Artigo Original
Original Article

António MS Chibante[1]
Marcelo Alexandre C Vaz[2]
Francisco Vargas Suso[2]

Papel das citocinas proliferativas TGF-β e VEGF no derrame pleural pós-revascularização do miocárdio

The proliferative cytokines TGF-β and VEGF in pleural effusions post-coronary artery bypass graft

Recebido para publicação/*received for publication*: 05.11.11
Aceite para publicação/*accepted for publication*: 06.04.26

Resumo

A cirurgia de revascularização do miocárdio envolve o acometimento, tanto do pericárdio como da pleura, conduzindo ao favorecimento de processos inflamatórios responsáveis pelo desenvolvimento de derrames nestes compartimentos.

Objectivo: Estudar o comportamento das citocinas proliferativas TGF-β (factor beta de transformação do crescimento) e VEGF (factor de crescimento do endotélio vascular) nos líquidos de 16 transudatos e de 43 derrames pleurais de doentes submetidos a cirurgias de revascularização do miocárdio provenientes do Instituto de Coração e do Serviço de Pneumologia da Universidade do São Paulo nos intervalos de 2, 24 e 48 horas de pós-operatório.

Abstract

Coronary artery bypass graft (CABG) surgeries can impact on the pericardium and pleural space, leading to inflammation which can cause effusion.

Aim: To study the role of the proliferative cytokines TGF-β and VEGF in the fluids of 16 transudates and 43 pleural effusions of patients who underwent CABG at the Heart Unit and Pulmonology Unit of the University Hospital of São Paulo. Levels of cytokines were assessed 2, 24 and 48 hours post-surgery.

Results: The pleural effusion after CABG is an exsudative mobilizer of TGF-β and VEGF cytokines immediately after surgery. The TGF-β concentrations were elevated 2 hours after surgery but started to fall soon after, reaching transudate levels after 48 hours.

[1] Serviço de Cardiopneumologia, Hospital Gaffrée-Guinle. Univesidade do Rio de Janeiro/*Cardiopulmonology Unit, Hospital Gaffrée-Guinle. Universidade do Rio de Janeiro*

[2] Serviço de Pneumologia, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo/*Pulmonolgy Unit, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo*

Correspondência/*Correspondence to*: António M S Chibante, Centro de Investigações Pneumológicas
RJ, Rua Sorocaba, 477 sala 601
Rio de Janeiro, Brasil, Cep: 22.271-110
E-mail: chibante@domain.com.br

Resultados: O derrame pleural pós-revascularização do miocárdio é um exsudato mobilizador de TGF-β e VEGF no pós-operatório imediato. Os níveis de TGF-β apresentam-se elevados nas primeiras 2 horas para caírem progressivamente até se aproximarem dos valores dos transudatos ao fim de 48 horas, enquanto o VEGF se inicia com níveis elevados já nas primeiras 2 horas com tendência a aumento pelo menos até 48 horas de pós-operatório.
Conclusões: O TGF-β parece comportar-se como elemento gatilho sobre a célula mesotelial pleural para a liberação de VEGF no desenvolvimento de derrame pleural nas cirurgias de revascularização do miocárdio.

Rev Port Pneumol 2006; XII (4): 359-367

Palavras-chave: Inflamação, citocinas, derrame pleural, revascularização do miocárdio.

VEGF levels were high in the first 2 hours post surgery and tended to maintain the same concentrations for at least 48 hours after surgery.
Conclusions: Based on the results obtained, TGF-β is a cytokine that seems to work as a trigger, leading the pleural mesothelial cell to express VEGF a cause of pleural effusion in CABG surgeries.

Rev Port Pneumol 2006; XII (4): 359-367

Key-words: Inflammation, cytokines, pleural effusions, coronary artery bypass grafting.

Introdução

O mecanismo desencadeante do acúmulo de líquido na cavidade pleural ainda não foi esclarecido

O binómio *revascularização do miocárdio/derrame pleural* permanece dentro do terreno das especulações, uma vez que o mecanismo desencadeante do acúmulo de líquido na cavidade pleural ainda não foi esclarecido[1,2,3]. Existem poucos trabalhos visando aferir o comportamento inflamatório neste tipo de líquido; no entanto, a sua identificação poderia favorecer a compreensão de alguns mecanismos reacionais locais[4,5,6,7]. As citocinas são proteínas que uma vez secretadas tanto podem ser indutoras de fenómenos inflamatórios como induzidas dentro desses fenómenos[8].
A mobilização de elementos inflamatórios após agressão do pericárdio é um desafio para a avaliação dos mecanismos de reacção da pleura, uma vez que a célula mesotelial tem grande poder de resposta aos estímulos que sobre ela incidem[9]. É uma célula bastan-

Introduction

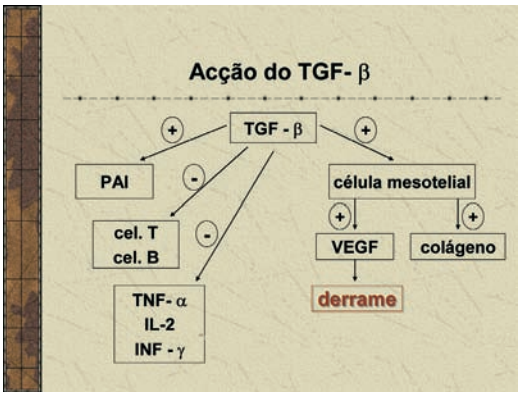
The coronary artery bypass graft / pleural effusion conundrum remains within the realms of speculation seeing as the mechanism which releases the accumulation of fluid in the pleural cavity has not yet been clearly identified[1,2,3]. There are only a few studies which look into the inflammatory properties of this type of fluid but identifying it may aid in understanding some local reaction mechanisms[4,5,6,7]. Cytokines are proteins which once secreted can just as easily induce inflammatory phenomena as they can be induced into these phenomena[8].
Activation of inflammatory mediators following aggression of the pericardium is a challenge for the evaluation of the pleural reaction mechanisms, as the mesothelial cell has a great capacity of response to stimulus given to it[9]. This cell is very differentia-

te diferenciada, não apenas devido às suas particularidades de recuperação ou degeneração neoplásica, mas, também, pela múltipla capacidade funcional, que tanto pode envolver um papel imunorregulador como fagocítico[10]. A capacidade de resposta desta célula é muito intensa e mesmo na ocorrência de transtornos contra-laterais podem ser observadas modificações qualitativas e quantitativas subsequentes, no lado não atingido[11]. A facilidade de produção de citocinas pela célula pleural tem sido exaustivamente comprovada e depende da qualidade do estímulo que sobre ela incide, demonstrando um potencial intensamente diversificado e rico em respostas imunomoduladoras[5,8,12]. Células mesoteliais na presença do factor beta de transformação do crescimento (TGF-β) são capazes de produzir factor de crescimento do endotélio vascular (VEGF), citocina ligada não só à angiogénese, mas também a fenestrações na parede vascular, favorecendo, deste modo, o acúmulo de líquido no espaço pleural[13].

O TGF-β tem acção antinflamatória e proliferativa (fibrose/espessamentos/neoplasias),

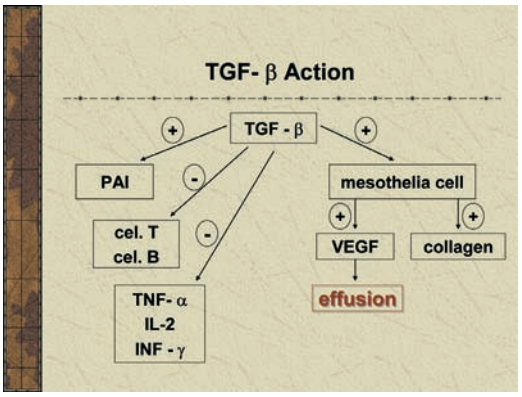
ted not only in the peculiarity of its neoplastic recuperation and degeneration but also in its multiple functional capacity. This latter may involve it playing an immunoregulatoy role as a phagocyte[10]. The response capacity of this cell is very intense and with contralateral stimulation, qualitative and quantitative modifications can be seen in the non-affected side[11]. The pleural cell's ability to produce cytokines has long been proven and depends on the quality of stimulus on it which has shown a strongly diversified and rich potential to induce immunomodulated responses[5,8,12]. In the presence of transforming growth factor (TGF-β), mesothelial cells are capable of producing vascular endothelial growth factor (VEGF). This cytokine is not only linked to angiogenesis but also fenestrations of the vascular walls. This promotes the build up of fluid in the pleural space[13].

TGF-β has anti-inflammatory and anti-proliferative properties (fibrosis/thickening/neoplasy). It stimulates the mesothelial cell and has a short half-life of around 5 mi-



PAI – Inibidor do ativador do plasminogênio; **TNF-α** – Factor alfa de necrose tumoral; **IL-2** – Interleucina 2; **INF-γ** – Interferão gama

Fig. 1 – Mecanismos de acção do TGF-β



PAI – Plasminogen Activator Inhibitor; **TNF-α** – Tumor necrosis factor-alpha; **IL-2** – Interleukin 2; **INF-γ** – Interferon gamma

Fig. 1 – TGF-β action mechanisms

O VEGF tem elevado potencial angiogenético e favorece o crescimento tecidual e a proliferação neoplásica

papel estimulante sobre a célula mesotelial e apresenta meia-vida curta, cerca de 5 minutos[8]. Tem a capacidade de desactivar leucócitos e macrófagos, sustendo, assim, determinadas correntes inflamatórias[8,14,15] (Fig. 1). O VEGF tem elevado potencial angiogenético e favorece o crescimento tecidual e a proliferação neoplásica[16,17,18,19]. Devido às neoformações vasculares, tendem ao desenvolvimento de fenestrações com aumento das permeabilidade e produção de derrame pleural[20,21,22] (Fig. 2).

Objectivo

O objectivo deste estudo é avaliar o comportamento das citocinas proliferativas TGF-β e VEGF no processo inflamatório do líquido dos derrames pleurais no pós-operatório imediato de cirurgias de revascularização do miocárdio

Casuística e método

Foram estudados os líquidos de 16 transudatos e de 43 derrames pleurais pós-revascularização do miocárdio de doentes provenientes do Instituto do Coração e do Serviço de Pneumologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Uni-

nutes[8]. It is capable of deactivating leucocytes and macrophages, thus aiding specific inflammatory currents[8,14,15]. (Fig. 1)
VEGF has a great angiogenetic potential and promotes tissue growth and neoplasia proliferation[16,17,18,19]. Due to vascular neoformations it also promotes the development of fenestrations with increased permeability and production of pleural effusion[20,21,22]. (Fig. 2)

Aim

This study aims to evaluate the role of the cytokine proliferatives TGF-β and VEGF in the inflammatory process of the pleural effusion fluid immediately following coronary artery bypass graft surgery.

Material and methods

The fluid of 16 transudates and 43 pleural effusions that appeared following coronary artery bypass graft surgery of patients from the Cardiac Unit and the Pulmonology Unit of the Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo was studied. Control criteria were the levels of TGF-β and VEGF found in the transudates (control group) and this was contrasted

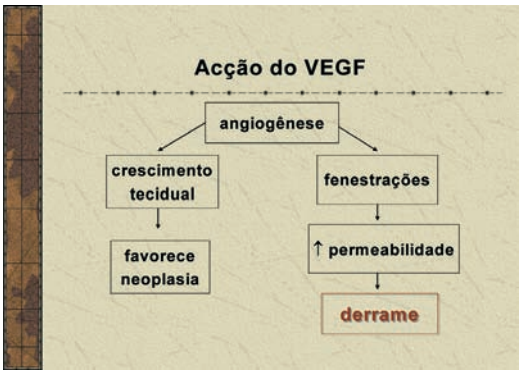


Fig. 2 – Mecanismos de acção do VEGF

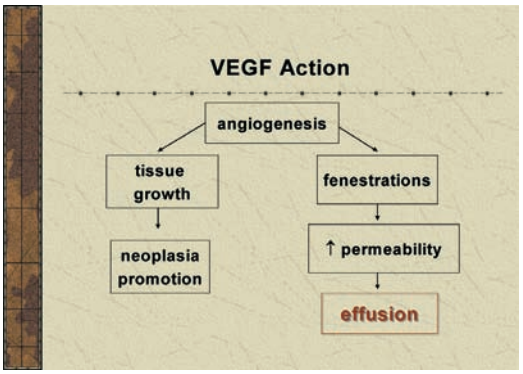


Fig. 2 – VEGF action mechanisms

versidade de São Paulo. Foram assumidos como critério de normalidade os níveis de TGF-β e de VEGF doseados nos transudatos (grupo-controlo) e confrontados com as dosagens seriadas nos derrames de doentes submetidos a cirurgias de revascularização do miocárdio.

O grupo submetido à cirurgia cardíaca foi avaliado em quatro momentos diferentes, sendo o primeiro no pré-operatório (avaliação de critérios de inclusão e exclusão e consentimento pós-informado); a segunda, terceira e quarta avaliações, respectivamente após 2, 24 e 48 horas de finalização da cirurgia (recolha de líquido pleural). Os critérios de inclusão e exclusão foram definidos para evitar as interferências de outras situações sobre o processo inflamatório pleural.

A dosagem das citocinas foi realizada utilizando-se o método ELISA (*enzyme-linked immunoabsorbent assay*) de recolha (R&D System, Inc., Minneapolis, USA) e realizada no Laboratório de Pleura do Instituto do Coração – HC-FMUSP.

Na análise estatística, os dados contínuos foram descritos pelos valores mínimos e máximos, mediana, média, desvio e erro-padrão, enquanto as citocinas ao longo do tempo no pós-operatório foram comparadas através da análise de variância para medidas repetidas. O nível de significância estabelecido para as análises foi de 5%.

Resultados

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=0,376) (Quadro I, Fig. 3).

with the serried levels in the effusions of patients who had undergone coronary artery bypass graft surgery.

The cardiac surgery group was assessed at four separate points. The first was pre-surgery (evaluation of the inclusion and exclusion criteria and informed consent). The second, third and fourth evaluations came 2, 24 and 48 hours after surgery (harvest of pleural fluid). Inclusion and exclusion criteria were drawn up to avoid the interference of other events on the pleural inflammation process.

The level of the cytokines was assessed using the ELISA (*enzyme-linked immunoabsorbent assay*) method of capture (R&D System Inc., Minneapolis, USA) and carried out at the Pleural Laboratory of the Cardiac Unit – HC-FMUSP.

In the statistical breakdown, the continuous data were described using minimum and maximum levels, median, mean, standard and error deviation. The post-surgery cytokines were compared using a variance for repeated measurements. The level of significance set for the analysis was 5%.

Results

The TGF-β was high in contrast with the levels found in the transudates at the first interval (2 hours, p<0.001) and fell progressively with time. It returned to levels considered normal (transudates) after 48 hours (p=0.376). (Table I/Fig. 3)

In comparison with the transudate levels, the VEGF was high from the first interval (2 hours; p<0.001) and remained stable for 48 hours. After that it seemed to decline to transudate levels (p=0.0724). (Table II/Fig. 4)

O TGF-β apresentou-se elevado quando confrontado com os valores dos transudatos

Quadro I

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

Table I

Group	Evaluation	n	TGF	ln(TGF)
Surgery	2 h	43	486 ± 312	5.941 ± 0.117
	24 h	43	273 ± 255	5.205 ± 0.137
	48 h	43	136 ± 148	4.645 ± 0.095
Transudates	--	16	138 ± 69	4.805 ± 0.152

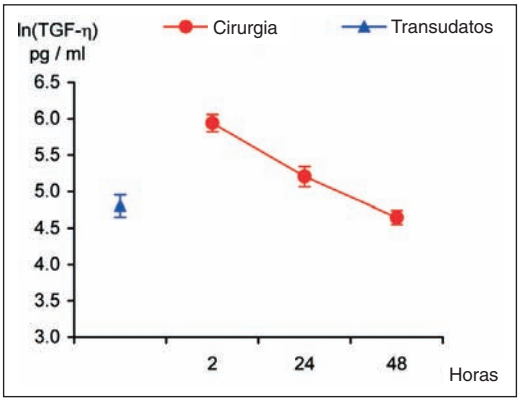


Fig. 3 – Gráfico da análise comparativa entre as medidas de TGF-β observadas pós-cirurgia e os transudatos

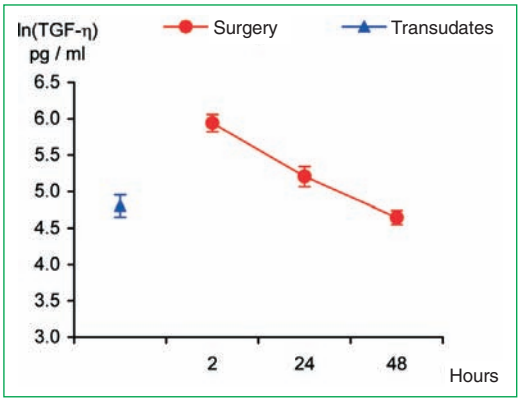


Fig. 3 – Comparative analysis of the TGF-β medians observed post-surgery and the transudates

Comparado com os valores dos transudatos, o VEGF mostrou-se elevado desde o primeiro intervalo (2 horas; p<0,001), mantendo-se estável durante 48 horas, a partir das quais parece iniciar-se o decaimento de seus níveis (p=0,0724) (Quadro II, Fig. 4).

Quadro II

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

Table II

Group	Evaluation	n	VEGF	ln (VEGF)
Surgery	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
Transudates	--	16	268 ± 224	5,132 ± 0.294

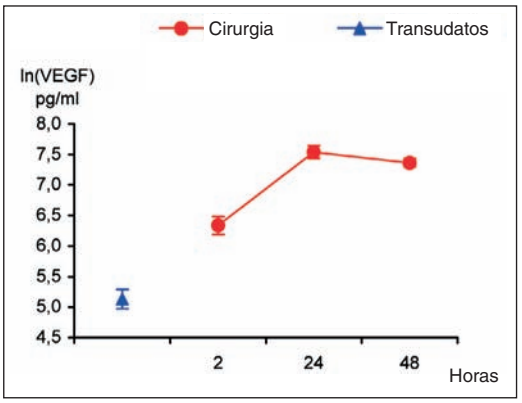


Fig. 4 – Gráfico da análise comparativa entre as medidas de VEGF observadas pós-cirurgia e os transudatos

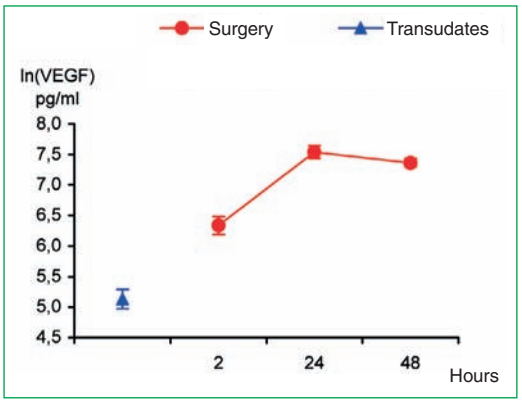


Fig. 4 – Comparative analysis of the VEGF medians observed post-surgery and the transudates

Discussão

O papel das citocinas proliferativas TGF-β e VEGF parece encontrar-se condicionado, entre outras situações, pelo desenvolvimento de derrames pleurais, tendo a primeira uma acção sinalizadora sobre a célula mesotelial com subsequente libertação de VEGF e acúmulo de líquido na cavidade[13]. Poucos estudos têm sido direccionados ao comportamento destas proteínas nos der-

Discussion

The role of the proliferative cytokines TGF-β and VEGF seems to condition, among other things, the development of pleural effusions. TGF-β acts as a trigger on the mesothelial cell with subsequent release of VEGF and accumulation of fluid in the pleural cavity[13]. Only a few studies have been made into the role of these proteins on post coronary artery

rames pleurais pós-revascularização do miocárdio; todavia, os resultados por nós encontrados parecem confirmar o papel do TGF-β como mecanismo desencadeador para a expressão indirecta do VEGF pela célula mesotelial que, uma vez estimulada, continuaria a libertar e a manter níveis elevados desta citocina, apesar da queda progressiva de TGF-β, pelo menos nas primeiras 48 horas de pós-operatório[15,22,23].

A discreta tendência ao decaimento insidioso de VEGF após 48 horas da cirurgia contrasta com a vigorosa queda dos níveis de TGF-β que, ao final deste período, atinge valores semelhantes aos dos transudatos, deixando, aparentemente, de continuar a estimular a célula mesotelial. Isto reforçaria o mecanismo desencadeador do TGF-β que, com a sua meia-vida curta, deixaria dali para a frente, sem a sua presença, mecanismos celulares mesoteliais direccionados para a expressão mantida de VEGF.

Conclusões

O derrame pleural pós-revascularização do miocárdio apresenta-se como exsudato mobilizador de citocinas TGF-β e VEGF dentro do processo inflamatório envolvido no seu desenvolvimento. O TGF-β parece actuar como mecanismo desencadeador sobre a célula mesotelial pleural, induzindo-a à expressão de VEGF e subsequente derrame. Nas primeiras 48 horas pós-revascularização do miocárdio, a concentração de TGF-β decresce flagrantemente, atingindo níveis semelhantes aos dos transudatos, enquanto a VEGF persiste em patamares elevados reforçando seu papel de favorecimento e manutenção de líquido na cavidade pleural neste tipo de cirurgia.

bypass graft pleural effusions. The results we found seem to confirm the role of TGF-β as a trigger for the indirect expression of VEGF on the mesothelia cell. Once stimulated, this continues to release and maintain high levels of these cytokines despite the progressive drop in TGF-β, at least for the first 48 hours following surgery[15,22,23].

The discrete tendency for VEGF to taper off after 48 hours following surgery contrasts with the sharp drop in the TGF-β levels. At the end of this period, these had levels similar to those of the transudates and apparently seem to stop stimulating the mesothelia cell. This strengthens the "trigger mechanism" idea of the TGF-β which, with its short half-life, leaves in its wake mesothelial cell mechanisms to maintain the continued expression of VEGF.

Conclusions

Post coronary artery bypass graft pleural effusion is an exsudate mobilizer of the cytokine TGF-β and VEGF within the inflammatory process involved in its development. TGF-β seems to act as a trigger on the pleural mesothelial cell, inducing in it the expression of VEGF and subsequent effusion. In the first 48 hours following the coronary artery bypass graft, the concentration of TGF-β decreases sharply, reaching levels similar to those found in the transudates while VEGF continues high, reinforcing its role of promoting and maintaining the liquid in the pleural cavity in this type of surgery.

Bibliografia/Bibliography

1. Vargas FS, Cukier A, Hueb W, Teixeira LR, Light RW. Relationship between pleural effusions and pericardial involvement after myocardial revascularization. Chest 1994; 105:1738-52.
2. Light RW. Pleural effusions after coronary artery bypass graft surgery. Curr Opin Pulm Med 2002; 8:308-11.
3. Vargas FS, Vezhimi KK, Jatene FF, Terra-Filho M, Hueb W, Cukier A, Light RW. Acute pleuropulmonary complications detected by computed tomography following myocardial revascularization. Rev Hosp Clin Fac Med São Paulo. 2002; 57:135-42.
4. Dinarello CA. Proinflammatory Cytokines. Chest 2000; 118:503-8.
5. Kroegel C, Anthony VB. Immunobiology of pleural inflammation: potential implications for pathogenesis, diagnosis and therapy. Eur Respir J 1997; 10:2411-18.
6. Areno JP, McCarteney JP, Eggerstedt J, Grafton W, George R. Persistent pleural effusions following coronary bypass surgery. Chest 1998; 114:311-4.
7. 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.
8. Chung CL, Chen CH, Sheu JR, Chen YC, Chang SC. Proinflammatory cytokines, transforming growth factor-beta1, and fibrinolytic enzymes in loculated and free-flowing pleural exudates. Chest 2005; 128:690-7.
9. 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.
10. De Souza Pereira. Morphofunctions study of rat pleural mesothelial cells exposed to low frequency noise. Aviat Space Environ Med 1999; 70:A-78-85.
11. Michailova KN. Electronmicroscopic observations on the visceral and parietal rat's pleura after contralateral pneumonectomy. Eur J Morphol 2001; 39:47-56
12. Mohammed KA, Nasreen N, Hardwick J, Logie CS, Patterson CE, Anthony VB. Bacterial induction of pleural mesothelial monolayer barrier dysfunction. AmJ Physiol Lung Cell Mol Physiol 2001; 281:119-25.
13. Gary-Lee YC, Melkerneker D, Thompson PJ, Light WR, Lane KB. Transforming growth factor beta induces VEGF elaboration from pleural mesothelial cell in vivo and in vitro. Am J Respir Crit Care Med 2002; 165:88-94.
14. Weatherhead M; Antunes G. Chemotherapeutic management of malignant pleural effusion. Expert Opin Pharmacother 2004; 5:1233-42.
15. Gary-Lee YC, Lane KB. The many faces of transforming growth factor- beta in pleural diseases. Curr Opin Pulm Med 2001; 7:173-9.
16. Grove CS, Lee YC. Vascular endothelial growth factor: the key mediator in pleural effusion formation. Curr Opin Pulm Med 2002; 8:294-301.
17. Aoki Y, Tosato G. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in the pathogenesis of primary effusion lymphomas. Leuk Lymphoma 2001; 41:229-37.
18. Kishiro I, Kato D, Fuse D, Yoshida T, Machida S, Kaneko N. Clinical significance of vascular endothelial growth factor in patient with primary lung cancer. Respirology 2002; 7:93-8.
19. Naim R; Tolnay E; Mueller KM; Kuhnen C. Co-expression of VEGF, c-Met and HGF/SF in secondary pleural tumors. Int J Mol Med 2004; 14:787-91.
20. Mohammed KA; Nasreen N; Hardwick J; Van Horn RD; Sanders KL; Antony VB. Mycobacteria induces pleural mesothelial permeability by down-regulating beta-catenin expression. Lung 2003; 181:57-66.
21. Roberts WG, Palade GE. Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. J Cell Sci 1995; 108:2369-79.
22. Grove CS, Lee YC. Vascular endothelial growth factor: the key mediator in pleural effusion formation. Curr Opin Pulm Med 2002; 8:294-301.
23. Chibante AMS. Análise do processo inflamatório agudo no líquido pleural pós-cirurgias de revascularização do miocárdio. Tese para obtenção do Título de Doutor em Ciências pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo/Brasil 2004.