ANTONIO MONTEIRO DA SILVA CHIBANTE

**ANÁLISE DO PROCESSO INFLAMATÓRIO AGUDO NO
LÍQUIDO PLEURAL PÓS-CIRURGIAS DE
REVASCULARIZAÇÃO DO MIOCÁRDIO**

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

Área de Concentração: Pneumologia

Orientador: Dr. Marcelo Alexandre Costa Vaz

São Paulo

2004

FICHA CATALOGRÁFICA

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

©reprodução autorizada pelo autor

Chibante, Antonio Monteiro da Silva

Análise do processo inflamatório agudo no líquido pleural pós-cirurgias de revascularização do miocárdio / Antonio Monteiro da Silva Chibante. -- São Paulo, 2004.

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

Departamento de Cardio-Pneumologia.

Área de concentração: Pneumologia.

Orientador: Marcelo Alexandre Costa Vaz.

Descritores: 1.DERRAME PLEURAL/fisiopatologia 2.CITOCINAS
3.REVASCULARIZAÇÃO MIOCÁRDICA/efeitos adversos 4.CORONARIOPATIA/
cirurgia 5.COMPLICAÇÕES PÓS-OPERATÓRIAS/fisiopatologia

USP/FM/SBD-057/04

**Dedico esta obra à minha família
pela compreensão e pelo tempo de
convívio que foi subtraído.**

**Agradeço a Deus por estar
sempre me orientando, protegendo
e dando forças para continuar
lutando.**

Ao Professor e amigo Francisco Vargas Suso, expressão ímpar no estudo das Doenças da Pleura, que num companheirismo especial me abriu as portas de seu Serviço e me permitiu avançar no estudo das citocinas e dos derrames pleurais.

AGRADECIMENTOS

Ao InCor (Instituto do Coração) por ter me acolhido e fornecido condições e infra-estrutura para o desenvolvimento desse trabalho.

Especial agradecimento ao meu orientador e amigo professor Marcelo Vaz, que sugeriu os caminhos deste projeto e que, com sua dedicação e paciência me favoreceu o desenvolvimento do mesmo.

À Profa. Dra. Lisete R. Teixeira por sua atenção, paciência e ajuda no desenvolvimento desta tese.

Aos Prof. Drs. Evaldo Marchi e Leila Antonângelo por suas sugestões e colaboração científica nesta tese.

Aos Profs. Drs. Mário Terra Filho pela sabedoria, rigor e orientação técnica com que conduz a Pós-graduação e ao Prof. Alberto Cukier pelo apoio.

A fisioterapeuta Daniela Boucharles que muito contribuiu para a realização desta tese.

À Dra. Simone Miranda que colaborou na pesquisa bibliográfica e na elaboração de alguns slides

À secretária Flávia Patrícia Pereira pela colaboração na digitação dos originais deste estudo.

Ao professor Ricardo Dias pelos conselhos e companheirismo durante a elaboração deste trabalho.

À bióloga Milena e toda a equipe do laboratório de pleura pela ajuda na manipulação das amostras de líquido pleural.

As Srtas. Luciana, Olga, Solange, Gislaine e Catia pelo auxílio ao longo destes anos

A todos os integrantes da Pós-graduação da Disciplina de Pneumologia da Faculdade de Medicina da USP que contribuíram para o meu desenvolvimento acadêmico e científico.

Aos pacientes que participaram deste trabalho pela empolgação e força de vontade para viver e vencer que tanto me estimularam no decorrer desta pesquisa. Obrigado por terem concordado em participar desta tese.

À equipe de cirurgia Cardíaca do INCOR, que realizou todas as cirurgias dos pacientes deste trabalho pela colaboração e dedicação.

Aos laboratórios Central do HC e do InCor, sem os quais este trabalho não poderia ter sido realizado.

Gostaria de expressar meus agradecimentos àqueles que de vários modos colaboraram na elaboração deste trabalho.

À Aventis Pharma pelo favorecimento na aquisição de Kits de cirocinas.

Por fim, agradeço à minha família pela compreensão e pela tolerância em aceitar durante o desenvolvimento da Tese a subtração de um tempo que lhes pertencia.

ÍNDICE

FICHA CATALOGRÁFICA	2
1 RESUMO.....	10
2 SUMMARY	11
3 INTRODUÇÃO	12
3.3 CONSIDERAÇÕES INICIAIS	12
3.4 DERRAME PLEURAL PÓS-REVASCULARIZAÇÃO DO MIOCÁRDIO ...	13
3.4.1 DERRAME PLEURAL PRECOCE	13
3.4.2 DERRAME PLEURAL TARDIO	14
3.4.3 SÍNDROME PÓS-PERICARDIOTOMIA	15
3.4.4 OUTROS.....	15
3.5 MOBILIZAÇÃO DE CITOCINAS NA CIRURGIA DE REVASCULARIZAÇÃO DO MIOCÁRDIO	16
4 OBJETIVOS	18
5 CASUÍSTICA E MÉTODO.....	19
5.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	25
6 RESULTADOS	25
6.3 INTERLEUCINA – 1 β	27
6.4 INTERLEUCINA-2.....	28
6.5 FATOR DE NECROSE TUMORAL α	28
6.6 INTERLEUCINA-6.....	29
6.7 INTERLEUCINA-8.....	31
6.8 FATOR DE CRESCIMENTO DO ENDOTÉLIO VASCULAR (VEGF)	33
6.9 FATOR DE TRANSFORMAÇÃO DO CRESCIMENTO β	35
6.10 DISTRIBUIÇÃO DAS CITOCINAS QUANTO AO SEXO DOS PACIENTES 37	
6.11 DISTRIBUIÇÃO DAS CITOCINAS QUANTO AS COMPLICAÇÕES PÓS- OPERATÓRIAS	39
6.12 DISTRIBUIÇÃO DAS CITOCINAS QUANTO A FAIXA ETÁRIA DOS PACIENTES.....	41
6.13 DISTRIBUIÇÃO DAS CITOCINAS QUANTO A UTILIZAÇÃO DE CIRCULAÇÃO EXTRA-CORPÓREA (CEC)	43
6.14 DISTRIBUIÇÃO DAS CITOCINAS QUANTO AO TEMPO DE CIRURGIA	45
7 DISCUSSÃO	47
8 CONCLUSÕES	53
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

1 RESUMO

O derrame pleural pós-revascularização do miocárdio é uma situação freqüente, porém, ainda de etiologia desconhecida, apesar da tendência atual de responsabilizar a agressão direta da pleura como principal fator desencadeante.

O objetivo deste estudo é avaliar a participação e comportamento das citocinas **TNF- α** , **IL-1 β** , **IL-2**, **IL-6**, **IL-8**, **VEGF** e **TGF- β** nos derrames pleurais imediatamente após o ato cirúrgico, em três intervalos distintos (2, 24 e 48 horas).

Foram analisados 43 indivíduos submetidos a revascularização miocárdica e 16 com derrames pleurais transudativos.

Na comparação com os transudatos, os resultados obtidos mostraram que **TNF- α** e **IL-2** não são mobilizados neste tipo de derrame, nas primeiras 48 horas. A **IL-1 β** se eleva a partir das primeiras 24 horas. As **IL-6** e **IL-8** se mantêm elevadas, assim como **VEGF**, enquanto que o **TGF- β** se inicia em níveis altos, que decaem a partir das 24 horas e atingem o valor dos transudatos em 48 horas.

Quando confrontados com variáveis que poderiam interferir na análise global dos pacientes (sexo, faixa etária, complicações pós-operatórias, CEC e tempo de cirurgia), foram observados níveis elevados de **IL-6** e **TGF- β** que se relacionaram nas primeiras 2 horas no sexo feminino. O **VEGF** apresentou-se reduzido, nas primeiras duas horas, em paciente submetidos à circulação extra-corpórea.

Concluimos, que o derrame pleural pós-revascularização do miocárdio é um exsudato associado à mobilização das citocinas **IL-1 β** , **IL-6**, **IL-8**, **VEGF** e **TGF- β** nas primeiras 48 horas, não parecendo haver relação com circulação extra-corpórea nem com faixa etária, tempo de cirurgia e complicações pós-operatórias.

2 SUMMARY

Pleural effusion after coronary artery bypass graft (CABG) is a very common finding. Its origin remains unknown, despite the tendency to consider pleural injury as the responsible cause.

The purpose of this study is to evaluate the participation and behavior of cytokines **TNF- α** , **IL-1 β** , **IL-2**, **IL-6**, **IL-8**, **VEGF** and **TNF- β** in pleural fluid immediately after 2, 24 and 48 hours after the surgical procedure.

Were evaluated 43 surgical patients and 16 transudates (control group). The obtained results showed that **TNF- α** and **IL-2** are not mobilized and that **IL-1 β** increases after 2 hours from the procedure. Interleukin-6 and **IL-8** presented in expressive levels during 48 hours as well as **VEGF**. Nevertheless, **TGF- β** values increase in the first time (2 hours) and decrease significantly in subsequent times until the transudates levels after 48 hours.

The cytokines were confronted with some variables (sex, age, complications, extra-corporal circulation and time of surgical intervention). Interleukin-6 and **TGF- β** values increased on the first time (2 hours) in females. In a similar way, only **VEGF** presented high levels in the first time (2 hours) in patients not submitted to extra-corporeal procedure.

We concluded that pleural effusions after CABG are associated with the presence of some cytokines (**IL-1 β** , **IL-6**, **IL-8**, **VEGF** and **TGF- β**) on the first 48 hours that do not correlate with age, extra-corporeal circulation, post-surgical complications and time of surgical intervention.

3 INTRODUÇÃO

3.3 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A cirurgia de revascularização do miocárdio pode resultar em complicações pleuro-pulmonares tanto na fase peri-operatória como no pós-operatório tardio. As atelectasias e os derrames pleurais compreendem os problemas mais comuns referidos por uma série de autores (1), (2), (3). A maioria desses derrames tem resolução espontânea. No entanto, podem se tornar recidivantes e evoluir com espessamento pleural, culminando com comprometimento funcional, requerendo decorticação (4), (5). A existência de comorbidades poderia favorecer, ou somar-se a estes fatores, e interferir tanto na morbidade como na mortalidade (6), (7), (8), (9).

O emprego de circulação extracorpórea (CEC), assim como a hipotermia e a cardioplegia, são técnicas referidas como favorecedoras de maiores complicações neste tipo de cirurgia, estando ligadas à liberação de citocinas inflamatórias (10), (11), (12). A evolução de estratégias operatórias, através do emprego de cirurgias minimamente invasivas, redução da utilização da CEC e o abandono da hipotermia tendem a reduzir a morbidade, resultando em tempos de internação mais curtos, mesmo em pacientes de maior risco (9), (13), (14). Desta forma, o derrame pleural pós-revascularização do miocárdio parece estar ligado à lesão direta da pleura. (10), (15).

Mecanismos inflamatórios, no entanto, têm sido evocados e constatados, freqüentemente, no soro de indivíduos com injúria do miocárdio e naqueles submetidos à cirurgia de revascularização, através da identificação de anticorpos anti-miocárdio e do perfil comportamental das citocinas no sangue destes indivíduos (16), (17), (18). A mobilização de elementos inflamatórios após agressão do pericárdio deixa em aberto a avaliação dos mecanismos de resposta da pleura, uma vez que a célula mesotelial apresenta capacidade de resposta inflamatória aos

mais diversos estímulos (19). Estes eventos poderiam explicar, ao menos em parte, o derrame pleural tardio pós-revascularização do miocárdio.

3.4 DERRAME PLEURAL PÓS-REVASCULARIZAÇÃO DO MIOCÁRDIO

É uma observação freqüente e que pode oscilar de 42% a 89% (15),(20). Seus mecanismos de desenvolvimento ainda não estão completamente esclarecidos, embora o trauma cirúrgico pareça ocupar um papel importante, em especial nos derrames precoces. Nos mais tardios podem evoluir com complicações na superfície pleural, como derrames recidivantes ou espessamentos pleurais de graus variados (4),(5). Os grandes derrames não costumam exceder 10% dos derrames pós-revascularização miocárdica, incidência semelhante à dos derrames rotulados como sintomáticos (21).

Os derrames pleurais pós-revascularização do miocárdio são classificados em precoces e tardios embora outros tipos possam ocorrer em função de trauma sobre as demais estruturas do mediastino.

3.4.1 DERRAME PLEURAL PRECOCE

É freqüente e costuma se apresentar como um exsudato assintomático, de pequeno volume e tonalidade sero-hemática. Pode cursar com taxa de eosinófilos acima de 10% (15), (21). Desenvolve-se nos primeiros 30 dias após a cirurgia de revascularização. Nas primeiras 48 horas de pós-operatório, Vargas e colaboradores (1) comprovaram, através de tomografia computadorizada do tórax, a presença de líquido também no hemitórax direito, observação habitualmente não relatada na abordagem deste assunto.

Derrames mais expressivos, acima de 25% da altura do hemitórax, costumam ocorrer em menos de 1% e se localizam, na maioria das vezes, à esquerda sendo que, menos da metade, é sero-hemático (22). São derrames precoces e cursam com maiores valores de desidrogenase láctica e, em algumas situações, tanto a insuficiência cardíaca como embolia pulmonar poderiam estar implicadas no mecanismo favorecedor.

Apesar de freqüentes, as atelectasias costumam ser de pequena intensidade, o que as eximiria de qualquer papel no desenvolvimento de líquido na cavidade (1).

Nos derrames precoces, o acometimento pericárdico parece cursar paralelamente ao pleural, em especial, a partir da segunda semana de pós-operatório (15). Derrames sintomáticos ocorrem em 10% dos casos e esta taxa pode cair até 3,5% se um dreno suplementar for mantido por 3 a 5 dias (23).

Na maioria das vezes o derrame pleural precoce é assintomático e reabsorvido sem que sua presença tenha sido percebida. Dentre os fatores que podem prolongar a permanência do derrame pleural se destacam o trauma torácico, a presença de tubos de drenagem e derrames pericárdicos (1).

3.4.2 DERRAME PLEURAL TARDIO

Costuma ocorrer geralmente a partir da 4^a semana do pós-operatório. São exsudatos de tonalidade citrina e volumes maiores, linfocíticos e com certo grau de monocitose (21), (24). Os mecanismos responsáveis pelo estabelecimento deste tipo de derrame ainda não estão devidamente esclarecidos, mas o comportamento do líquido sugere a existência de um componente imunológico. A dispnéia é uma queixa freqüente, no entanto, a ausência de febre, pericardite e dor torácica, o diferenciam do quadro habitual da Síndrome de Dressler (25).

A reação pleural apresenta proliferação fibroblástica significativa, tendo como base infiltração linfocitária (4). Esta forma de comportamento pleural subentende um perfil reativo exagerado da camada mesotelial que pode culminar com situações extremas de fibrotórax e necessidade de decorticação. (4), (5). O mecanismo imunológico, contudo, ainda é desconhecido.

A incidência deste tipo de derrame é aproximadamente de 37%, conforme estudos de Sadikot e colaboradores (24) e parece transcorrer com níveis de desidrogenase láctica pouco alterados.

3.4.3 SÍNDROME PÓS-PERICARDIOTOMIA

Foi descrita após agressões miocárdicas e pericárdicas, como por exemplo, após infarto agudo do miocárdio, cirurgias cardíacas ou implantação de marcapasso. Caracteriza-se por inflamação do pericárdio e da pleura, além de infiltrações no parênquima pulmonar. Febre, dor torácica e atrito pleural e pericárdico fazem parte do quadro (26). Esta síndrome, pode ser observada em até 15% dos pacientes submetidos a qualquer tipo de cirurgia cardíaca e costuma estar associada à presença de auto-anticorpos anti-músculo cardíaco, com níveis elevados a partir do 14^o dia de pós-operatório (26),(27). Leucocitose discreta e elevação da hemossedimentação podem ser observadas nesta síndrome que costuma responder favoravelmente ao emprego de antiinflamatórios (28),(29).

A Síndrome Pós-pericardiotomia diferencia-se do quadro de derrame pleural tardio pós-revascularização do miocárdio pela presença de fenômenos imunológicos específicos e aspectos sazonais, além do acometimento pericárdico e pulmonar (30).

3.4.4 OUTROS

Quilotórax e Pseudoquilotórax são situações passíveis de ocorrerem em indivíduos submetidos a cirurgias cardíacas em decorrência da agressão operatória sobre o ducto torácico ou seus afluentes (31), (32).

3.5 MOBILIZAÇÃO DE CITOCINAS NA CIRURGIA DE REVASCULARIZAÇÃO DO MIOCÁRDIO

Tanto o músculo cardíaco, como a CEC têm sido responsabilizados pela mobilização de citocinas na cirurgia de revascularização do miocárdio. A situação do miócito em diferentes estados do miocárdio (transplante cardíaco, hipertrofia ventricular esquerda, insuficiência cardíaca, inflamação e isquemia miocárdica) favorece não só a presença local, como sanguínea, de citocinas (16),(17),(33),(34).

Na CEC, o sangue do paciente ao se expor a superfícies artificiais mobiliza frações do sistema complemento, favorece a migração de leucócitos e a liberação de radicais livres e mediadores diversos (18), (35). Dentre as citocinas liberadas, **TNF- α** , **IL-1** e **IL-6** - chamadas de citocinas de resposta inflamatória de fase aguda - podem ser seguidas da mobilização de **IL-8**, **IL-10**, **IL1-Ra** e **PAI-1** o que se contraporia aos efeitos inflamatórios. A hemofiltração, atualmente utilizada durante a CEC, retira estes mediadores inflamatórios, atenuando as conseqüências sistêmicas provenientes da CEC (18), (35), (36), (37). A bradicinina e a **IL-6** são encontradas em níveis elevados no derrame pleural pós-revascularização e podem induzir a liberação de várias citocinas (3), (11), (16), (34), (38).

Pelo exposto, observamos que ainda existe grande desconhecimento sobre o comportamento do processo inflamatório desencadeado pela cirurgia de revascularização do miocárdio. Quais os fatores que determinam a evolução para derrames pleurais precoces e tardios? Que mecanismos concorrem para o desenvolvimento de espessamentos pleurais ou para derrames recidivantes, após o procedimento? Existiriam diferentes perfis inflamatórios no líquido pleural? A pleura

realmente participa do processo inflamatório ou apenas sofre a influência do que se manifesta no pericárdio? Como é a resposta inflamatória pleural esperada após o trauma cirúrgico?

Devido à diversidade de resultados na fase aguda pós-cirurgia cardíaca é de relevância não apenas o conhecimento do comportamento evolutivo do processo inflamatório pleural como dos marcadores inflamatórios envolvidos neste processo.

4 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é analisar evolutivamente, a resposta inflamatória da pleura na fase aguda pós-revascularização do miocárdio através da avaliação do comportamento das citocinas no líquido pleural.

5 CASUÍSTICA E MÉTODO

O estudo foi montado contando com dois grupos, sendo um grupo controle (10 pacientes com derrames pleurais transudativos provenientes do ambulatório de doenças pleurais do Hospital das Clínicas da FMUSP) e um grupo de estudo (40 pacientes submetidos a revascularização do miocárdio no Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da FMUSP).

Para avaliar o comportamento das citocinas no líquido pleural, na fase aguda do pós-operatório da revascularização do miocárdio, assumimos como critério de normalidade das citocinas, as dosagens realizadas nos líquidos transudativos (grupo controle), e comparamos com as dosagens seriadas dos pacientes submetidos a revascularização do miocárdio.

Após termos feito a análise evolutiva dos pacientes submetidos a revascularização do miocárdio e comparado com o grupo controle, analisamos os fatores que poderiam interferir nos resultados. Selecionamos como fatores interferentes potenciais: o sexo, a faixa etária, o tempo de cirurgia, a presença de complicações pós-operatórias e a presença de circulação extracorpórea.

O grupo submetido à cirurgia cardíaca foi avaliado em quatro momentos diferentes, sendo a primeira no pré-operatório (avaliação de critérios de inclusão e exclusão e consentimento pós-informado), a segunda avaliação foi feita após duas horas da finalização da cirurgia (coleta de líquido pleural), a terceira após 24 horas (coleta de líquido pleural) e a quarta após 48 horas da cirurgia (coleta de líquido pleural e avaliação de complicações) (Figura 1).

Figura 1: Desenho esquemático das fases do estudo, evidenciando os três momentos de coleta de líquido pleural

Os critérios de inclusão e exclusão foram definidos para evitar a interferência de outras doenças sobre o processo inflamatório pleural. Do mesmo modo foram excluídos pacientes que apresentaram complicações no intra-operatório passíveis de interferir neste processo, assim como, aqueles que pudessem apresentar algum acréscimo de risco por estarem participando do estudo (Quadro 1)

Quadro 1: Critérios utilizados para inclusão e exclusão de pacientes do estudo

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO CONFORME OS GRUPOS SELECIONADOS

Grupo de estudo - indivíduos submetidos à revascularização do miocárdio e que não apresentavam, **antes** da cirurgia, qualquer tipo de situação clínica relacionada com presença de derrame pleural ou aspectos radiológicos do tórax que evidenciassem existência de líquido no espaço pleural.

Grupo controle - indivíduos portadores de transudatos comprovados pelo estudo do líquido pleural conforme os parâmetros classificatórios de Light (39), com quadro clínico sistêmico compatível com Insuficiência cardíaca congestiva, insuficiência hepática, insuficiência renal, síndrome nefrótica ou hipoalbuminemia.

Foram coletadas amostras de líquido pleural diretamente do dreno torácico (Quadro 2), no grupo submetido à cirurgia cardíaca, após 2, 24 e 48 horas (Figura 1) e enviadas para análise bioquímica, citológica e estudo das citocinas. As amostras de líquido pleural do grupo controle foram coletadas durante toracocentese de alívio em pacientes com diagnóstico de transudato, estabelecido conforme os critérios de Light (39).

O estudo foi submetido e aprovado pelos Conselhos de Ética do HC - FMUSP.

Quadro 2: Descrição detalhada da metodologia de coleta de líquido pleural do dreno torácico.

TEMPOS DE ABORDAGEM E PREPARO DO LÍQUIDO PLEURAL

- Clampeamento do dreno por 30 minutos
- Antissepsia do dreno torácico com clorexidina
- Punção oblíqua do dreno na sua porção de borracha acima do clampeamento
- Coleta de alíquotas de líquido pleural
- Distribuição do líquido em 3 tubos de ensaio:
 - 1 tubo com EDTA (citologia)
 - 1 tubo seco (alíquotas)
 - 1 tubo seco (bioquímica)
- Processamento da citologia e da bioquímica no mesmo dia da coleta
- Processamento da alíquota (para dosagem das citocinas)
 - Centrifugação
 - Separação do sobrenadante
 - Congelamento do sobrenadante a -70° C em amostras de 0.5 ml

Dentre os parâmetros bioquímicos, as dosagens de proteína e da desidrogenase láctica (DHL) foram selecionados como marcadores inespecíficos de processo inflamatório e para diferenciação entre transudatos e exsudatos. As proteínas foram dosadas através do método biureto, colorimétrico e a desidrogenase láctica pelo cinético-UV, automatizado. Ambos os métodos são utilizados na rotina do laboratório central do HC e do InCor.

A análise citológica considerou o número total e relativo de leucócitos (com seu diferencial), macrófagos e células mesoteliais, para estudo do tipo de processo

inflamatório envolvido. O número total de células foi obtido com a contagem em câmara de Newbauer. A análise diferencial de células foi realizada utilizando a coloração de Leishman, em esfregaço de líquido pleural, após cito centrifugação.

As citocinas **TNF- α** , **IL-1 β** , **IL-2**, **IL-6**, **IL-8**, **VEGF** e **TGF- β** foram consideradas para análise do perfil da resposta inflamatória pleural. A dosagem das citocinas foi realizada, após a coleta do material de todos os pacientes do estudo, utilizando o método de ELISA (*enzyme-linked immunoabsorbent assay*) de captura (R&D System, Inc., Minneapolis, USA), realizadas no laboratório de Pleura do InCor – HC - FMUSP.

O método elaborado para leitura dos valores das citocinas utilizou placas com 96 poços e apresenta-se especificado no Quadro 3.

Quadro 3: Descrição detalhada do método utilizado para mensuração das citocinas.

Etapas Sequenciais do Método de Leitura das Citocinas

- sensibilização com 100 µL de anticorpo anti-humano (18 horas a 4° C.)
- bloqueio da placa com 300 µL de solução BSA 2% (2 horas a 37° C.)
- adição de 100 µL por poço das amostras e padrões diluídos em PBS (18 horas a 4° C.)
- adição de 100 µL do anticorpo anti-humano biotilado (2 horas a 37° C.)
- adição de 100 µL de Streptavidina HRP (1:250) por poço (0,5 horas a 37° C.)
- adição de 100 µL de solução de revelação por poço (até 1 hora a 37° C)
- interrupção da reação com 50 µL de H₂SO₄ a 30%
- leitura realizada em leitor ELISA (Power Wave, Bio-tek) a 450 nm

5.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando os softwares estatísticos SAS (SAS Institute Inc - North Caroline - USA) e SPSS (SPSS Inc - Illinois USA). Os dados contínuos foram descritos através dos valores mínimo e máximo, mediana, média, desvio e erro padrão.

As medidas das citocinas ao longo do tempo no pós-operatório foram comparadas através da análise de variância para medidas repetidas.

A suposição de normalidade dos dados nas análises citadas acima foi verificada construindo-se os gráficos de ramo-e-folhas e de distribuição normal dos resíduos. Nas situações em que tal suposição foi violada, utilizou-se a transformação logarítmica para a variável resposta.

O nível de significância estabelecido para as análises foi de 5%, a exceção das hipóteses de interação na análise de variância para medidas repetidas onde se considerou um nível de significância igual a 10%, com o objetivo de se evitar um aumento do erro tipo II (ou seja, concluir que os grupos são iguais, visto que são diferentes).

6 RESULTADOS

Foram incluídos 43 pacientes submetidos à cirurgia de revascularização do miocárdio e 16 portadores de transudatos, como grupo controle, confirmados pelas características bioquímicas conforme os critérios de Light (39). Todos os pacientes concordaram em participar do protocolo de pesquisa, tendo assinado o consentimento pós-informado.

Dos 43 pacientes avaliados, 32 eram do sexo masculino ($60,5 \pm 8,5$ anos) e 9 do sexo feminino (61 ± 12 anos). Destes 33 foram submetidos a cirurgia de revascularização do miocárdio utilizando circulação extra-corpórea. O tempo médio

de cirurgia foi de 365 ± 72 minutos. O aspecto do líquido pleural foi sero-hemorrágico, ou hemorrágico em todos os pacientes nos momentos analisados.

A análise no líquido pleural dos marcadores bioquímicos inespecíficos de inflamação (DHL e proteínas) evidenciou níveis elevados de DHL e proteína durante as primeiras 48 horas do pós-operatório (Quadro 4). Já a análise citológica evidenciou um número elevado de células nucleadas (acima de 5000 células nucleadas por mm^3), que se mantiveram durante os três momentos analisados, com predomínio de neutrófilos (92 %) (Quadro 4).

Quadro 4: Dados descritivos das medidas bioquímicas e análise citológica.

Resultados apresentados como Média $\pm$ desvio padrão

	n	2 horas	24 horas	48 horas
DHL (UI/dl)	43	1762 ± 882	1882 ± 779	1545 ± 547
Proteína total (g/dl)	43	$3,69 \pm 0,95$	$3,08 \pm 0,88$	$2,62 \pm 0,80$
Total de células nucleadas (por mm^3)	20	5424 ± 3478	5082 ± 3622	4908 ± 6553
% de leucócitos	20	93 ± 7	95 ± 5	90 ± 9
% Neutrófilos	20	91 ± 5	94 ± 3	91 ± 7
% linfócitos	20	7 ± 5	5 ± 3	7 ± 3
% de eosinófilos	20	1 ± 1	1 ± 1	1 ± 1

O comportamento das citocinas no líquido pleural na fase aguda do pós-operatório da revascularização do miocárdio, em relação às dosagens consideradas como normais (transudatos), demonstrou haver uma mobilização das citocinas com elevação da IL-1 β , IL-6, IL-8, VEGF e TGF- β .

A IL-2 e o TNF- α mantiveram-se sempre baixos, tanto nos derrames transudativos, quanto nos derrames pós-cirúrgicos.

6.3 INTERLEUCINA – 1 β

Ao comparar as médias do $\ln(\text{IL-1}\beta)$ no grupo Cirurgia com a média do grupo Transudato observa-se que após duas horas do término da cirurgia os níveis de IL-1 β são similares aos observados nos líquidos transudativos ($p=0,2325$), elevando-se nas primeiras 24 horas ($p=0,0014$) e permanecendo elevada após 48 horas ($p=0,0008$).

Figura 2: Gráfico da análise comparativa entre transudato e as medidas observadas pós cirúrgicas. A IL-1 é apresentada na sua forma logarítmica.

* $p<0,05$ em relação a transudatos, # $p<0,05$ em relação a 2 horas, + $p<0,05$ em relação a 24 horas

Quadro 5: Dados descritivos das medidas da IL 1- β em relação a sua evolução temporal no pós-operatório e em relação as medidas dos transudatos.

Resultados apresentados como Média $\pm$ desvio padrão

Grupo	Avaliação	n	IL-1 β	$\ln(\text{IL-1}\beta)$
Cirurgia	2 h	43	15,19 $\pm$ 33,14	1,798 $\pm$ 0,231
	24 h	43	45,03 $\pm$ 88,72	2,575 $\pm$ 0,218
	48 h	43	34,49 $\pm$ 46,42	2,610 $\pm$ 0,263
Transudatos	--	16	13,71 $\pm$ 40,46	1,421 $\pm$ 0,263

Quadro 6: Resultados da análise estatística das medidas da IL 1- β em relação a sua evolução temporal no pós-operatório e com as medidas dos transudatos. P = índice de significância

Comparações	P
Análise do efeito do tempo e das medidas dos transudatos feita em conjunto	0,0088
Cirurgia tempo 2 horas x Cirurgia tempo 24 horas	0,0033
Cirurgia tempo 2 horas x Cirurgia tempo 48 horas	0,0045
Cirurgia tempo 24 horas x Cirurgia tempo 48 horas	0,8518
Cirurgia tempo 2 horas x Transudato	0,2325
Cirurgia tempo 24 horas x Transudato	0,0014
Cirurgia tempo 48 horas x Transudato	0,0008

6.4 INTERLEUCINA-2

A IL-2 apresentou resultados abaixo dos valores mínimos de detecção do método, tanto nos derrames transudativos, quanto nos derrames após a revascularização do miocárdio. Desta forma, não foi realizada nenhuma análise estatística nestes parâmetros.

6.5 FATOR DE NECROSE TUMORAL α

Em todos os momentos avaliados os valores do TNF- α do grupo submetido à cirurgia se mantiveram semelhantes aos observados nos transudatos (p=0,72).

Figura 3: Gráfico da análise comparativa entre as medidas observadas pós cirúrgicas do TNF – α e os transudatos.

Quadro 7: Dados descritivos das medidas da TNF alfa em relação a sua evolução temporal no pós-operatório e com as medidas dos transudatos.

Resultados apresentados como Média $\pm$ desvio padrão

Grupo	Avaliação	N	TNF
Cirurgia	2 h	43	76,91 $\pm$ 165,79
	24 h	43	75,75 $\pm$ 169,15
	48 h	43	69,78 $\pm$ 141,14
Transudatos	--	16	59,66 $\pm$ 109,72

6.6 INTERLEUCINA-6

A IL-6 apresentou-se elevada quando confrontada com valores de transudatos, desde o primeiro intervalo (2 horas - $p < 0,001$), com queda ao longo do tempo ($p = 0,03$ e $p = 0,02$), mas sem retornar aos valores assumidos como de referência de normalidade (transudatos) ($p < 0,001$ - 48 horas).

Figura 4: Gráfico da análise comparativa entre as medidas observadas pós cirúrgicas e os transudatos. A IL-6 é apresentada na sua forma logarítmica.

***p<0,05 em relação a transudatos, # p<0,05 em relação a 2 horas, + p<0,05 em relação a 24 horas**

Quadro 8: Dados descritivos das medidas da IL 6 em relação a sua evolução temporal no pós-operatório e com as medidas dos transudatos.

Resultados apresentados como Média ± desvio padrão

Grupo	Avaliação	n	IL-6	ln(IL-6)
Cirurgia	2 h	43	27883 ± 19737	9,978 ± 0,127
	24 h	43	25043 ± 16627	9,859 ± 0,125
	48 h	43	19576 ± 22296	9,560 ± 0,113
Transudatos	--	16	6285 ± 4280	8,526 ± 0,182

Quadro 9: Resultados da análise estatística das medidas da IL-6 em relação a sua evolução temporal no pós-operatório e com as medidas dos transudatos.

P = índice de significância

Comparações	P
Análise do efeito do tempo e das medidas dos transudatos feita em conjunto	0,0559
Cirurgia tempo 2 horas x Cirurgia tempo 24 horas	0,4272
Cirurgia tempo 2 horas x Cirurgia tempo 48 horas	0,0327
Cirurgia tempo 24 horas x Cirurgia tempo 48 horas	0,0279
Cirurgia tempo 2 horas x Transudato	<,0001
Cirurgia tempo 24 horas x Transudato	<,0001
Cirurgia tempo 48 horas x Transudato	<,0001

6.7 INTERLEUCINA-8

A IL-8 apresentou-se elevada desde o primeiro intervalo (2 horas - $p < 0,001$), em relação aos valores de transudatos e manteve-se estável nos três intervalos pós-operatórios analisados.

Figura 5: Gráfico da análise comparativa entre as medidas observadas pós cirúrgicas da IL-8 e os transudatos. *p<0,05 em relação a transudatos, # p<0,05 em relação a 2 horas, + p<0,05 em relação a 24 horas

Quadro 10: Dados descritivos das medidas da IL 8 em relação a sua evolução temporal no pós-operatório e com as medidas dos transudatos.

Resultados apresentados como Média ± desvio padrão

Grupo	Avaliação	n	IL-8
Cirurgia	2 h	43	2612 ± 1415
	24 h	43	2855 ± 1492
	48 h	43	2757 ± 1496
Transudatos	--	16	77 ± 136

Quadro 11: Resultados da análise estatística das medidas da IL-8 em relação a sua evolução temporal no pós-operatório e com as medidas dos transudatos. P = índice de significância.

Comparações	P
Análise do efeito do tempo e das medidas dos transudatos feita em conjunto	0,6027
Cirurgia tempo 2 horas x Transudato	<,0001
Cirurgia tempo 24 horas x Transudato	<,0001
Cirurgia tempo 48 horas x Transudato	<,0001

6.8 FATOR DE CRESCIMENTO DO ENDOTÉLIO VASCULAR (VEGF)

O VEGF apresentou-se elevado, quando comparado com os valores dos transudatos, desde o primeiro intervalo (2 horas - $p < 0,001$), mantendo-se estável por 48 horas. Contudo, após 48 horas, parece estar iniciando o decaimento dos níveis de VEGF ($p = 0,0724$).

Figura 6: Gráfico da análise comparativa entre as medidas observadas pós cirúrgicas e os transudatos. O VEGF é apresentada na sua forma logarítmica.

***p<0,05 em relação a transudatos, # p<0,05 em relação a 2 horas, † p<0,05 em relação a 24 horas**

Quadro 12: Dados descritivos das medidas da VEGF em relação a sua evolução temporal no pós-operatório e com as medidas dos transudatos.

Resultados apresentados como Média ± desvio padrão

Grupo	Avaliação	n	VEGF	Ln (VEGF)
Cirurgia	2 h	43	877 ± 935	6,336 ± 0,147
	24 h	43	2391 ± 1666	7,541 ± 0,107
	48 h	43	1787 ± 1042	7,365 ± 0,072
Transudatos	--	16	268 ± 224	5,132 ± 0,294

Quadro 13: Resultados da análise estatística das medidas da VEGF em relação a sua evolução temporal no pós-operatório e com as medidas dos transudatos. P = índice de significância

Comparações	P
Análise do efeito do tempo e das medidas dos transudatos feita em conjunto	<,0001
Cirurgia tempo 2 horas x Cirurgia tempo 24 horas	<,0001
Cirurgia tempo 2 horas x Cirurgia tempo 48 horas	<,0001
Cirurgia tempo 24 horas x Cirurgia tempo 48 horas	0,0724
Cirurgia tempo 2 horas x Transudato	0,0004
Cirurgia tempo 24 horas x Transudato	<,0001
Cirurgia tempo 48 horas x Transudato	<,0001

6.9 FATOR DE TRANSFORMAÇÃO DO CRESCIMENTO β

O TGF- β apresentou-se elevado quando confrontado com os valores dos transudatos, desde o primeiro intervalo (2 horas - $p < 0,001$), com queda progressiva ao longo do tempo, retornando aos valores assumidos como normais (transudatos), ao final de 48 horas ($p = 0,3764$).

Figura 7: Gráfico da análise comparativa entre as medidas observadas pós cirúrgicas e os transudatos. O TGF- β é apresentado na sua forma logarítmica.
***p<0,05 em relação a transudatos, # p<0,05 em relação a 2 horas, † p<0,05 em relação a 24 horas**

Quadro 14: Dados descritivos das medidas da TGF em relação a sua evolução temporal no pós-operatório e com as medidas dos transudatos. Resultados apresentados como Média $\pm$ desvio padrão

Grupo	Avaliação	n	TGF	ln(TGF)
Cirurgia	2 h	43	486 $\pm$ 312	5,941 $\pm$ 0,117
	24 h	43	273 $\pm$ 255	5,205 $\pm$ 0,137
	48 h	43	136 $\pm$ 148	4,645 $\pm$ 0,095
Transudatos	--	16	138 $\pm$ 69	4,805 $\pm$ 0,152

Quadro 15: Resultados da análise estatística das medidas da TGF em relação a sua evolução temporal no pós-operatório e com as medidas dos transudatos. P = índice de significância

Comparações	P
Análise do efeito do tempo e das medidas dos transudatos feita em conjunto	<,0001
Cirurgia tempo 2 horas x Cirurgia tempo 24 horas	<,0001
Cirurgia tempo 2 horas x Cirurgia tempo 48 horas	<,0001
Cirurgia tempo 24 horas x Cirurgia tempo 48 horas	<,0001
Cirurgia tempo 2 horas x Transudato	<,0001
Cirurgia tempo 24 horas x Transudato	0,0533
Cirurgia tempo 48 horas x Transudato	0,3764

Após realizada a análise evolutiva em conjunto dos pacientes submetidos a revascularização do miocárdio e termos observado importante mobilização das citocinas ao longo do tempo, nos questionamos se fatores como o sexo (42), a faixa etária (6), o tempo de cirurgia, a presença de complicações pós-operatórias e a presença de circulação extra-corpórea, não poderiam estar interferindo nos resultados observados. Por este motivo, subdividimos os pacientes quanto a estas variáveis e reanalisamos as citocinas.

6.10 DISTRIBUIÇÃO DAS CITOCINAS QUANTO AO SEXO DOS PACIENTES

As dosagens das citocinas do líquido pleural dos pacientes submetidos a revascularização do miocárdio foram divididas em dois grupos quanto ao sexo (M = masculino e F = feminino), tendo sido analisadas as diferenças de sua distribuição (Figura 8). Foram estudados 10 pacientes do sexo feminino e 33 do sexo masculino. Não foi constatada qualquer diferença entre os sexos em relação a IL-1 β , IL-2, IL-8, TNF α , e VEGF. As concentrações de IL-6 e TGF- β foram maiores nas primeiras 2 horas no sexo feminino ($p < 0,05$) mas se igualaram após 24 horas.

Figura 8: Gráfico da análise comparativa entre os sexos, nos pacientes submetidos à revascularização do miocárdio para cada citocina. A: IL-1 β ; B: IL-8; C: TNF α ; D: VEGF; E: IL-6 e F: TGF- β . O TGF- β , VEGF, IL-6, IL-1 β são apresentados na sua forma logarítmica. (M = masculino e F = feminino). *
p<0,05

A - IL-1 β

B - IL-8

C - TNF α

D - VEGF

E - IL-6

F - TGF- β

6.11 DISTRIBUIÇÃO DAS CITOCINAS QUANTO AS COMPLICAÇÕES PÓS-OPERATÓRIAS

As dosagens das citocinas no líquido pleural dos pacientes submetidos a cirurgia de revascularização do miocárdio foram divididas em dois grupos quanto à presença de complicações (Não = ausência e Sim = presença) tendo sido analisadas as diferenças de sua distribuição. As complicações, que envolviam alterações eletrocardiográficas, instabilidade hemodinâmica, arritmias, prótese ventilatória, pneumotórax, broncoespasmo e agitação psicomotora, foram registradas em 9 de 43 pacientes.

Com relação às complicações não foi observada qualquer diferença significativa entre os dois grupos nas diversas dosagens.

Figura 9: Gráfico da análise comparativa entre complicação pós-operatória para cada citocina. (Não – ausência de complicação, Sim – Presença de complicação) A: IL-1 β ; B: IL-8; C: TNF α ; D: VEGF; E: IL-6 e F: TGF- β . O TGF- β , VEGF, IL-6, IL-1 β são apresentados na sua forma logarítmica. * p<0,05

A - IL-1 β

B - IL-8

C - TNF α

D - VEGF

E - IL-6

F - TGF- β

6.12 DISTRIBUIÇÃO DAS CITOCINAS QUANTO A FAIXA ETÁRIA DOS PACIENTES

As dosagens das citocinas no líquido pleural dos pacientes submetidos à cirurgia foram divididas em três grupos quanto à faixa etária (A < 54 anos, B entre 54 e 64 anos e C > 64 anos) e analisadas as diferenças de sua distribuição (Figura 10). Foram observados 11 pacientes abaixo de 54 anos, 15 entre 54 e 64 anos e 17 com mais de 64 anos.

Não foi observada qualquer diferença significativa entre os grupos etários das citocinas nos diferentes tempos analisados

Figura 10: Gráfico da análise comparativa entre as faixas etárias nos pacientes submetidos à revascularização miocárdica para cada citocina. A: IL-1 β ; B: IL-8; C: TNF α ; D: VEGF; E: IL-6 e F: TGF- β . O TGF- β , VEGF, IL-6, IL-1 β são apresentados na sua forma logarítmica

A - IL-1 β

B - IL-8

C - TNF α

D - VEGF

E - IL-6

F - TGF- β

6.13 DISTRIBUIÇÃO DAS CITOCINAS QUANTO A UTILIZAÇÃO DE CIRCULAÇÃO EXTRA-CORPÓREA (CEC)

As dosagens das citocinas no líquido pleural dos pacientes submetidos a cirurgia de revascularização do miocárdio foram divididas em dois grupos quanto à presença de CEC (Não = ausência e Sim = presença) tendo sido analisadas as diferenças de sua distribuição (Figura 11). A CEC foi aplicada a 35 pacientes.

Todas as citocinas estudadas, com exceção do VEGF no primeiro intervalo (2 horas), não apresentaram relação com a circulação extra-corpórea.

A primeira dosagem do VEGF foi mais baixa no grupo que utilizou CEC (701 ± 816 pg/ml) do que a observada no grupo que não utilizou CEC (2020 ± 1180 pg/ml), com índice de significância (p) menor do que 0,001. Esta diferença desaparece a partir do segundo intervalo de avaliação (24 horas).

Figura 11: Gráfico da análise comparativa entre a utilização de CEC nos pacientes submetidos à revascularização miocárdica para cada citocina. A: IL-1 β ; B: IL-8; C: TNF α ; D: VEGF; E: IL-6 e F: TGF- β . O TGF- β , VEGF, IL-6, IL-1 β são apresentados na sua forma logarítmica. * p<0,05

A - IL-1 β

B - IL-8

C - TNF α

D - VEGF

E - IL-6

F - TGF- β

6.14 DISTRIBUIÇÃO DAS CITOCINAS QUANTO AO TEMPO DE CIRURGIA

As dosagens das citocinas no líquido pleural dos pacientes submetidos a cirurgia foram divididas em três faixas quanto ao tempo de cirurgia (A < 345 minutos, B entre 345 e 420 minutos e C > 420 minutos), tendo sido analisadas as diferenças de sua distribuição (Figura 12). Foram estudados 13 pacientes enquadrados na faixa A, 12 na B e 18 na C.

O estudo não evidenciou qualquer diferença entre as medidas das citocinas quanto ao tempo de cirurgia.

Figura 12: Gráfico da análise comparativa entre o tempo de cirurgia nos pacientes submetidos à revascularização miocárdica para cada citocina. A: IL-1 β ; B: IL-8; C: TNF α ; D: VEGF; E: IL-6 e F: TGF- β . O TGF- β , VEGF, IL-6, IL-1 β são apresentados na sua forma logarítmica

A - IL-1 β

B - IL-8

C - TNF α

D - VEGF

E - IL-6

F - TGF- β

7 DISCUSSÃO

Poucos são os estudos que tentam abordar os mecanismos de desenvolvimento do derrame pleural pós-revascularização do miocárdio, apesar de vários autores defenderem o papel do trauma cirúrgico e das condutas operatórias invasivas na gênese do derrame (1),(10).

Após um trauma cirúrgico, como por exemplo, o da revascularização do miocárdio, espera-se que os tecidos lesados induzam uma reação inflamatória aguda, caracterizada por aumento de neutrófilos, ativação de macrófagos e linfócitos, aumento da permeabilidade vascular e liberação de citocinas inflamatórias de fase aguda (43). Baseado neste conceito, em nosso estudo, esperava que todas as citocinas estudadas se elevassem nas primeiras 48 horas após a cirurgia.

A cavidade pleural apresenta características únicas no organismo. A célula mesotelial, diferente de várias outras células do corpo, apresenta uma grande diversidade de reação, podendo desde secretar citocinas até produzir colágeno. O espaço pleural, caracteristicamente, apresenta-se compartimentalizado do restante do organismo (Xxref livro_pleura). Desta forma, a extrapolação de observações da resposta inflamatória que ocorrem em outros locais, ou até mesmo sistemicamente pode facilmente induzir ao erro, e a falsas interpretações no espaço pleural.

Partindo da premissa sugerida por Broaddus (43), de que os transudatos são um ultrafiltrado da microcirculação normal, resultante do desequilíbrio entre as pressões hidrostática e oncótica, não apresentando processo inflamatório pleural ativo (43), utilizamos os líquidos transudativos como grupo controle. Em concordância com este conceito, observamos em nossos resultados que:

- Os níveis iniciais da **IL-1 β** foram semelhantes aos observados no grupo controle, elevando-se após 24 horas,

- Os níveis da **IL-1 β** , observados por Silva-Mejias e colaboradores (44) nos transudatos foram similares aos observados em nosso estudo,
- Os níveis do **TGF- β** retornaram a valores similares aos do grupo controle após 48 horas da cirurgia,
- No grupo controle, nos líquidos transudativos, os níveis de todas as citocinas foram inferiores ou no máximo iguais aos do líquido pleural pós revascularização do miocárdio.

Quanto ao perfil das citocinas no pós-operatório, a **IL-1 β** apresentou-se no primeiro intervalo (2 horas), com valores semelhantes aos dos transudatos para em seguida se elevarem e se manterem aumentados nos demais intervalos. Estes dados sugerem que a participação da **IL-1 β** na inflamação pleural se inicia após duas horas do final da agressão tissular e se mantém pelas primeiras 48 horas. Dentre as várias funções biológicas atribuídas a **IL-1 β** , a que mais se destaca é a atividade pró-inflamatória, ou seja a de estimular a liberação de outras citocinas, como a **IL-6** e a **IL-8** (44). Curiosamente, neste trabalho observamos que tanto a **IL-6**, como a **IL-8** já estavam elevadas após 2 horas do procedimento, enquanto a **IL-1 β** só se elevou após 24 horas. Este achado, deixa em dúvida a participação da **IL-1 β** na liberação destas duas citocinas. Uma hipótese, para esta observação, é que a **IL-1 β** possa participar na manutenção dos níveis elevados de **IL-6** e **IL-8** após as 48 horas.

O **TNF- α** é uma citocina pró-inflamatória secretada por macrófagos, monócitos, linfócitos T e B, que tem sido encontrada em líquidos pleurais exsudativos de diversas etiologias (46). As baixas concentrações observadas de **TNF- α** em todos os momentos, deixam em dúvida a participação desta citocina no processo inflamatório pleural agudo pós-revascularização do miocárdio. Nossos resultados são contrários a sugestão de Xirouchaki e colaboradores (46) que o

TNF- α seria um importante mediador na resposta inflamatória do espaço pleural. Em acordo, com nossos resultados, a literatura demonstra uma grande variabilidade no comportamento do **TNF- α** em outras doenças pleurais (47),(48), sugerindo que a liberação de **TNF- α** deva envolver outros mecanismos ainda não totalmente esclarecidos e que sua interpretação deva ser cuidadosa.

A dosagem de **IL-2** no líquido pleural apresentou resultados, em sua maioria, inferiores ao limite de detecção do método de ELISA, tanto nos transudatos, quanto no líquido pleural pós-operatório. Provavelmente, a **IL-2** não participa da resposta pleural a este tipo de agressão, ou só se manifesta mais tardiamente (após 48 horas). De fato, Stites e colaboradores, referem que a **IL-2** aparece em fases mais tardias do processo inflamatório (38). Talvez, ela tenha mais relação com a perpetuação do derrame pleural pós revascularização (45).

Desde o primeiro momento da análise (2 horas), a **IL-6** manteve-se elevada apresentando uma redução significativa após 48 horas. Por ser uma citocina com funções predominantemente antiinflamatórias, seria esperado que sua ascensão fosse mais tardia. A observação de níveis elevados poderia ser atribuída a uma tentativa de conter a ativação inflamatória sistêmica e pleural, induzida pelo procedimento cirúrgico, ou apenas um reflexo da liberação sistêmica desta citocina, pois a **IL-6** tem sido referida como a citocina mais presente nas coletas de sangue no peri-operatório (16),(18),(35). É possível, que sua presença esteja ligada ao bloqueio da produção de **TNF- α** (46), sem que, no entanto, interfira com a mesma intensidade no comportamento da **IL-1 β** . Provavelmente a **IL-6**, neste tipo de derrame, poderia estar exercendo um papel antiinflamatório às custas de sua capacidade de induzir a síntese de glicocorticóides (47), de reduzir a síntese das demais citocinas pró-inflamatórias (46), tendo pouco efeito sobre a liberação das citocinas anti-inflamatórias (47).

A **IL-8** é uma citocina pró-inflamatória envolvida na mobilização de polimorfonucleados neutrófilos, secretada principalmente por células endoteliais, epiteliais, macrófagos e células mesoteliais (49). Os níveis mais elevados de **IL-8**, quando confrontados com os dos transudatos, refletem sua mobilização neste tipo de derrame pleural. Provavelmente, sua secreção seja a partir da célula mesotelial pleural ativada, como resposta ao manuseio operatório da cavidade. Como os níveis se mantiveram semelhantes nos três intervalos, é de se supor uma participação prolongada desta citocina e que ela seja a responsável pela manutenção dos neutrófilos no espaço pleural.

A célula mesotelial pleural, assim como todas as células nucleadas, têm a capacidade de liberar **TGF- β** , que tanto participa na regulação da inflamação como na proliferação celular pleural (52). O **TGF- β** é uma citocina com ações biológicas anti-inflamatórias, fibro-proliferativas e é um forte indutor da formação de derrame pleural (53). Inicialmente, na primeiras duas horas do pós-operatório, os níveis do **TGF- β** já estavam elevados, com redução progressiva, sendo que ao final de 48 horas, apresentava valores similares aos dos transudatos. É possível, que sua ação antiinflamatória não seja tão decisiva neste tipo de derrame, com atenuação dos estímulos sobre a célula mesotelial pleural e diminuição progressiva da liberação do **TGF- β** por estas células (52). Este comportamento com níveis decrescentes pode reduzir qualquer tendência proliferativa local desta citocina, assim como justificar os menores volumes observados nos derrames precoces pós revascularização miocárdica (43).

Apesar de não estarem totalmente definidos os caminhos que culminam com o desenvolvimento do derrame pleural pós-revascularização do miocárdio, é fato que o **TGF- β** funciona como mecanismo de gatilho para de liberação de **VEGF** por parte da célula mesotelial pleural e que esta citocina exerce um fator preponderante na produção de líquido, não apenas por angiogênese, como pela alteração da

permeabilidade vascular, favorecendo o extravazamento de líquido (53). Em conformidade com os descrito por Lee e colaboradores (53), em nosso estudo observamos que, o **VEGF** teve uma curva ascendente, com estabilização após 48 horas, provavelmente estimulada pelos altos níveis de **TGF- β** vistos após 2 horas da cirurgia.

Não existem trabalhos confrontando o comportamento das citocinas no líquido pleural em ambos os sexos, embora Korhola (42) tenha constatado que os homens parecem apresentar maior tendência a espessamentos e calcificações pleurais, sugerindo maior expressão de **TGF- β** . Em nosso estudo, observamos que a **IL-6** e o **TGF- β** apresentaram níveis significativamente mais elevados no sexo feminino nas primeiras duas horas, igualando-se a partir das 24 horas. Não foi possível determinar se este resultado foi achado aleatório, uma vez que o número da pacientes do sexo feminino foi muito pequeno (6 pacientes), ou se realmente, existe alguma diferença na resposta inflamatória do sexo feminino.

A idade é um fator associado a redução da resposta imune, com maior tendência a complicações no peri-operatório (54). As citocinas inflamatórias mobilizadas pela intervenção cirúrgica, também poderiam colaborar para o desenvolvimento de complicações mais graves em pacientes mais idosos (6). Constatamos que todas as citocinas tiveram comportamento similar em todas as faixas etárias, sugerindo que o envelhecimento não interfere na liberação das citocinas, nem em seu perfil temporal. Ou seja, a idade não parece estar condicionada a maiores ou menores repercussões inflamatórias sobre a cavidade pleural.

Nenhuma das citocinas avaliadas no líquido pleural apresentou qualquer tipo de relação com as complicações apresentadas pelos pacientes. Isto nos permite sugerir que as complicações, pelo menos as de pequeno porte, não interferem no perfil inflamatório agudo pleural no pós-operatório. No entanto, é importante

ressaltar que esta sugestão deve ser interpretada com cautela, pois o número de pacientes que apresentaram complicações foi pequeno, e estes resultados precisam ser reavaliados em outras populações, com diferentes graus de gravidade de complicações.

O estudo do processo inflamatório, após a cirurgia de revascularização do miocárdio, tem sido realizado quase que exclusivamente através de análises séricas das citocinas, baseado no fato do miocárdio, tanto na sua situação prévia como na agressão cirúrgica, liberar citocinas inflamatórias (17),(35). Apesar da CEC ser um fator importante na liberação de citocinas pró-inflamatórias (11), (12), (18),(35) e a hemofiltração do sangue *pós-shunt* cárdio-pulmonar diminuir a concentração de elementos inflamatórios nos pulmões (37),(54), permanece a falta de esclarecimento com relação ao mecanismo do envolvimento pleural neste tipo de cirurgia (5).

Dentre as citocinas estudadas, apenas o **VEGF** apresentou uma redução significativa após duas horas da cirurgia no grupo que utilizou a circulação extra-corpórea. Este achado sugere que o VEGF pode estar sendo retirado, ou inibido, pela CEC, pois a diferença desaparece após 24 horas, quando os níveis pleurais de VEGF se igualam. O comportamento semelhante observado nas demais citocinas estudadas, sugere que a utilização da CEC não interfere de forma significativa na liberação de citocinas, no processo inflamatório pleural.

Outro fator que poderia influenciar na intensidade e no perfil da resposta inflamatória pleural é o tempo de cirurgia. Nossos resultados mostram uma similaridade de comportamento das citocinas estudadas tanto nas cirurgias com duração inferior a 345 minutos (5 horas e 45 minutos) quanto nas cirurgias com duração superior a 420 minutos (7 horas), sugerindo que nem a intensidade do processo inflamatório agudo, nem o perfil de liberação das citocinas sofrem interferência do tempo de duração da cirurgia.

Vários trabalhos têm demonstrado não existir uma correlação entre valores das citocinas séricas e do líquido pleural (35),(56), enfraquecendo a tendência da obrigatoriedade comparativa entre esses dois compartimentos. É possível, que o conhecimento do comportamento local das citocinas possa vir a torná-las verdadeiro marcador não só de morbidade, como de prognóstico (56).

Novas estratégias cirúrgicas têm como finalidade não apenas otimizar o procedimento de revascularização como interferir na tendência às complicações, de modo a reduzir a agressão cardio-pulmonar e o processo inflamatório (7), (9), (13).

O comportamento do tecido pleural no desenvolvimento do derrame pós-revascularização do miocárdio seguido de uma espécie de calma e reabsorção progressiva do mesmo, poderia estar ligado a modulação dos níveis de citocinas, em especial a IL-1 β , IL-8, VEGF e TGF- β , assim como pela mobilização de outras citocinas não avaliadas neste estudo, tais como IL-4 e IL-10 que, ao lado da IL-6, contribuiriam para o retorno do tecido pleural a uma situação de normalidade.

8 CONCLUSÕES

As principais conclusões deste trabalho são a caracterização da liberação das citocinas na resposta inflamatória aguda pleural pós revascularização miocárdica e a identificação de fatores que modulam esta resposta inflamatória.

A resposta inflamatória pleural aguda após a cirurgia de revascularização miocárdica caracteriza-se pela mobilização de IL-1 β , IL-6, IL-8, TGF- β e VEGF e parece não envolver a IL-2 e o TNF α , ao menos nas primeiras 48 horas.

A aparente relação da elevação dos valores de IL-6 e TGF- β com o sexo feminino requer a avaliação de um número maior de casos.

A utilização da CEC pode interferir na liberação do VEGF, mas não parece relacionar-se com o comportamento das demais citocinas no DP pós-revascularização miocárdica

A idade, o tempo de duração da cirurgia e a presença de complicações não parecem interferir na mobilização destas citocinas no líquido pleural.

Apesar das conclusões apresentadas, talvez, a expressão mais fiel do perfil inflamatório do líquido pleural pós-revascularização do miocárdio esteja nos derrames do hemitórax contra-lateral ao lado manipulado, habitualmente menos invadido tanto pela técnica cirúrgica como pela colocação de drenos. Contudo, o acesso a amostras de líquido pleural do hemitórax contra-lateral é mais complicado e esbarra em aspectos éticos importantes.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - **Vargas FS, Vezhimi KK, Jatene FF et al** – Acute pleuropulmonary complications detected by computed tomography following myocardial revascularization. Rev Hosp Clin Fac Med São Paulo. 2002;57:135-42
- 2 - **Gilbert TB, Baruas GM, Sequeira AJ** – impact of pleurotomy, continuous positive airway pressure and fluid balance during cardiopulmonary bypass on lung mechanisms and oxygenation. J Cardiothorac Vasc Anesth. 1996;10:844-9
- 3 - **Ishikawa S, Ohtaki A, Takahashi T et al** - PEEP therapy for patients with pleurotomy during coronary artery bypass. J Card Surg 2000;15:175-8
- 4 - **Lee YC, Vaz MAC, Ely KA et al** – Symptomatic persistent post-coronary artery bypass graft pleural effusion requiring treatment-clinical and histologic features. Chest 2001;119:795-800
- 5 - **Areno JP, McCarteney JP, Eggerstedt J et al** – Persistent pleural effusions following coronary bypass surgery. Chest 1998;114:311-4
- 6 - **Hart JC, Puskas JD, Sabik JF** – Off-pump coronary revascularization:current state of the art. Semin Thorac Cardiovasc Surg 2002;14:70-81
- 7 - **Hishida M, Kobayashi J, Tagusari O et al** – Perioperative advantages of off-pump coronary artery bypass grafting. Circ J 2002;66:795-9
- 8 - **Zamvar VY, Khan NU, Madhavan A et al** – Clinical outcome in coronary artery bypass graft surgery: comparison of off-pump and on-pump techniques. Heart Surg Forum 2002;5:109-13
- 9 - **Al-Ruzzeh S, George S, Bustami M** -The early clinical and angiographic outcome on sequential coronary artery bypass grafting with the off-pump technique. J Thorac cardiovasc surg 2002;123:525-30

- 10 - Bonacchi M, Prifti E, Giunti G** – Respiratory dysfunction after coronary artery bypass grafting employing bilateral internal mammary arteries: the influence of intact pleura . Eur J Cardiothorac Surg 2001;19:827-33
- 11 - Wendel HP, Ekstein FS, Fink E et al.** Increased coagulation and bradykinin-release in shed pleural blood cardiac surgery. Immunopharmacology 1999;44:119-22
- 12 - Butler J, Parker D, Pillar R et al** – Effect of cardiopulmonary bypass on systemic release of neutrophil elastase and tumor necrosis factor. J Thorac Cardiovasc Surg 1993;105:25-30
- 13 - Detter C, Reichenspurner H, Boehm DH** – Minimally invasive direct coronary artery bypass grafting (MIDCAB) and off-pump coronary artery bypass grafting (OPCAB): two techniques for beating heart surgery. Heart Surg Forum 2002;5:157-62
- 14 - Ishida M, Kobayashi J, Tagusari O** - Perioperative advantages of off-pump coronary artery bypass grafting . Circ J 2002;66:795-9
- 15 - Vargas FS, Cukier A, Hueb W et al** – Relationship between pleural effusions and pericardial involvement after myocardial revascularization. Chest 1994;105:1738-52
- 16 - Wan S, Marchant A, Desemet JM** – Human cytokine responses to cardiac transplantation and coronary artery bypass grafting. J Thorac Cardiovasc Surg 1996; 111:469-77
- 17 - Kukiela GL, Smith CW, Manning AM et al** – Induction of interleukin-6 synthesis in the myocardium. Potential role in postreperfusion inflammatory injury. Circulation 1995;92:1866-75
- 18 - Gaudino M, Nasso G, Zamparelli R et al** – Inflammatory and fibrinolytic activation after coronary artery bypass with extracorporeal circulation. Ital Heart J 2002;3:646-51

- 19 - Kroegel C, Anthony VB** – Immunobiology of pleural inflammation: potential implications for pathogenesis, diagnosis and therapy. *Eur Respir J* 1997;10:2411-18
- 20 - Peng MJ, Vargas FS, Cukier A et al** – Postoperative pleural changes after coronary revascularization. Comparison between saphenous vein and internal mammary artery grafting. *Chest* 1992;101:327-30
- 21 - Light RW** – Pleural effusions after coronary artery bypass graft surgery. *Curr Opin Pulm Med* 2002;8:308-11
- 22 - Light RW, Rogers JT, Cheng D et al** – Large pleural effusions after coronary artery bypassing grafting. *Cardiovascular Surgery Associates*. 1999;130:891-6
- 23 - Payne M, Magovern G, Benckart DH et al** – Left effusion after coronary artery bypass decreases with a supplemental pleural drain. *Ann Thorac Surg* 2002;73:149-52
- 24 - Sadikot RT, Rogers JT, Cheng DS** – Pleural fluid characteristics of patients with symptomatic pleural effusion post-coronary artery bypass surgery. *Arch Intern Med* 2000;160:2665-8
- 25 - Rodriguez RM, Moyers JP, Rogers JT** – Prevalence and clinical course of pleural effusions at 30 days post-coronary artery bypass surgery. *Chest* 1999;116:282S
- 26 - Kim S, Sahn S** – Post-cardiac injury syndrome: Immunologic pleural fluid analyses. *Chest* 1996;109:570-2
- 27 - Kocazeybek B, Calyk MK, Babacan F** – Immunological approach to post-pericardiotomy syndrome occurrence and its relation with autoimmunity. *Acta Chir Belg* 1998;98:203-6
- 28 - Kelly BM, Nicholas JJ, Chhablani R, Kavinsky CJ** – The postpericardiotomy syndrome as a cause of pleurisy in rehabilitation patients. *Arch Phys Med Rehabil* 2000;81:517-8

- 29 - Charitos CE, Kontoyannis DA, Nanas JN** – Post-pericardiotomy syndrome during intensive immunosuppression after cardiac transplantation. *Acta Cardiol* 2000;55:95-7
- 30 - Khan AH** – Cardiac injury syndromes. *Clin Cardiol* 1992;15:67-72
- 31- Smith JA, Goldstein J, Oyer PE** - Chylothorax complicating coronary artery bypass grafting. *J Cardiovasc Surg* 1994;35:307-9
- 32- Garcia-Pachon E, Fernandez LC, Lopez-Azorin F et al** – Pseudochylothorax in pleural effusion due to coronary artery bypass surgery . *Eur Respir J* 1999;13:1487-8
- 33 - Aukrust P, Ueland T, Lien E et al** – Cytokine network in congestive heart failure secondary to ischemic or idiopathic by dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 1999;83:376-82
- 34 - Jeron A , Straub RH, Kaiser T et al** – Systemic immunosuppression fails to suppress cardiac cytokine induction in pressure overload hypertrophy in rats. *Immunobiology* 2002;205:51-60
- 35 - Duval EL, Kavelaars A, Veenhuizen L et al** – Pro-and anti-inflammatory cytokine patterns during and after cardiac surgery in young children. *Eur J Pediatric* 1999;158:387-93
- 36 - Casey WF, Hauser GJ, Hannallah RS et al** – Circulating endotoxin and tumor necrosis factor during pediatric cardiac surgery. *Crit Care Med* 1992;20:1090-6
- 37 - Millar AB, Armstrong L, Van der Linden J et al** - Cytokine production and hemofiltration in children undergoing cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1993;56:1499-502
- 38 – Stites DP, Terr AI, Parslow TG.** - *Imunologia Médica*. 9ª ed. 2000. Ed. Guanabara – Koogan, Rio de Janeiro

- 39 – Light RW, Macgregor MI, Luchsinger PC et al** – Pleural effusions: the diagnostic separation of transudates and exsudates. Ann Intern Med. 1072;77:507-13
- 40 – Winer BJ** – Statistical Principles in Experimental Design. 2nd edition, McGraw-Hill Book C ,New York, 1971
- 41 - Diggle PJ, Liang K, Zeger SL** – Analysis of Longitudinal Data. Oxford Science Publications, New York, 1994
- 42 – Korhola O, Hiltunen,A, Karjalainen et al** – Association between pleural plaques and coronary heart disease. Scand J Work Environ Health 2001;27:154-5
- 43 – Vargas FS, Teixeira LR, Marchi E** – Derrame Pleural. 1^a edição. 2003. Editora Roca, São Paulo
- 44 - Silva-Mejias C, Gamboa-Antinolo F, Lopez-Cortes LF et al** - Interleukin-1 beta in pleural fluids of different etiologies: Its role as inflammatory mediator in empyema. Chest 1995;108:942-945
- 45 – Ravand A, Negrier S, Lakdja F et al** – Adverse effects of interleukin-2. Bull Cancer 1991;78:989-1005
- 46 – Xirouchaki MD, Tzanakis N, Bouros D et al** – Diagnostic value of Interleukin-1a, interleukin-6 and tumour necrosis factor in pleural effusions. Chest 2002;121;815-20
- 47 - Barnes PF, Fong SJ, Brennan PJ et al** - Local Production of tumor necrosis factor and IFN-gama in tuberculous pleuritis. J Immunol 1989;142:1114-9
- 48 - Kim YC, Park KO, Bom HS et al** - Combinig ADA, protein and IFN-gama best allows discrimination between tuberculous and malignant pleural effusion. Korean J Intern Med 1997;12:225-31
- 49 - Park JS, Kim YS, Jee YK et al** - Interleukin-8 production in tuberculous pleurisy: Role of mesothelial cells stimulatated by cytokine network involving tumour necrosis factor-a and interleukin-1b. Scand J Immunol 2003;57:463-9

- 50 – Anthony VB, Godbey SW, Kunkel SI et al** – Pleural mesothelial cell expression of C-C monocyte chemotatic peptide (MCP-1) and C-X-C interleukin-8 (IL-8). *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995;12:581-8
- 51 – Xing Z, Grauldie J, Cox G et al** – IL-6 is an anti-inflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest* 1998;101:311-20
- 52 – Opal SM, De Pablo VA** – Anti-inflammatory cytokines. *Chest* 2000;117:1162-72
- 53 – Gary Lee YC, Lane KB** – The many faces of transforming growth factor-beta in pleural diseases. *Curr Opin Pulm Med* 2001;7:173-9
- 54 – Clowgh RA, Leanitt BJ, Plume SK et al** – The effect of comorbid illness or mortality outcomes in cardiac surgery. *Arch Surg* 2002;137:428-32
- 55 – Cheng D, Rodrigues RM, Perkett A et al** – Vascular endothelial growth factor. *Chest* 1999;116:760-5
- 56 - Porter JM** – Cytokines and pleural drainage fluid: do local levels make a difference? *Chest* 1999;115:1489-90