sistêmica (n = 22) e controles saudáveis (n = 30).

($r=0,41$, $p=0,03$) e foram significativamente menores em tabagistas ($p=0,03$). Os níveis séricos de CC16 eram significativamente elevados em pacientes com extensão >20% na TCAR em comparação com pacientes com extensão < 20% na TCAR ($p=0,01$) (fig. 3). Além disso, os níveis de CC16 se correlacionaram significativamente com a extensão na TCAR quando apresentadas como uma variável contínua ($r=0,44$, $p=0,04$) e com a extensão do padrão reticular ($r=0,61$, $p<0,01$). Em relação aos testes de função pulmonar, as concentrações de CC16 estiveram negativamente associadas com a GPT ($r=-0,41$, $p=0,03$) e com o resultado do teste de caminhada de seis minutos ($r=-0,55$, $p<0,01$). Não foram detectadas outras associações estatisticamente significativas entre os níveis

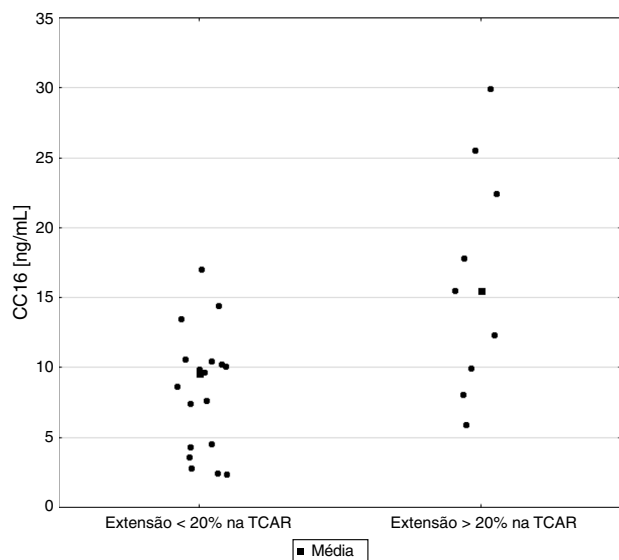


Figura 3 – Concentrações séricas de CC16 (ng/mL) em pacientes com esclerose sistêmica com extensão < 20% e extensão > 20% na TCAR.

séricos de CC16 e resultados clínicos ou laboratoriais, como mostrado na tabela 1.

Discussão

O presente estudo centra-se nos níveis séricos de CC16 em pacientes com ES em relação ao sistema de estadiamento da DPI-ES.

Foi encontrada diferença estatisticamente significativa somente nos níveis séricos de CC16 entre pacientes com ES não tabagistas e controles saudáveis, mas não quando pacientes tabagistas e não tabagistas com ES foram analisados em conjunto como um grupo único. Isso é consistente com os resultados de um estudo anterior em que os pacientes com ES tinham níveis séricos de CC16 mais elevados, mas não estatisticamente significativos, em comparação com os níveis de controles saudáveis.¹¹ No entanto, não se pode excluir uma polarização causada pelo pequeno tamanho da amostra de tabagistas e pela amostra total relativamente pequena de indivíduos incluídos no estudo.

Além disso, não foi encontrada relação entre os níveis de CC16 e a CV, como foi relatado por outros trabalhos.¹¹ A explicação mais provável para as discrepâncias está na diferença de tratamento (sem tratamento vs. 57,1% dos pacientes tratados com fármacos imunossupressores no presente estudo). Esses resultados divergentes também podem ter sido influenciados pelo pequeno tamanho da amostra deste estudo. No entanto, descobriu-se que os níveis de CC16 eram significativamente elevados em pacientes com ES com média de extensão da doença >20% na TCAR em relação aos pacientes com média de extensão da doença <20% e que os níveis séricos de CC16 se correlacionaram significativamente com a média de extensão da doença na TCAR quando analisados como variável contínua. Essas observações estão de acordo com o achado de que os níveis séricos de CC16 em pacientes com ES com fibrose pulmonar foram notavelmente maiores na doença pulmonar ativa vs. inativa. No estudo de Hasegawa et al., o diagnóstico de fibrose pulmonar ativa baseou-se na presença de aspecto de vidro fosco ou padrão reticular na TCAR do tórax e mudança >10% na CV ou mudança >15% na CDCO dentro de um ano. Como nosso estudo baseou-se na abordagem de caso-controle, não poderíamos analisar a atividade da DPI-ES com base nos mesmos critérios, mas os resultados deste estudo também indicaram o CC16 como um marcador da DPI-ES, já que foi mostrada uma associação dos níveis séricos de CC16 com a extensão do padrão reticular na TCAR. Esse achado é de particular importância clínica, já que no estudo de Goh et al.¹⁶ a mortalidade em pacientes com ES estava fortemente ligada não só à extensão da doença na TCAR, mas também à extensão do padrão reticular. Portanto, o nível sérico elevado de CC16 pode ser um candidato a um marcador de prognóstico nos pacientes com ES, especialmente em não tabagistas.

Além disso, neste estudo observou-se uma diminuição nas concentrações séricas de CC16 em pacientes tabagistas. Isso concorda com os resultados de estudos anteriores, que mostraram uma redução de aproximadamente 30% nos níveis de CC16 em tabagistas.¹⁷

Em suma, os resultados deste estudo indicam que concentrações elevadas de CC16 refletem o grau de lesão pulmonar no decorrer da ES, conforme destacado pelo sistema de estadiamento de Goh et al.¹⁶ Além disso, o nível de CC16 poderia ser considerado como um potencial marcador sérico de prognóstico neste grupo de pacientes, mas são necessários estudos prospectivos e longitudinais para que isso seja confirmado.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Agradecimentos

A pesquisa aqui descrita e a preparação deste manuscrito foram parcialmente financiadas pelo Ministério da Ciência e Educação Superior da Polônia (concessão n° N402.472.737). Gostaríamos de agradecer à Sra. Ewa Mazurkiewicz pela revisão do manuscrito.

REFERÊNCIAS

1. Le Pavec J, Launay D, Mathai SC, Hassoun PM, Humbert M. Scleroderma lung disease. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2011;40(2):104-16.
2. Hasegawa M, Asano Y, Endo H, Fujimoto M, Goto D, Ihn H, et al. Serum adhesion molecule levels as prognostic markers in patients with early systemic sclerosis: a multicentre, prospective, observational study. *PLoS One*. 2014;9(2):e88150.
3. Aozasa N, Asano Y, Akamata K, Noda S, Masui Y, Tamaki Z, et al. Clinical significance of serum levels of secretory leukocyte protease inhibitor in patients with systemic sclerosis. *Mod Rheumatol*. 2012;22(4):576-83.
4. Bonella F, Volpe A, Caramaschi P, Nava C, Ferrari P, Schenk K, et al. Surfactant protein D and KL-6 serum levels in systemic sclerosis: correlation with lung and systemic involvement. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis*. 2011;28(1):27-33.
5. Bernard A, Dumont X, Roels H, Lauwerys R, Dierynck I, De Ley M, et al. The molecular mass and concentrations of protein 1 or Clara cell protein in biological fluids: a reappraisal. *Clin Chim Acta*. 1993;223(1-2):189-91.
6. Hay JG, Danel C, Chu CS, Crystal RG. Human CC10 gene expression in airway epithelium and subchromosomal locus suggest linkage to airway disease. *Am J Physiol*. 1995;268 4 Pt 1:L565-75.
7. Broeckaert F, Clippe A, Knoop B, Hermans C, Bernard A. Clara cell secretory protein (CC16): features as a peripheral lung biomarker. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;923:68-77.
8. Shijubo N, Itoh Y, Yamaguchi T, Sugaya F, Hirasawa M, Yamada T, et al. Serum levels of Clara cell 10-kDa protein are decreased in patients with asthma. *Lung*. 1999;177(1):45-52.
9. Hermans C, Petrek M, Kolek V, Weynand B, Pieters T, Lambert M, et al. Serum Clara cell protein (CC16), a marker of the integrity of the air-blood barrier in sarcoidosis. *Eur Respir J*. 2001;18(3):507-14.
10. Bernard A, Hermans C, Van Houte G. Transient increase of serum Clara cell protein (CC16) after exposure to smoke. *Occup Environ Med*. 1997;54(1):63-5.
11. Hasegawa M, Fujimoto M, Hamaguchi Y, Matsushita T, Inoue K, Sato S, et al. Use of serum clara cell 16-kDa (CC16) levels as a potential indicator of active pulmonary fibrosis in systemic sclerosis. *J Rheumatol*. 2011;38(5):877-84.
12. Masi A, Rodnan G, Medsger T, Altman R, D'Angelo W, Fries J, et al. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum*. 1980;23(5):581-90.
13. van den Hoogen F, Khanna D, Fransen J, Johnson SR, Baron M, Tyndall A, et al. 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American college of rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis*. 2013;72(11):1747-55.
14. LeRoy E, Black C, Fleischmajer R, Jablonska S, Krieg T, Medsger T, et al. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets, and pathogenesis. *J Rheumatol*. 1988;15(2):202-5.
15. Clements P, Lachenbruch P, Siebold J, White B, Weiner S, Martin R, et al. Inter and intraobserver variability of total skin thickness score (modified Rodnan TSS) in systemic sclerosis. *J Rheumatol*. 1995;22(7):1281-5.
16. Goh NS, Desai SR, Veeraghavan S, Hansell D, Copley S, Maher T, et al. Interstitial lung disease in systemic sclerosis: a simple staging system. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;177(11):1248-54.
17. Shijubo N, Itoh Y, Yamaguchi T, Abe S. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for Clara cell 10-kDa protein: in pursuit of clinical significance of sera in patients with asthma and sarcoidosis. *Ann NY Acad Sci*. 2000;923:268-79.