

SABRINA CORRÊA DA COSTA RIBEIRO

**Influência do anticorpo anti-VEGF bevacizumab na
inflamação pleural e na pleurodese experimental
induzida por talco ou nitrato de prata**

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

Programa de Pneumologia

Orientadora: Profa. Dra. Lisete Ribeiro Teixeira

São Paulo

2011

DEDICATÓRIA

À minha mãe Marília, pelo amor e dedicação

Ao meu pai Carlos, pelo exemplo como profissional

À minha irmã Juliana, companheira dos bons e maus momentos

AGRADECIMENTOS

À **Profa. Dra Lisete Ribeiro Teixeira**, respeitada pesquisadora, grande médica e, mais importante ainda, exemplo de caráter e de humanidade. Obrigada pelos muitos ensinamentos, pela disponibilidade, pela paciência e especialmente pela amizade e pelo apoio além de qualquer expectativa.

À **Dra Milena Acêncio**, por colaborar com seu conhecimento e experiência em todas as fases deste trabalho e pela disposição incansável em ajudar e orientar.

Ao **Prof. Francisco Vargas** por me acolher no grupo de Pleura e supervisionar o projeto que gerou esta tese.

Aos **Professores Evaldo Marchi e Leila Antonangelo**, por sua valiosa contribuição para o aprimoramento deste trabalho.

Ao **Grupo da Pleura**, cuja estrutura possibilitou a realização deste trabalho, especialmente ao Dr. Onishi, Carlos e Gabriela.

Aos **Professores Mário Terra Filho e Rogério de Souza** em especial e à Pós-Graduação da Pneumologia, por todos os ensinamentos e pela experiência adquirida.

Ao **Dr. Pedro Medeiros e Dr. Rodrigo Brandão** pela importância na minha formação, pela amizade de muitos anos e por me mostrarem, cada um a seu modo, de que é feito um grande médico.

EPÍGRAFE

Ninguém morre que não seja para renascer.

Nenhum sonho pode ser enterrado. A verdadeira vida é o espírito que flui em busca de novos horizontes.

Ninguém entrega-se que não seja pelo amor. A vontade de ver florir novas cores.

O universo é bem maior que nossa mente e para sabermos do universo precisamos antes conhecer a nós mesmos.

E para conhecermo-nos melhor precisamos sempre um do outro.

Tudo o que é desconhecido um dia se ilumina

E firma sua eternidade

Cristiano Cardoso, 2000

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

SUMMARY

1 INTRODUÇÃO	01
1.1 DERRAME PLEURAL E PLEURODESE	02
1.2 FATOR DE CRESCIMENTO VASCULAR ENDOTELIAL (VEGF)	05
1.3 VEGF E DERRAME PLEURAL	06
1.4 BEVACIZUMAB: HISTÓRICO E PROPRIEDADES	08
2 OBJETIVO	10
3 MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1 EXPERIMENTO ANIMAL	13
3.2 EXPERIMENTO ANIMAL- SUBGRUPO AZUL DE EVANS	17
3.3 ANÁLISE LABORATORIAL	18
3.4 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA	19
3.5 AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA	20
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	23
4 RESULTADOS	24
4.1 LÍQUIDO PLEURAL	25
4.2 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA	33

4.2.1 FASE PRECOCE	33
4.2.2 FASE TARDIA	35
4.3 AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA	36
4.3.1 FASE PRECOCE	36
4.3.2 FASE TARDIA	38
5 DISCUSSÃO	47
6 CONCLUSÃO	53
7 REFERÊNCIAS	55

LISTA DE ABREVIATURAS

DHL: Desidrogenase lática

EV: endovenoso

Fr: French

IL-8: Interleucina 8

Kg: Quilogramas

Kd: Quilodaltons

LDH: Lactic Dehidrogenase

µg: Microgramas

µ: Micrômetros

mg/dL: Miligramas por decilitro

mL: Mililitros

mm³: Milímetros cúbicos

pg/mL: Picogramas por mililitro

RNA: Ribonucleic acid

SEM: Standard error of measurement

TGFβ: Fator transformador de crescimento beta

TGFβ1: Fator transformador de crescimento beta 1

UI: Unidades Internacionais

VEGF: Fator de crescimento do endotélio vascular

RESUMO

Ribeiro, SCC. **Influência do anticorpo anti-VEGF bevacizumab na inflamação pleural e na pleurodese induzida por talco ou nitrato de prata.** [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011

Introdução: A pleurodese química é rotineiramente utilizada para o controle de derrames pleurais recidivantes. O fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) é uma citocina produzida em resposta à inflamação pleural induzida por esclerosantes e possui papel essencial na angiogênese e na fibrose pleural. O anticorpo monoclonal bevacizumab bloqueia a ação do VEGF, sendo utilizado no tratamento de algumas neoplasias malignas com o objetivo de inibir a angiogênese e a progressão tumoral. Os efeitos do bevacizumab sobre o processo inflamatório pleural e sobre a pleurodese induzida por talco e nitrato de prata ainda não foram totalmente descritos. **Objetivo:** Caracterizar a influência do anticorpo monoclonal anti-VEGF, bevacizumab, nas fases precoce e tardia da pleurodese induzida pelo talco ou nitrato de prata. **Métodos:** Foram estudados 152 coelhos que receberam injeção intrapleural de talco (n=76) ou nitrato de prata (n=76). Metade dos animais em cada grupo recebeu injeção intravenosa de bevacizumab 30 minutos antes do agente esclerosante. Após a injeção intrapleural de talco ou nitrato de prata, 5 animais em cada grupo foram sacrificados em 1, 2, 3, 4, 7, 14 e 28 dias. Um subgrupo de 12 animais recebeu azul de Evans 1 hora antes do sacrifício realizado no terceiro dia, para análise de permeabilidade pleural. Em todos os animais, o líquido pleural obtido foi quantificado, sendo realizadas análises bioquímica, citológica e imunológica. A cavidade pleural foi avaliada macroscopicamente através de escore para quantificação de aderências. Microscopicamente, a pleura visceral foi analisada por escore para o grau de inflamação e fibrose; a densidade vascular foi avaliada por imunohistoquímica (anti fator VIII) e o espessamento pleural e a quantidade de colágeno (fibras colágenas coradas pelo método de picrossirius) mensurados através de um sistema de análise de imagem. **Análise Estatística:**

Os resultados estão expressos em média e erro padrão (SEM). Comparações entre os grupos foram feitas utilizando-se o teste t não-pareado ou Mann-Whitney, sendo considerado significativo um valor de p inferior a 0,05.

Resultados: Nos animais que receberam injeção de bevacizumab observamos redução significativa do volume de líquido pleural e da permeabilidade vascular, assim como dos níveis pleurais de VEGF e de IL-8, porém sem diferença na celularidade, nos níveis de DHL, proteínas e TGF β 1. O grau de aderências pleurais também foi significativamente reduzido em todos os coelhos pré-tratados com bevacizumab, porém sem evidente diferença no escore de inflamação pleural independente do esclerosante utilizado. Observou-se ainda, nos animais que receberam anti-VEGF, diminuição da densidade vascular tanto no grupo talco como no nitrato de prata. Houve redução significativa de espessamento e fibrose pleural e da quantidade de colágeno apenas nos animais que receberam nitrato de prata e tratamento prévio com bevacizumab.

Conclusão: Este estudo experimental demonstrou que a administração de bevacizumab intravenoso interfere na fase aguda do processo inflamatório pleural induzido pelo talco ou nitrato de prata, provavelmente através de redução da permeabilidade vascular. Evidenciou-se também que este fármaco inibe a formação de aderências pleurais, reduz a densidade vascular, a produção de colágeno e o espessamento pleural, potencialmente interferindo na efetividade da pleurodese induzida por talco ou nitrato de prata. Estes resultados alertam para uma possível redução de efetividade da pleurodese em pacientes em uso de anticorpos anti-VEGF.

Descritores:

1. Fator de crescimento do endotélio vascular;
2. Pleurodese;
3. Inibidores da Angiogênese;
4. Derrame Pleural;
5. Inflamação Pleural;
6. Bevacizumab;
7. Coelhos.

SUMMARY

Ribeiro, SCC. **Influence of anti-VEGF bevacizumab in pleural inflammation and experimental pleurodesis induced by talc or silver nitrate.** [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011

Introduction: Chemical pleurodesis is widely used to control recurrent malignant pleural effusion. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is produced in response to mesothelial injury by sclerosing intrapleural injection and it is a potent angiogenesis inducer. The monoclonal anti-VEGF bevacizumab inhibits VEGF and has been used in the treatment of cancer to reduce angiogenesis and tumour progression. The effects of VEGF blockage on pleural inflammation and pleurodesis induced by talc and silver nitrate were not completely known. **Objective:** To describe the effects of monoclonal anti-VEGF bevacizumab in the early and late phase of pleurodesis induced by talc or silver nitrate. **Methods:** One-hundred and fifty-two rabbits were submitted to intrapleural injection of talc (n = 76) or silver nitrate (n = 76). Half of the animals in each group received intravenous bevacizumab, 30 minutes before the sclerosing agent. In each of the four groups, five animals were sacrificed 1, 2, 3, 4, 7, 14 and 28 days after the intrapleural injection. . A subgroup of twelve animals received intravenous Evan's blue one hour prior to sacrifice, to estimate the vascular permeability. The pleural fluid volume was quantified and sent for biochemical, cytological and immunological analysis. Macroscopic pleural adhesions were evaluated using a semiquantitative score. The visceral pleura was submitted to microscopic examination to quantify, by score, inflammation and fibrosis. Anti-factor VII immunostaining was used to evaluate vascular density. Pleural thickness and collagen quantification (sirius red stain was used to identify collagen fibers) were evaluated by an image analysis system. **Statistical analysis:** Results are expressed as mean and standard error measurement (SEM). Differences between two groups were analyzed using t-

test and Mann-Whitney rank sum test and considered statistically significant when p-value was <0.05. **Results:** Animals pretreated with anti-VEGF antibody developed lower volumes of pleural fluid and presented a significant reduction in pleural permeability, VEGF and IL-8 levels in both groups (talc and silver nitrate). There was no difference in total number of cells, TGF β 1, LDH and total protein in the pleural fluid. Macroscopic adhesions scores were lower and angiogenesis was reduced after pretreatment with bevacizumab in both groups. No significant difference was found in inflammation scores between the two groups. Pleural fibrosis, thickening and collagen were reduced in animals submitted to pleurodesis only in the group silver nitrate pretreated with bevacizumab. **Conclusion:** This experimental study shows that the administration of anti-VEGF antibody interferes in the acute phase of acute inflammation induced by silver nitrate and talc by reducing vascular permeability. It also reduces macroscopic adhesions, pleural thickening and interferes with pleural fibrosis, decreasing angiogenesis and collagen production. These findings suggest a potential for pleurodesis failure in patients treated with bevacizumab for cancer.

Descriptors:

1. Vascular endothelial growth factor;
2. Pleurodesis;
3. Angiogenesis Inhibitors;
4. Pleural Effusion;
5. Pleural Inflammation;
6. Bevacizumab;
7. Rabbits.

1- INTRODUÇÃO

1- INTRODUÇÃO

1.1 Derrame Pleural e Pleurodese

A pleura é uma camada serosa que recobre externamente os pulmões (pleura visceral) e internamente a cavidade torácica (pleura parietal). No espaço entre estas duas camadas existe a formação e reabsorção contínua de líquido, que lubrifica a superfície pleural e permite o deslizamento destes dois folhetos^[1]. Este volume de líquido foi estimado entre 0,16 a 0,36mL/Kg de superfície corporal, ou menos de 12 mL por hemitórax^[2]. Em situações onde há aumento de produção ou redução da absorção deste fluido, pode haver um acúmulo progressivo, caracterizando o derrame pleural.

Os primeiros passos na abordagem de um derrame pleural são estabelecidos através da toracocentese diagnóstica e biópsia pleural. A análise do líquido e do fragmento pleural, associada a uma boa história clínica e exame físico detalhado, possibilita o diagnóstico de grande parte dos derrames pleurais^[1]. O diagnóstico preciso da etiologia do derrame tem grande relevância, pois o tratamento depende diretamente da doença de base diagnosticada. Em alguns casos, como em efusões causadas por insuficiência cardíaca ou renal, a compensação da doença através de tratamento medicamentoso leva à resolução parcial ou total do derrame, sem necessidade de qualquer procedimento adicional^[3].

No entanto, em outros casos, a abordagem invasiva da cavidade pleural é necessária como terapia primária ou complementar. Pode ser realizada através de drenagem fechada, de intervenções como toracoscopia ou toracotomia com decorticação ou utilizando recursos como a pleurodese. Este último procedimento, consiste na instilação de um agente esclerosante na cavidade pleural gerando um processo inflamatório, formando aderências e uma conseqüente sínfise entre os folhetos pleurais^[1].

Os primeiros relatos de pleurodese datam do início do século XX, quando Bethune injetou talco no espaço pleural, com o objetivo de colabar uma cavidade pós lobectomia^[4]. Atualmente, a pleurodese é utilizada no tratamento de processos pleurais recidivantes de diferentes etiologias, sendo empregada principalmente no tratamento de derrames pleurais neoplásicos.

O processo inflamatório pleural induzido pela injeção de um agente esclerosante no espaço pleural não está completamente elucidado e é dependente do esclerosante escolhido^[5]. É referido que na fase precoce da pleurodese induzida por talco ou nitrato de prata ocorre inflamação aguda pleural e sistêmica com recrutamento de neutrófilos e liberação de citocinas inflamatórias tais como IL-8 e VEGF^[6]. A interleucina 8 é um potente fator quimiotático que parece ter grande importância na formação do derrame pleural. Broaddus e colaboradores em um estudo utilizando anticorpos anti IL-8 observaram redução na migração de neutrófilos no líquido pleural de pacientes com empiema^[7]. Ceyhan e colaboradores, ao estudarem amostras de líquido

pleural de várias etiologias em 34 pacientes observaram uma correlação significativa entre os níveis de IL-8 e a porcentagem de neutrófilos no líquido pleural^[8]. Considerando-se que a migração de neutrófilos para o tecido inflamado é um dos aspectos fundamentais da inflamação aguda, a interleucina-8 é considerada um dos principais mediadores da inflamação aguda na pleura, seja esta lesão induzida por uma infecção ou, como no caso de nosso estudo, pelo estímulo externo com esclerosantes.

Na fase precoce da pleurodese, após a injeção do agente esclerosante, ocorre lesão da camada mesotelial com liberação de citocinas, migração de células inflamatórias e a formação de um líquido exsudativo. Este exsudato rico em proteínas é posteriormente reabsorvido, formando-se então aderências, inicialmente compostas apenas de fibrina que funciona como um substrato para a intensa ativação de fibroblastos e formação de colágeno^[9]. Nesta fase, é importante ressaltar o papel do TGF β , citocina multifuncional capaz de inibir certas respostas celulares, aumentar a proliferação de outras, controlar os múltiplos aspectos do tecido conectivo e influenciar numerosos pontos de controle do sistema imune^[10]. É conhecida por estimular a fibronectina e a produção do colágeno, ao induzir nas células mesoteliais humanas a síntese de RNA mensageiro do colágeno tipo I^[11]. Tem um papel importante em muitas facetas das doenças pleurais, particularmente em relação a suas propriedades pró-fibróticas e anti-inflamatórias^[10].

Com a produção de colágeno pelos fibroblastos, mediada pelo TGF β , as aderências vão tornado-se mais espessas e estruturadas e acabam obliterando o espaço entre a pleura visceral e parietal e impedindo a recidiva e reacúmulo do derrame pleural^[9].

1.2 O Fator de Crescimento do Endotélio Vascular

Dentre as citocinas envolvidas na formação do derrame pleural e no processo inflamatório da pleurodese, o fator de crescimento do endotélio vascular chama atenção pela potente indução de permeabilidade pleural e por sua presença quase universal no líquido pleural, independentemente da causa do derrame^[12].

O VEGF é uma glicoproteína com peso molecular entre 34 e 45 Kd (kilodaltons)^[13]. Ao menos cinco isoformas principais (206, 189, 165, 145 e 121 aminoácidos) foram descritas em células humanas. Destas, duas são secretadas na forma solúvel (121 e 265 aminoácidos) enquanto outras (189 e 206 aminoácidos) encontram-se associadas aos proteoglicanos ou ligadas à matriz extracelular. Algumas ações diretas do VEGF são:

- Estímulo da mitogênese de células endoteliais
- Inibição de apoptose das células endoteliais
- Aumento da permeabilidade vascular de forma 50.000 vezes mais intensa que a histamina^[14].

- Estímulo do ativador tecidual da plasmina, ativador da uroquinase, de colagenases e metaloproteinases^[15]. Estes mediadores estão envolvidos na degradação da matriz extracelular, necessária para a migração das células endoteliais.

O VEGF e seus receptores VEGF R1 e VEGF R2 são expressos em células de tecidos normais como as do pulmão, rim, adrenal, fígado e estômago, sendo também encontrado em vários tipos de células tumorais, como nos adenocarcinomas, fibrossarcoma e linfomas^[16]. Os receptores do VEGF são expressos principalmente nas células endoteliais e também foram identificados em diversos tipos de tumores e no tecido pleural, tanto normal, como na presença de inflamação ou neoplasia^[17].

As funções do VEGF como indutor de permeabilidade vascular e mitogênese sugerem a sua grande participação no processo inflamatório envolvido na formação do derrame pleural.

1.3 VEGF e derrame pleural

A formação do líquido pleural geralmente envolve a migração de células e plasma da circulação sistêmica para o espaço pleural^[1]. Esta migração inclui a passagem através de duas barreiras: o endotélio vascular e o mesotélio. O mesotélio apresenta junções mais eficazes e funciona como agente limitante à passagem de proteínas e células inflamatórias para o espaço pleural. O VEGF é capaz de aumentar a permeabilidade da barreira mesotelial^[18], e, potencializa

a passagem pela parede de capilares e vênulas, através da abertura das junções intercelulares e da indução de fenestrações no endotélio, mesmo em regiões onde estas não costumam ocorrer^[19].

Como previamente referido, o VEGF está presente em derrames pleurais de várias etiologias^[12]. O papel do VEGF na formação de derrames cavitários foi estudado por Yano e colaboradores^[20], que injetaram células de adenocarcinoma e de carcinoma espinocelular em camundongos e observaram que os animais com adenocarcinoma expressaram níveis mais elevados de VEGF e tumores mais vascularizados. Os níveis de VEGF tiveram correlação direta com a quantidade de derrame maligno formado. Em uma fase posterior, as células de adenocarcinoma foram transfectadas com um gene anti-VEGF₁₆₅, que ao suprimir a produção de VEGF, reduziu significativamente a permeabilidade vascular e a quantidade de derrame pleural produzido. Achados semelhantes foram obtidos, em camundongos, após a instilação intraperitoneal de células de carcinoma ovariano e utilização concomitante de anticorpos neutralizantes anti-VEGF. Os autores observaram redução da massa tumoral, aumento da sobrevivência dos animais e inibição quase completa da produção de ascite neoplásica no grupo tratado^[21]. Estudos demonstraram que, geralmente, os exsudatos apresentam níveis de VEGF significativamente mais elevados do que os transudatos^[22, 23]. Em um estudo com 70 pacientes, Cheng e colaboradores^[22], observaram que os menores níveis de VEGF foram encontrados em derrames associados à insuficiência cardíaca e que os níveis

mais elevados eram os de origem neoplásica. No entanto, houve uma sobreposição significativa de valores entre os grupos, limitando seu uso como ferramenta para o diagnóstico diferencial entre os derrames pleurais de etiologias diversas .

O papel do VEGF na fibrose pleural foi avaliado em um modelo experimental de empiema em coelhos^[24], onde a injeção de anticorpos anti-VEGF reduziu a angiogênese e a fibrose pleural. Este achado sugere que o VEGF desempenha um papel fundamental na formação da camada de fibrose e das aderências que caracterizam o empiema.

Os resultados destes estudos corroboram a importância do VEGF na formação do derrame pleural e na fibrose e trazem alguns questionamentos:

- O bloqueio do VEGF pode impedir a formação de derrame pleural?
- Quais mecanismos estariam envolvidos neste bloqueio?
- Quais as consequências do bloqueio do VEGF sobre a fibrose induzida por agentes esclerosantes pleurais?

1.4 Bevacizumab

O bevacizumab é um anticorpo monoclonal anti-VEGF humanizado pela incorporação de sítios de ligação ao VEGF murino a uma estrutura de imunoglobulina G humana ^[25]. Seu mecanismo de ação se desenvolve através da ligação específica ao VEGF, impedindo a ativação de seus receptores,

localizados na superfície das células endoteliais^[25]. É capaz de inibir o VEGF de forma dose-dependente, bloqueando suas ações de proliferação, migração e inibição de apoptose das células endoteliais e neutralizando a ação desta citocina no aumento de permeabilidade das células endoteliais^[25,26]. Este anticorpo foi o primeiro anti-VEGF aprovado para tratamento de câncer, sendo utilizado atualmente no tratamento de degeneração macular da retina e em neoplasias de colo, de mama e de pulmão^[26]. Além das indicações já estabelecidas, o estudo do bevacizumab em doenças inflamatórias é um campo de pesquisa extremamente promissor, tendo sido utilizado com sucesso em derrame pleural refratário associado a amiloidose e pós-transplante de medula^[27,28].

Nossa hipótese é de que a utilização do anti VEGF poderia inibir a formação de processo inflamatório exsudativo pleural em animais submetidos a pleurodese. Do mesmo modo, este fármaco poderia atuar reduzindo a formação de aderências pleurais e conseqüentemente interferindo na efetividade da pleurodese.

2- OBJETIVO

2- OBJETIVO

Caracterizar a influência do anticorpo monoclonal anti-VEGF, bevacizumab, na pleurodese induzida pelo talco e pelo nitrato de prata.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3- MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto de pesquisa foi aprovado pela CAPPesq (Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HC FMUSP) sob o número 998/05 e realizado no Laboratório de Pleura do Instituto do Coração (InCor) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Recebeu suporte financeiro do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

3.1: Experimento Animal

Para realização deste estudo foram utilizados 152 coelhos da raça Nova Zelândia, com peso entre 2,0 e 2,5 Kg. De acordo com metodologia utilizada previamente^[6,29-31], os animais foram anestesiados com uma injeção intramuscular de cetamina (Cristália, São Paulo-Brasil) 35mg/kg e xilazina (Bayer, São Paulo-Brasil) 5mg/kg. A seguir, o hemitórax direito foi tricotomizado e a anti-sepsia feita com uma solução de álcool a 70% (Rioquímica, São Paulo, Brasil).

A partir deste momento, os animais foram divididos e preparados de acordo com a fase do processo em que estaria programado o sacrifício e a análise da cavidade pleural. Didaticamente, denominamos os animais que seriam sacrificados em 1, 2, 3 e 4 dias de grupo fase precoce. Os animais cujo

sacrifício estava programado para 7, 14 e 28 dias após o procedimento experimental constituíram o grupo de fase tardia.

Os agentes esclerosantes foram preparados em ambiente estéril, em fluxo laminar. Uma suspensão de 400mg/kg de talco livre de asbestos, (Farmácia USP, São Paulo-Brasil) foi preparada com solução fisiológica a 0.9% perfazendo um volume total de 2 mL. De maneira similar o nitrato de prata (Merck, Darmstadt-Alemanha) foi preparado, diluído em água destilada, para uma concentração final a 0,5%^[29,30].

De acordo com metodologia previamente estabelecida^[29, 30] os animais do grupo da fase precoce, receberam através de uma agulha 19 Gauge, no 6º espaço intercostal direito, uma injeção intrapleural, em volume total de 2 mL, de um dos dois agentes esclerosantes. Metade dos coelhos em cada grupo recebeu injeção endovenosa de 5 mg/kg de bevacizumab (Avastin® Roche, Basilea-Suíça), 30 minutos antes da injeção do agente esclerosante (Figura1).



Figura 1: Injeção intrapleural de talco, através de diferença de pressão (Fase precoce).

Também de acordo com metodologia utilizada em estudo prévio, os animais do grupo de fase tardia foram preparados para o procedimento pleural^[31]. Após o posicionamento do animal em decúbito lateral esquerdo, uma incisão de 0,5cm foi feita na pele (linha hemiclavicular), na projeção do sexto arco costal. Em sequência, um cateter (8 fr) foi tunelizado no tecido subcutâneo para evitar possíveis tentativas de retirada por parte do animal. A seguir, a pleura parietal foi exposta e após a inserção do dreno, efetuou-se a sutura, fixação e a injeção dos fármacos (talco ou nitrato de prata) através do dreno (Figura 2).



Figura 2: Cateter tunelizado no subcutâneo. (Fase tardia)

A cada 24 horas o dreno era aspirado e o volume de líquido pleural retirado, mensurado e aliquotado para posterior análise laboratorial. O dreno foi mantido por período mínimo de 72 horas, sendo removido quando a quantidade de líquido aspirada fosse inferior a 1ml/dia. Metade dos coelhos em cada grupo

(talco e nitrato) recebeu bevacizumab intravenoso, 30 minutos antes da injeção do agente esclerosante, de forma similar ao grupo de fase aguda.

De maneira esquemática, os animais (fases precoce e tardia) foram divididos em quatro grupos de acordo com o agente esclerosante recebido e ao uso prévio ou não de bevacizumab.

Grupo I: Talco 400mg/kg intrapleural + bevacizumab 5mg/kg EV

Grupo II: Talco 400mg/kg intrapleural

Grupo III: Nitrato de prata 0,5% intrapleural + bevacizumab 5mg/kg EV

Grupo IV: Nitrato de prata 0,5% intrapleural

Os coelhos foram sacrificados através de injeção intravenosa de 40 mg/kg de pentobarbital, na veia marginal da orelha^[6, 29-31]. Imediatamente após o sacrifício, foi feita uma incisão mediana no abdome com exposição do diafragma. Através de punção transdiafragmática, todo o líquido pleural existente foi cuidadosamente aspirado e reservado para posterior análise. Este procedimento foi fundamental para a coleta de líquido nos animais da fase precoce^[6,29, 30]. No mesmo tempo, foram obtidas amostras de sangue.

O tórax então foi retirado em bloco e os pulmões expandidos com 60 ml de solução de formalina a 10%, através de cateter plástico, posicionado na traquéia. A ligadura da traquéia foi realizada com fio de algodão e em sequência, o tórax foi submerso em formol a 10%, por no mínimo 48 horas^[6, 29-31].

Posteriormente, foram realizadas incisões no diafragma e arcos costais na linha hemiclavicular. O esterno e as porções mediais dos arcos costais foram removidos para permitir ampla exposição da cavidade pleural. Fragmentos da pleura visceral foram obtidos para avaliação microscópica^[30,31]. A cavidade pleural esquerda que não recebeu injeção de esclerosante funcionou como controle.

3.2 -Experimento animal- Subgrupo Azul de Evans

Para avaliar a permeabilidade vascular pleural em animais que receberam injeção intrapleural de agentes esclerosantes, um subgrupo extra de doze coelhos recebeu injeção intravenosa de Azul de Evans (Farmácia USP, São Paulo-Brasil), um corante que se liga à albumina. Estes coelhos também foram submetidos ao mesmo procedimento, ou seja, injeção intrapleural de talco ou nitrato de prata com e sem anti-VEGF. Três dias após a instilação do esclerosante, período usualmente de maior exsudação pleural, estes animais receberam injeção intravenosa de Azul de Evans na veia marginal da orelha (25mg/Kg diluídos em 20mL de soro fisiológico a 0,9%, dose total = 55mg) e após uma hora foram sacrificados (Figura 3).

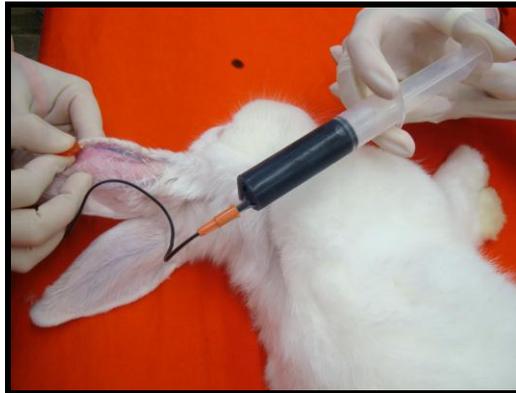


Figura 3: Injeção intravenosa de Azul de Evans.

O líquido pleural foi cuidadosamente aspirado e a quantidade de corante foi determinada para estimar a permeabilidade, através do extravasamento, pela medida de absorbância do líquido obtido a 620nm, comparado a concentrações conhecidas de Azul de Evans^[32], através de aparelho de leitura de densidade óptica.

3.3- Análise Laboratorial

O líquido pleural obtido foi quantificado, armazenado em tubo seco para determinação de proteína total e desidrogenase láctica e em tubo com ácido etiedenamino-tetra-acético para citologia e determinação de citocinas^[6, 29].

As amostras foram processadas em um hemocítômetro para determinação do número total de células. O restante do material foi centrifugado na velocidade de 1000 voltas por minuto por 10 minutos a 4 graus

Celsius, retirados imediatamente para determinação de DHL através de método cinético convencional (Wiener, Rosario - Argentina) e de proteína total através de colorimetria (Wiener, Rosario - Argentina). As citocinas IL-8 (Opt-EIA, rabbit IL-8 set; Pharmigen, San Diego - USA), VEGF (R&D Systems, Minneapolis – USA) e TGF- β 1 (R&D Systems, Minneapolis – USA) foram quantificadas através de imunoenensaio enzimático (ELISA)^[6, 29]

3.4- Avaliação Macroscópica

A presença de aderências macroscópicas foi avaliada de acordo com uma escala semi-quantitativa^[30, 31], recebendo escores de 0 a 4:

- 0- ausência de aderências
- 1- 1-3 aderências, sem áreas de sínfise
- 2- 3 ou mais aderências localizadas, sem áreas de sínfise
- 3- múltiplas aderências, com áreas isoladas de sínfise
- 4- múltiplas aderências com sínfise completa da cavidade pleural

(Figura 4).

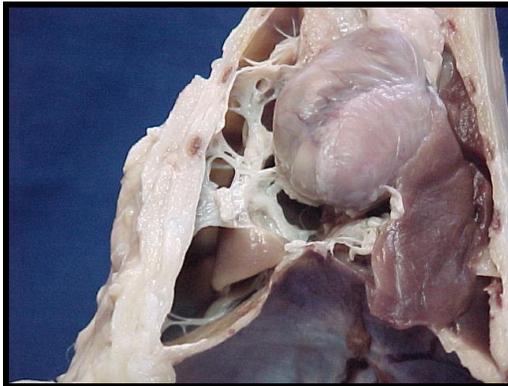


Figura 4: Aderências pleurais - Grau 3

3.5- Avaliação Microscópica

Os fragmentos de pleura visceral foram fixados em formalina a 10% por um mínimo de 48 horas. Depois deste período, o tecido foi incluído em parafina e corado com hematoxilina-eosina. As alterações histológicas presentes de inflamação e fibrose foram descritas de forma semi-quantitativa (0-4)^[30,31] (Figura 5).

- 0- pleura normal
- 1- alteração mínima
- 2- leve
- 3- moderada
- 4- intensa

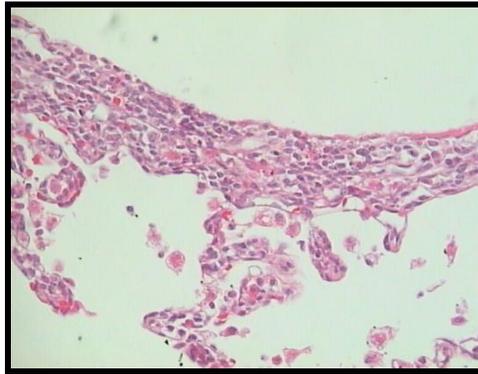


Figura 5: Inflamação e Fibrose grau 3

Para a avaliação das fibras de colágeno e do espessamento pleural, lâminas contendo seções da pleura visceral foram coradas com vermelho sírio a 2% diluído em solução aquosa de ácido pícrico^[33]. O realce da birrefringência medida pelo método de polarização do picrossírio é específico para estruturas de colágeno que consistem de agregados de moléculas com diferentes orientações. Portanto, as fibras mais finas (colágeno tipo III) que correspondem ao colágeno mais imaturo adquirem a coloração verde e aparência fracamente birrefringente. As fibras mais espessas (colágeno tipo I) correspondem a um colágeno maduro e se coram em laranja avermelhado, com aparência fortemente birrefringente. Cinco campos a um aumento de 400x foram escolhidos de forma aleatória para a avaliação e quantificação do colágeno. Para estas determinações utilizou-se o sistema de análise de imagem Leica Q500IV (Leica Imaging Systems Ltda, Suíça) que permite medidas geométricas e densitométricas quantitativas. A área ocupada pelas fibras foi determinada através de densitometria digital e o equipamento foi calibrado para transformar

os valores de pixels para micrômetros. Como em cada lâmina foram avaliados diferentes campos de pleura, a quantidade de colágeno foi expressa em área (μm^2) corrigida por $10^3 \mu\text{m}^2$ de área pleural analisada. Esta padronização nos permitiu estabelecer a proporção entre fibras finas e grossas para cada agente (talco e nitrato de prata). O colágeno total correspondeu à soma das quantidades de fibras finas e grossas (I+III). (Figura 6) A mensuração do espessamento pleural foi baseada na medida linear da distância entre as margens interna e externa da pleura e expressa em micrômetros^[33].

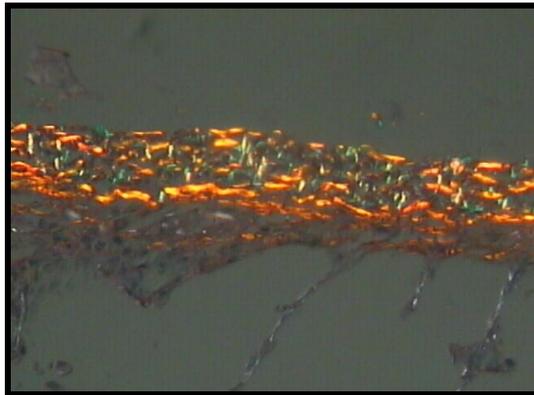


Figura 6: Coloração pelo método de Picrosirius para análise de colágeno.

A densidade vascular pleural foi quantificada através de imunohistoquímica. Para evidenciar as células endoteliais de forma seletiva, permitindo análise morfométrica automatizada, lâminas de pleura visceral foram marcadas através de imunohistoquímica para o antígeno fator VIII (fator de von Willebrand). As lâminas foram incubadas com anti-fator VIII (Dako, AO82, Dako,

CA, EUA) em uma diluição de 1:7000 por 30 minutos e posteriormente coradas com hematoxilina. Em cada lâmina, cinco campos escolhidos de forma aleatória foram analisados. Os vasos marcados foram quantificados e o grau de densidade vascular foi expresso como a média da quantidade de vasos nos campos analisados^[34].

3.6- Análise Estatística

Os dados foram obtidos a cada tempo (1, 2, 3, 4, 7, 14 e 28 dias) para cada um dos quatro subgrupos e expressos como média e erro-padrão. O teste t não pareado foi utilizado na comparação entre os grupos. Dados de distribuição não normal foram comparados utilizando-se o teste de Mann-Whitney. O programa estatístico utilizado foi o SigmaStat 3.5 (Systat, USA). Valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

4- RESULTADOS

4- RESULTADOS

Durante o procedimento experimental, quatro animais morreram em decorrência da anestesia ou no pós-operatório imediato. Não houve diferença significativa entre os grupos em relação ao número de óbitos. Os animais foram repostos, mantendo-se a amostra programada inicialmente, ou seja, os 152 animais.

4.1- Líquido Pleural

A administração prévia de bevacizumab reduziu o volume (mL) de líquido pleural nos dias 3 ($15,4 \pm 4,8$ vs $1,4 \pm 1,1$; $p < 0,001$) e 4 ($6,0 \pm 4,3$ vs $0,7 \pm 0,8$; $p = 0,028$) no grupo que recebeu talco intrapleural, e nos dias 3 ($30,6 \pm 7,8$ vs $16,8 \pm 11,0$; $p < 0,052$), 4 ($39,6 \pm 15,0$ vs $14,6 \pm 8,2$; $p = 0,011$) e 7 ($23,6 \pm 6,0$ vs $6,2 \pm 4,5$; $p < 0,001$) nos animais que receberam nitrato (Gráfico 1). Não foi observada presença de líquido pleural no hemitórax esquerdo em nenhum dos animais estudados.

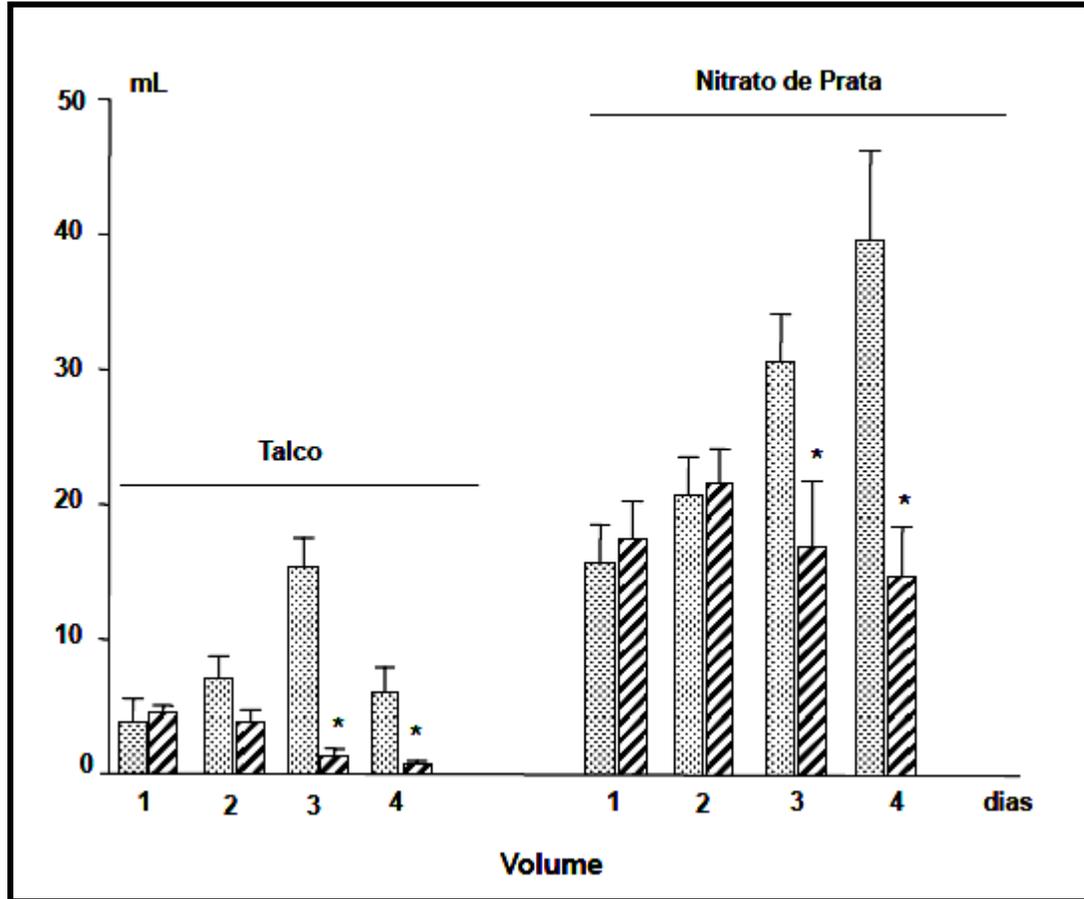


Gráfico 1: Comparação entre volume de líquido pleural nos grupos talco e nitrato de prata, com e sem administração prévia de bevacizumab (* $p < 0,05$).
 (▨ sem bevacizumab ▩ com bevacizumab).

O líquido pleural obtido apresentou características de exsudato. Não houve influência significativa do pré-tratamento com bevacizumab nos níveis de DHL e proteínas totais com nenhum dos dois esclerosantes (Gráficos 2 e 3).

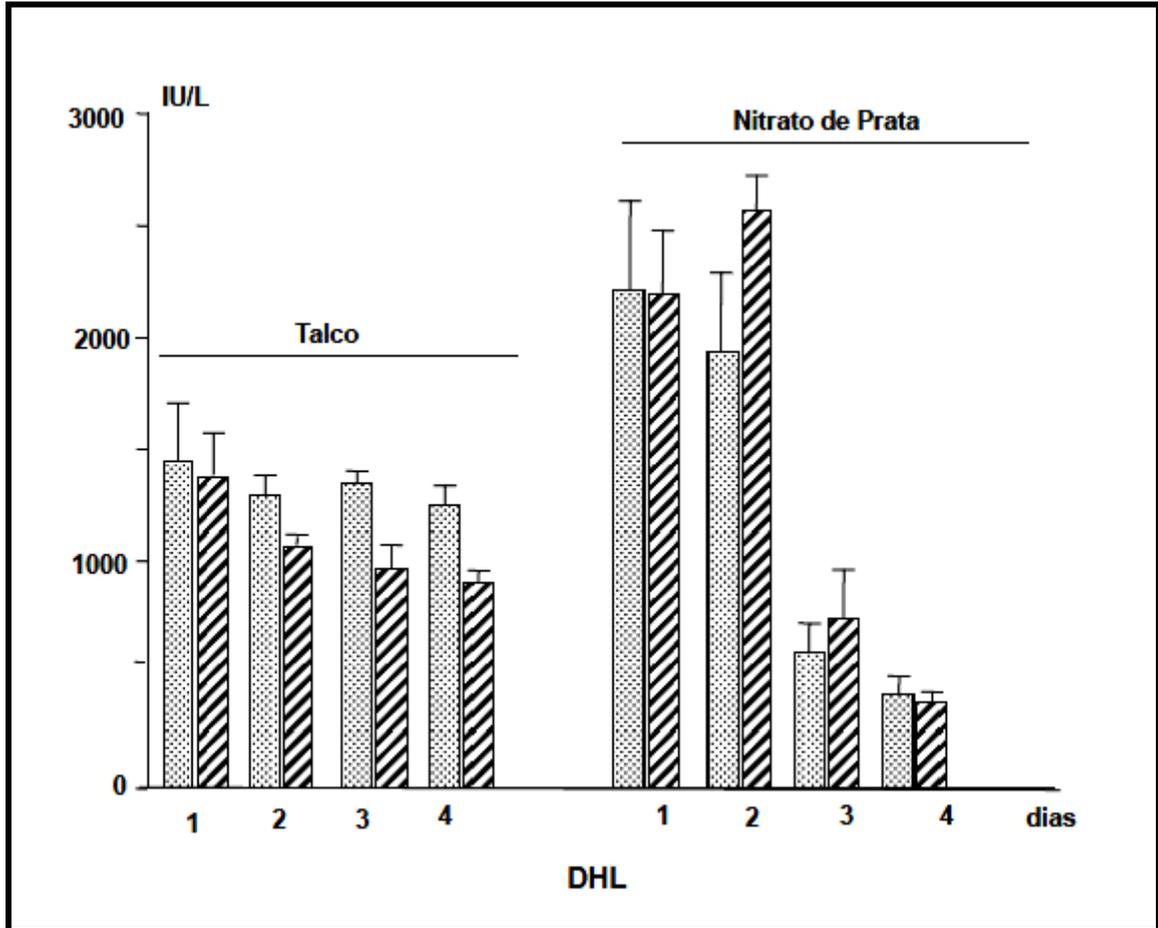


Gráfico 2: Comparação entre níveis de DHL nos grupos talco e nitrato de prata, com e sem administração prévia de bevacizumab (* $p < 0,05$).

( sem bevacizumab  com bevacizumab) .

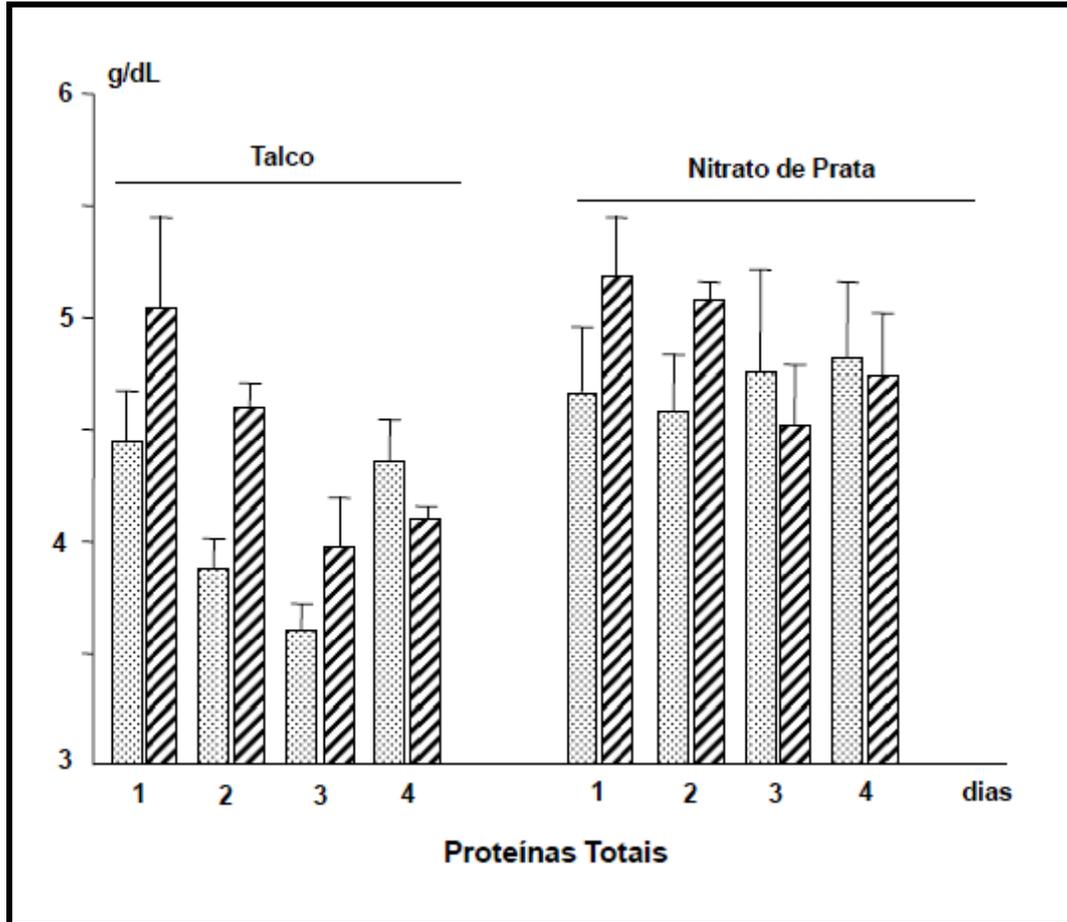


Gráfico 3: Comparação entre níveis de proteínas totais nos grupos talco e nitrato de prata, com e sem administração prévia de bevacizumab (* $p < 0,05$) (▨ sem bevacizumab ▩ com bevacizumab) .

Os animais submetidos à pleurodese com talco apresentaram valores de celularidade mais elevados que o grupo nitrato. Entretanto, não houve influência do bevacizumab sobre o número total de células nucleadas no líquido pleural (Gráfico 4).

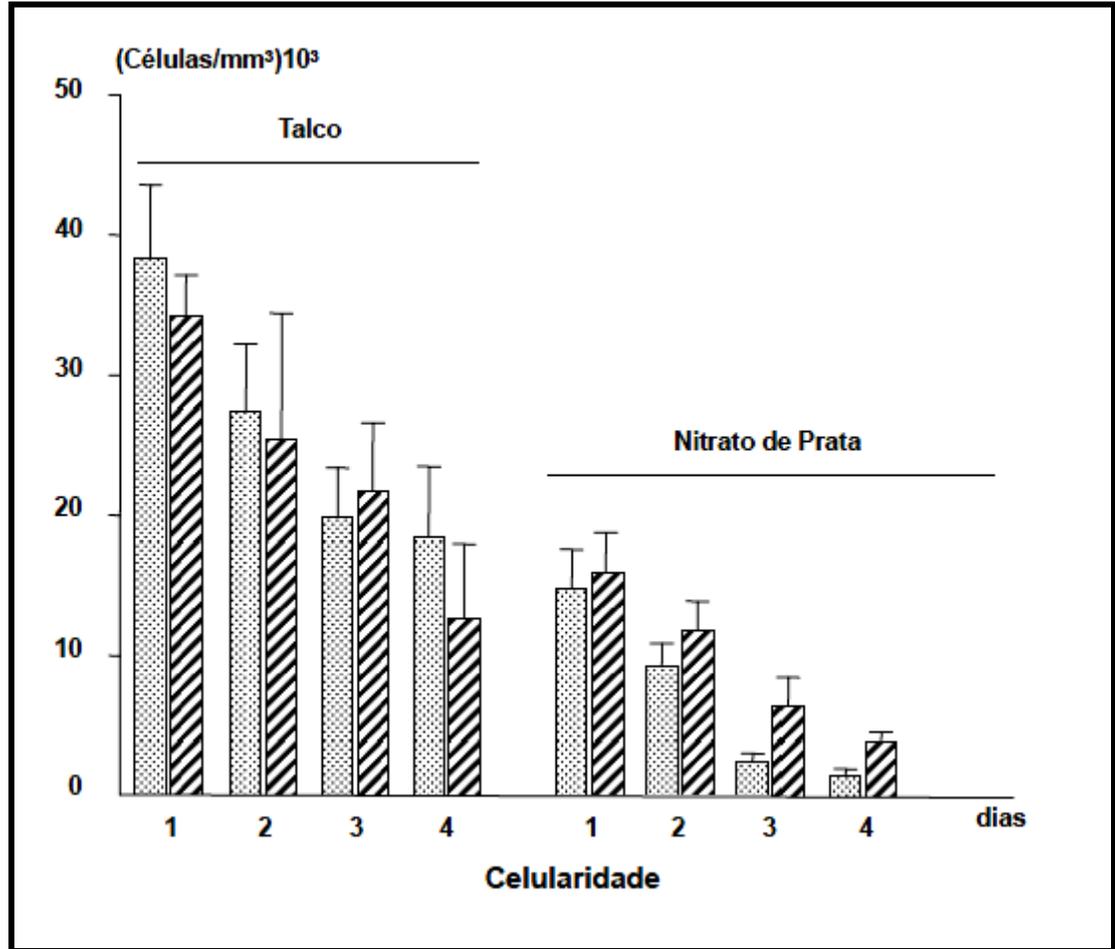


Gráfico 4: Comparação entre número total de células nos grupos talco e nitrato de prata, com e sem administração prévia de bevacizumab (* $p < 0,05$) (▨ sem bevacizumab ▩ com bevacizumab) .

Em relação às citocinas, houve redução significativa do VEGF no líquido pleural dos animais que receberam bevacizumab (Gráfico 5A) em todos os tempos do estudo.

Os níveis de IL-8 reduziram-se significativamente em 1 (741 ± 351 vs 315 ± 202 ; $p=0,46$), 2 (621 ± 337 vs 207 ± 158 ; $p < 0,038$), 3 (444 ± 215 vs $106 \pm$

32; $p=0,008$) e 4 (233 ± 189 vs 91 ± 25 ; $p=0,032$) dias no grupo talco e nos dias 1 (1341 ± 461 vs 655 ± 461 ; $p=0,027$), 2 (1069 ± 182 vs 306 ± 371 ; $p=0,003$) e 3 (662 ± 218 vs 146 ± 86 ; $p=0,001$) no grupo nitrato (Gráfico 5B).

Em relação ao TGF- β 1, não houve diferença significativa entre os grupos que receberam o bevacizumab, independentemente do esclerosante pleural utilizado (Gráfico 5C).

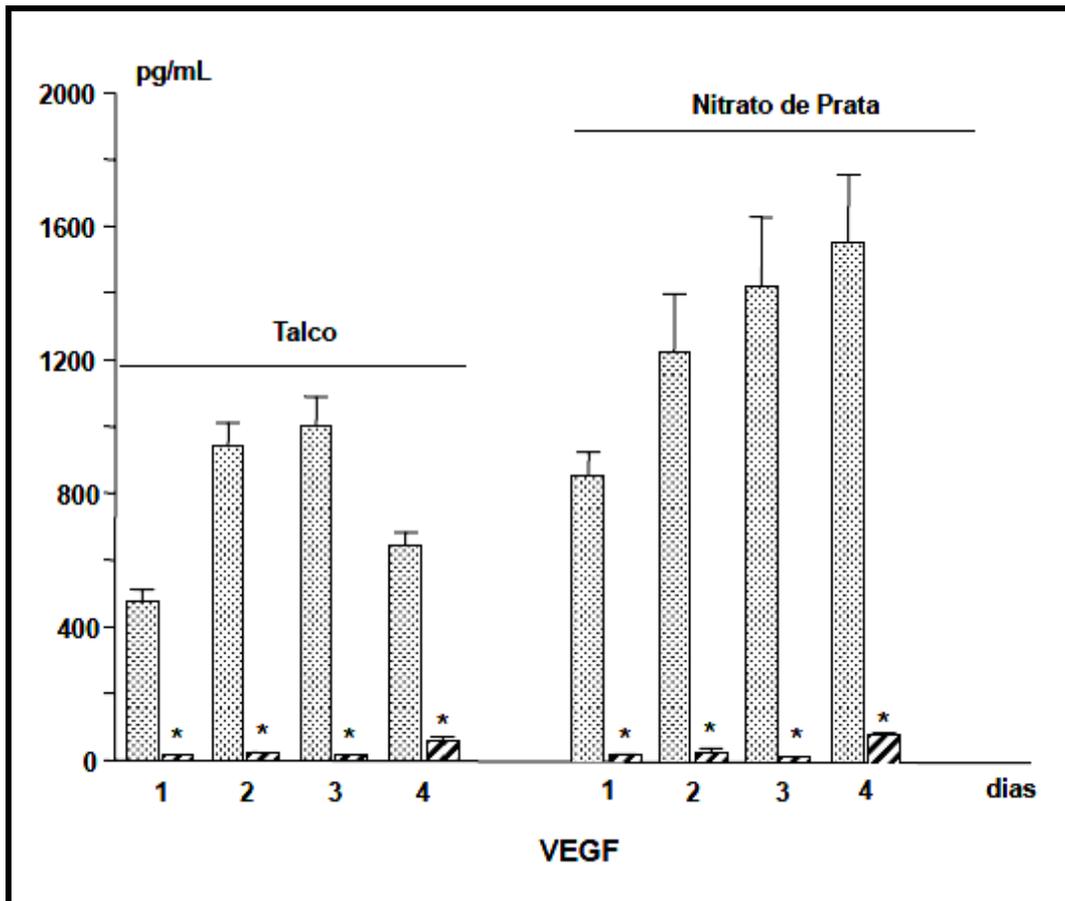


Gráfico 5A: Comparação entre níveis de VEGF nos grupos talco e nitrato de prata, com e sem administração prévia de bevacizumab (* $p<0,05$) (▨ sem bevacizumab ▩ com bevacizumab) .

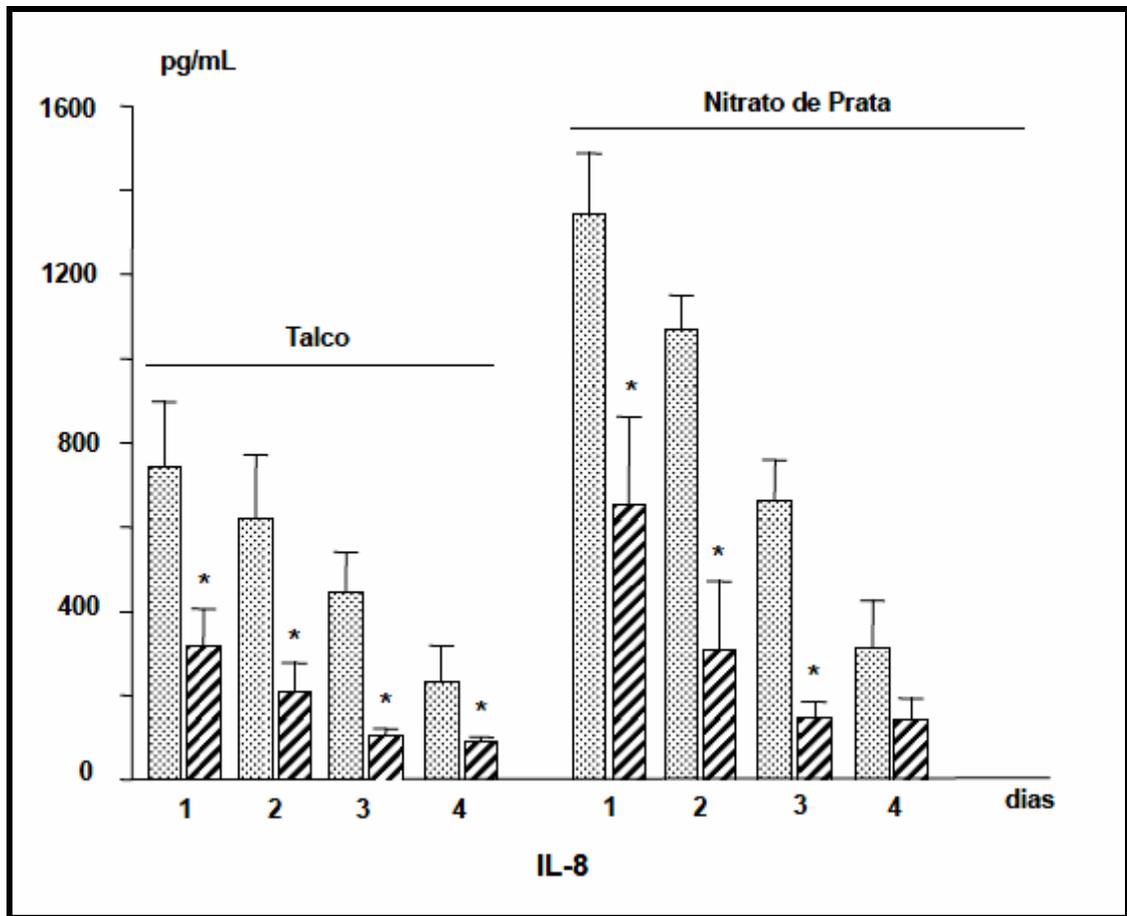


Gráfico 5B: Comparação entre níveis de IL-8 nos grupos talco e nitrato de prata, com e sem administração prévia de bevacizumab (* $p < 0,05$) (▨ sem bevacizumab ▨ com bevacizumab) .

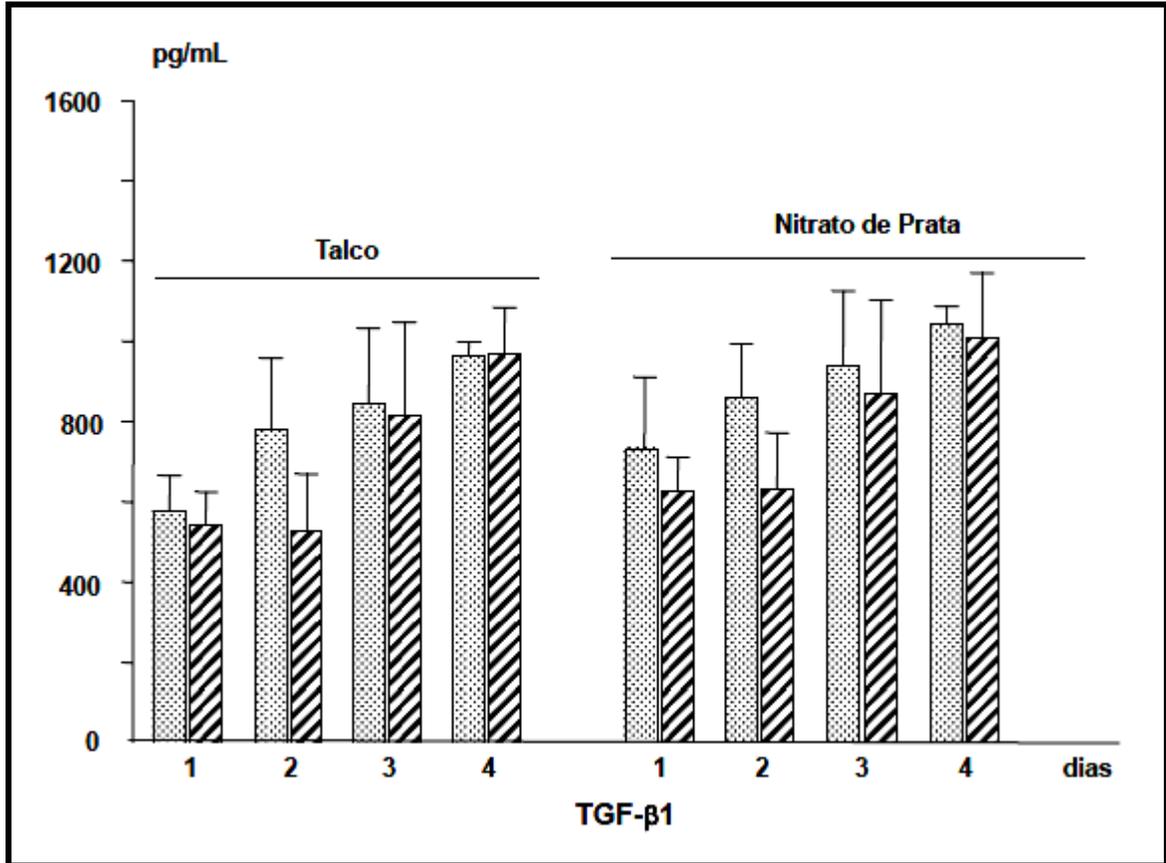


Gráfico 5C: Comparação entre níveis de TGF- β 1 nos grupos talco e nitrato de prata, com e sem administração prévia de bevacizumab (* $p < 0,05$) (▨ sem bevacizumab ▩ com bevacizumab).

A permeabilidade vascular pleural foi avaliada pela injeção intravenosa de Azul de Evans. Animais pré-tratados com bevacizumab demonstraram uma quantidade significativamente menor de extravasamento de corante para a cavidade pleural três dias após a injeção de talco (170 ± 22 vs 41 ± 15 ; $p=0,01$) ou do nitrato de prata (346 ± 64 vs 203 ± 45 ; $p=0,034$; Gráfico 6).

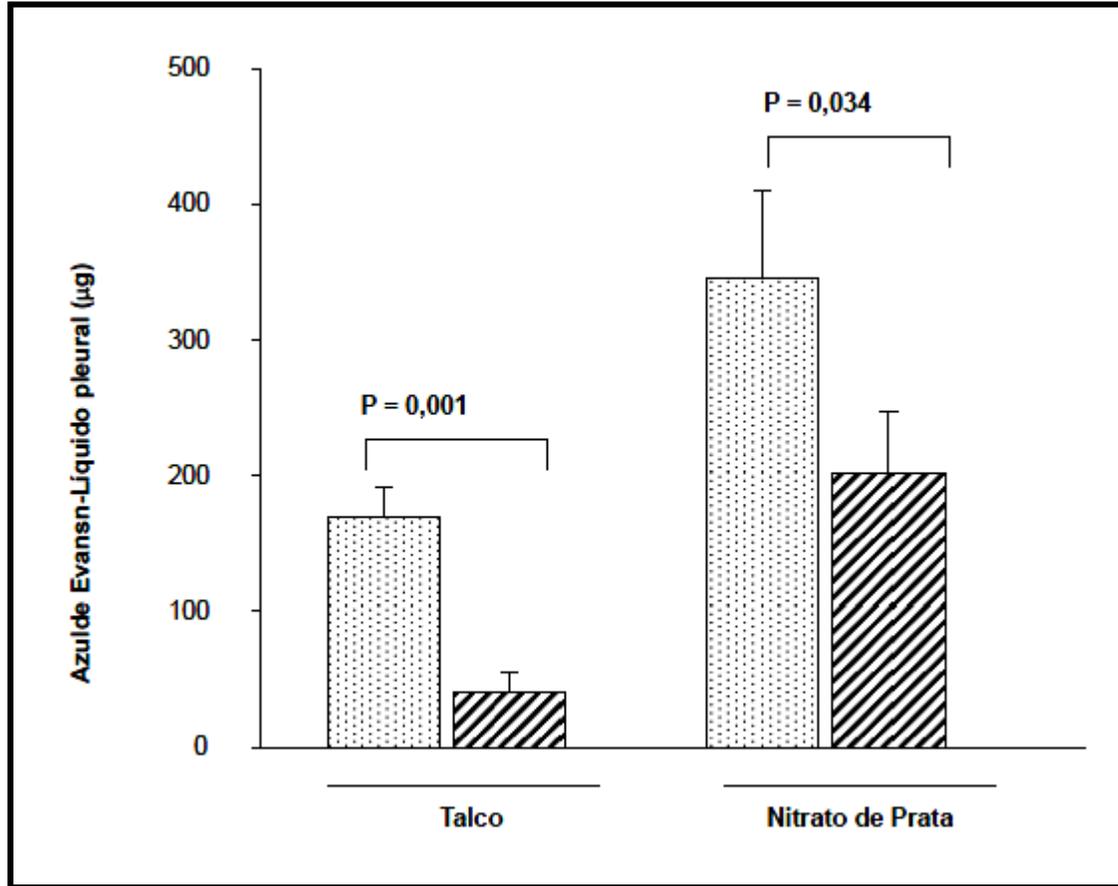


Gráfico 6: Comparação entre níveis de Azul de Evans nos grupos talco e nitrato de prata, com e sem administração prévia de bevacizumab. (▨ sem bevacizumab ▩ com bevacizumab).

4.2- Avaliação macroscópica

4.2.1- Fase precoce

A administração de anticorpo monoclonal anti-VEGF antes da injeção intrapleural dos agentes esclerosantes resultou em redução significativa dos escores de aderências macroscópicas em 3 ($1,7 \pm 0,8$ vs $0,0 \pm 0,0$; $p=0,008$) e

4 ($1,1 \pm 0,5$ vs $0,2 \pm 0,4$; $p=0,032$) dias no grupo talco e nos dias 3 ($2,0 \pm 0,6$ vs $0,6 \pm 0,5$; $p=0,005$), 4 ($2,5 \pm 0,5$ vs $0,8 \pm 0,4$; $p<0,001$) e 7 ($2,1 \pm 0,1$ vs $0,9 \pm 0,2$; $p=0,039$) no grupo nitrato de prata (Gráfico 7).

Em nenhum animal foi evidenciado sinais de empiema ou hemotórax. Não foram observadas aderências macroscópicas no hemitórax esquerdo.

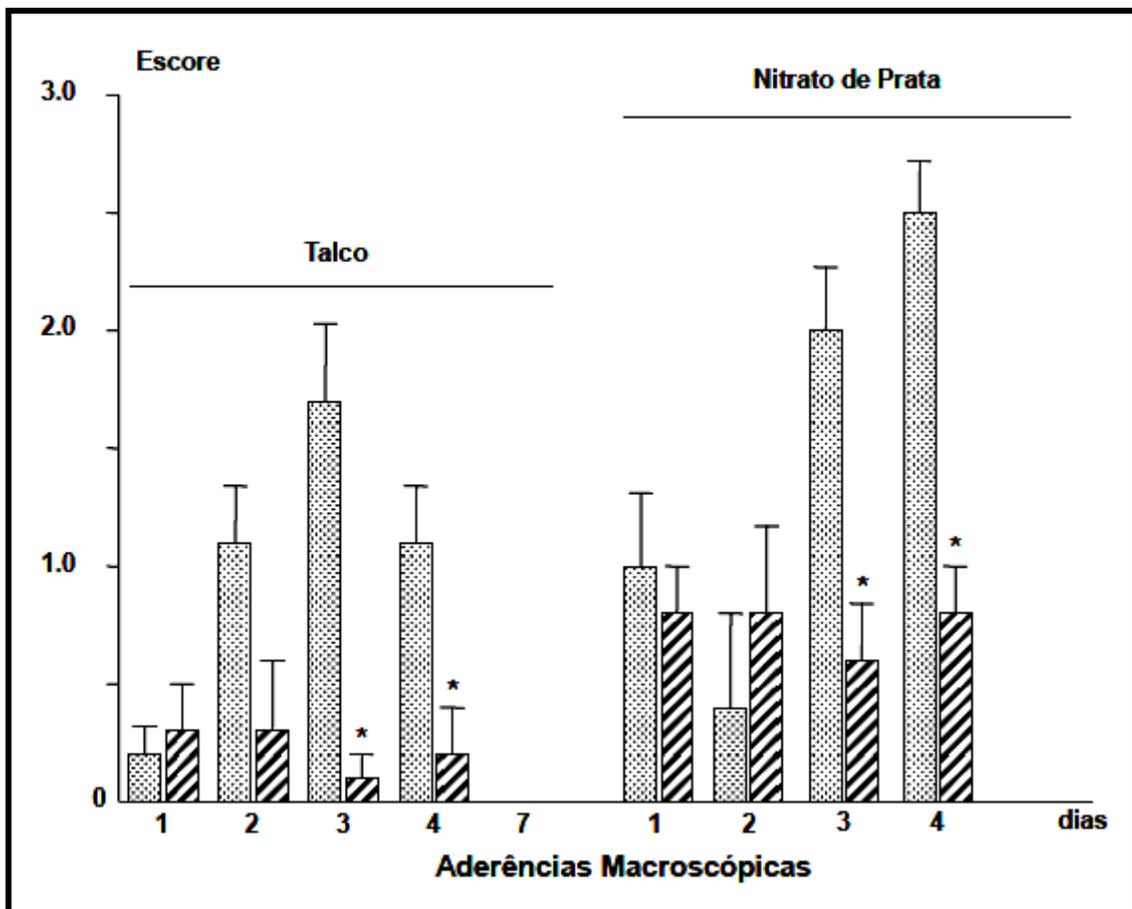


Gráfico 7: Comparação entre os escores de aderências macroscópicas entre os grupos talco e nitrato de prata, com e sem administração prévia de bevacizumab (* $p<0,05$).

(▨ sem bevacizumab ▩ com bevacizumab) .

4.2.2- Fase tardia

A administração de anticorpo monoclonal anti-VEGF resultou em redução significativa dos escores de aderências pleurais após 7 ($1,6 \pm 0,2$ vs $0,7 \pm 0,4$; $p=0,001$), 14 ($2,2 \pm 0,1$ vs $1,0 \pm 0,2$; $p=0,01$) e 28 ($2,3 \pm 0,2$ vs $1,4 \pm 0,1$; $p=0,029$) dias no grupo talco e em 14 ($3,1 \pm 0,6$ vs $1,9 \pm 0,1$; $p=0,002$) e 28 dias ($3,8 \pm 0,2$ vs $1,5 \pm 0,3$; $p=0,008$) no grupo nitrato de prata (Gráfico 8).

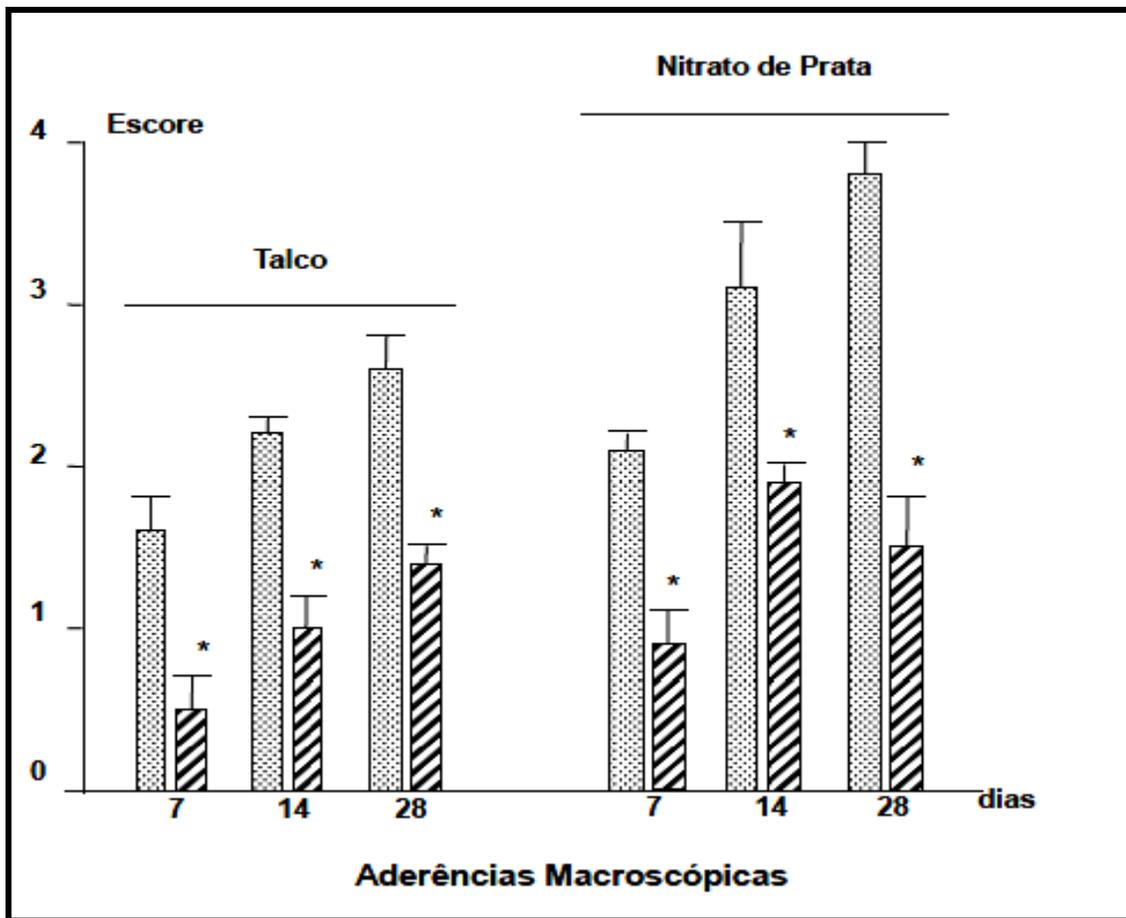


Gráfico 8: Comparação entre os escores de aderências macroscópicas na fase crônica entre os grupos talco e nitrato de prata, com e sem administração prévia de bevacizumab (* $p < 0,05$)

(▨ sem bevacizumab ▨ com bevacizumab) .

4.3- Avaliação Microscópica

4.3.1- Fase precoce

As alterações inflamatórias pleurais foram discretas, não havendo diferença entre os animais que receberam bevacizumab independentemente dos esclerosantes injetados.(Gráfico 9).

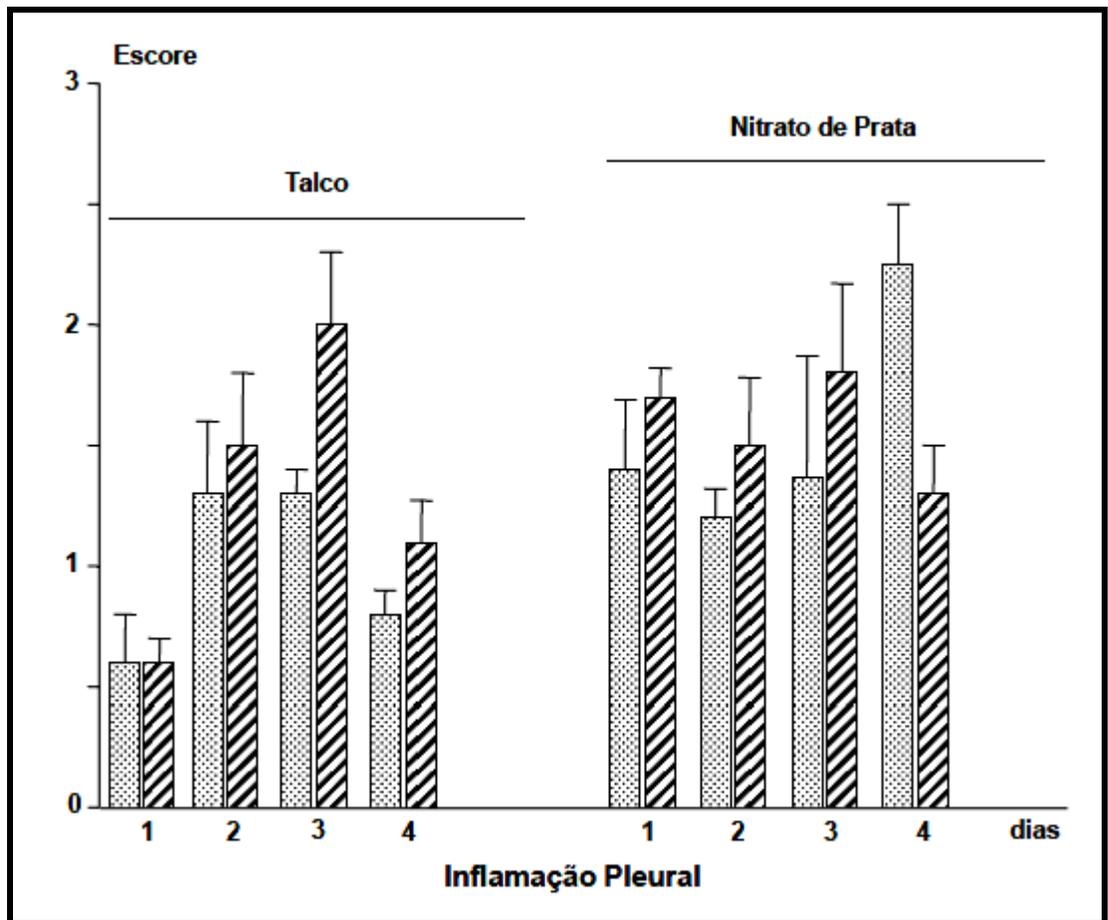


Gráfico 9: Comparação entre os escores de inflamação pleural entre os grupos talco e nitrato de prata, com e sem administração prévia de bevacizumab (* $p < 0,05$)

(sem bevacizumab com bevacizumab) .

A fibrose pleural foi progressiva ao longo do tempo, chegando a um escore máximo de 2,3 no 4º dia no grupo talco e de 2,6 no grupo nitrato (Gráfico 10). Não houve alteração significativa da fibrose nos animais que receberam anti-VEGF.

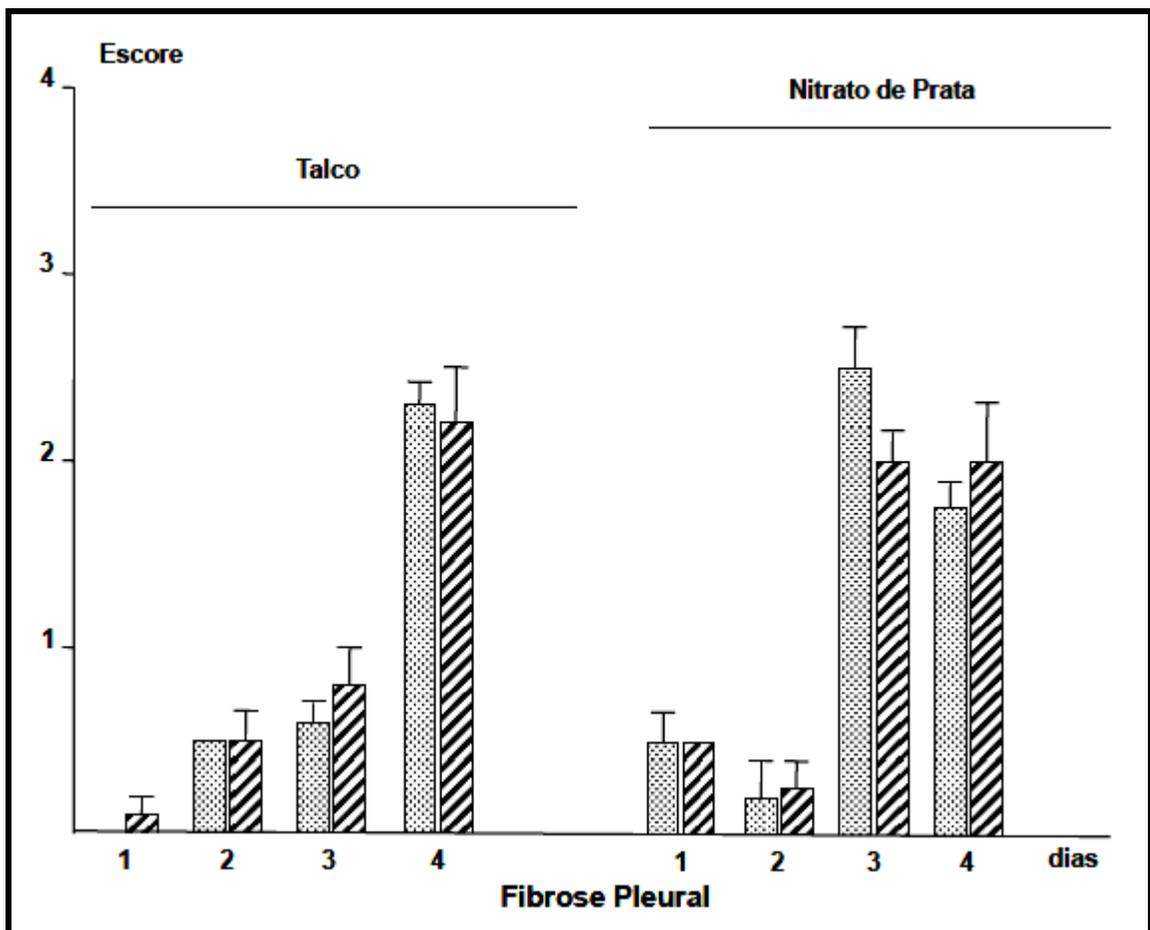


Gráfico 10: Comparação entre os escores de fibrose e entre os grupos talco e nitrato de prata, com e sem administração prévia de bevacizumab (* $p < 0,05$) (▨ sem bevacizumab ▩ com bevacizumab) .

4.3.2- Fase Tardia

Na fase tardia as alterações inflamatórias também foram discretas em ambos os grupos. Não houve diferença significativa relacionada à administração prévia de bevacizumab (Gráfico 11).

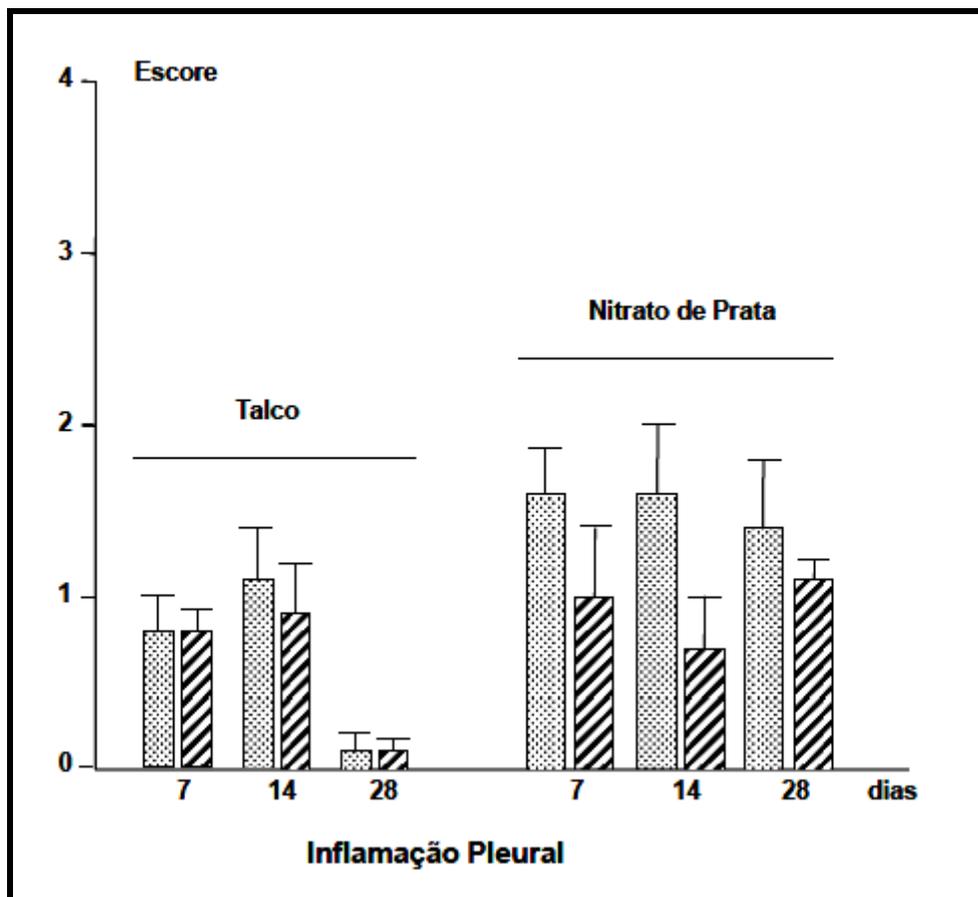


Gráfico 11: Comparação entre os escores de inflamação pleural entre os grupos talco e nitrato de prata, com e sem administração prévia de bevacizumab (* $p < 0,05$) (▣ sem bevacizumab ▨ com bevacizumab) .

Em relação à fibrose pleural, o bevacizumab não alterou os escores no grupo que recebeu talco. Entretanto, promoveu uma redução significativa dos escores após 14 ($1,9 \pm 0,3$ vs $3,4 \pm 0,3$, $p=0,029$) e 28 dias ($2,1 \pm 0,5$ vs $3,6 \pm 0,2$; $p=0,030$) nos animais que receberam nitrato de prata intrapleural (Gráfico 12).

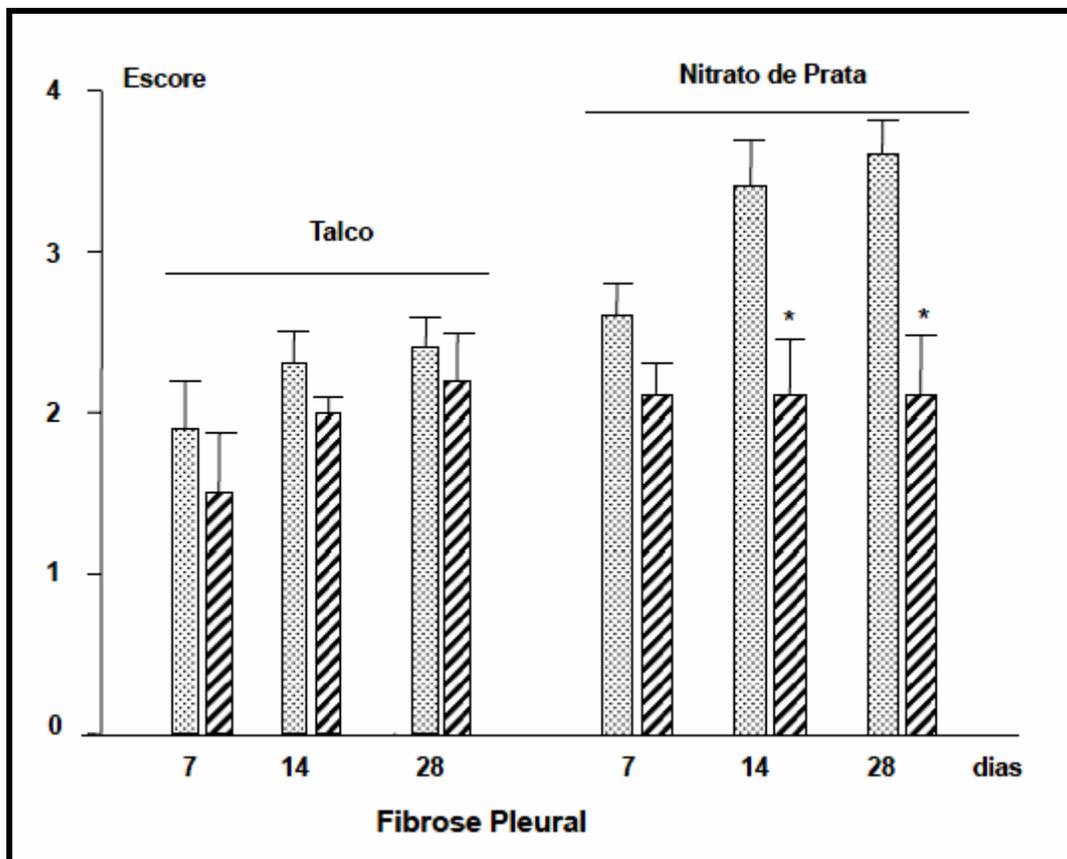


Gráfico 12: Comparação entre os escores de fibrose pleural entre os grupos talco e nitrato de prata, com e sem administração prévia de bevacizumab (* $p<0,05$).

(▨ sem bevacizumab ▨ com bevacizumab).

A densidade vascular (vasos/campo) na pleura visceral foi reduzida nos animais que receberam injeção prévia de bevacizumab (Gráfico 13). Nos grupos que receberam talco intrapleural, a densidade vascular foi menor após 7 ($10,2 \pm 2,3$ vs $2,9 \pm 0,9$; $p = 0,039$), 14 ($12,9 \pm 0,8$ vs $3,2 \pm 0,3$; $p < 0,001$) e 28 dias ($4,1 \pm 0,5$ vs $0,7 \pm 0,05$; $p = 0,002$). Comportamento similar foi observado nos animais que receberam nitrato de prata, demonstrando uma redução significativa em 7 ($7,8 \pm 1,6$ vs $2,8 \pm 0,1$; $p = 0,035$), 14 ($11,8 \pm 4,6$ vs $3,5 \pm 1,3$; $p = 0,03$) e 28 dias ($6,6 \pm 2,1$ vs $2,5 \pm 0,7$; $p = 0,049$).

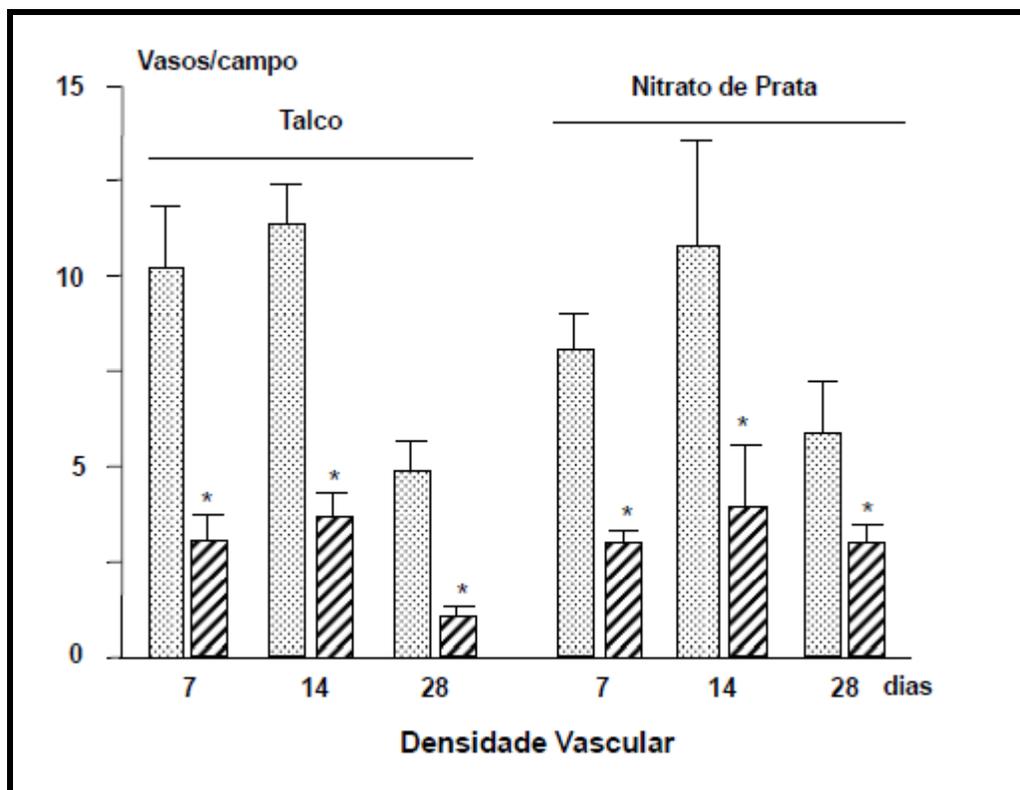


Gráfico 13: Densidade vascular nos grupos talco e nitrato de prata, com e sem administração prévia de bevacizumab (* $p < 0,05$).

(▨ sem bevacizumab ▩ com bevacizumab).

A pré-medicação com bevacizumab não interferiu na medida do espessamento pleural, nos animais que receberam talco intrapleural. Nos submetidos à injeção de nitrato pleural, o anti-VEGF reduziu significativamente a medida de espessamento pleural em 7 ($116,5 \pm 39,5$ vs $35,9 \pm 5,2$; $p=0,043$), 14 ($120,5 \pm 10,5$ vs $55,6 \pm 22,3$; $p=0,047$) e 28 (195 ± 27 vs $95,3 \pm 22,5$; $p=0,007$) dias (Gráfico 14).

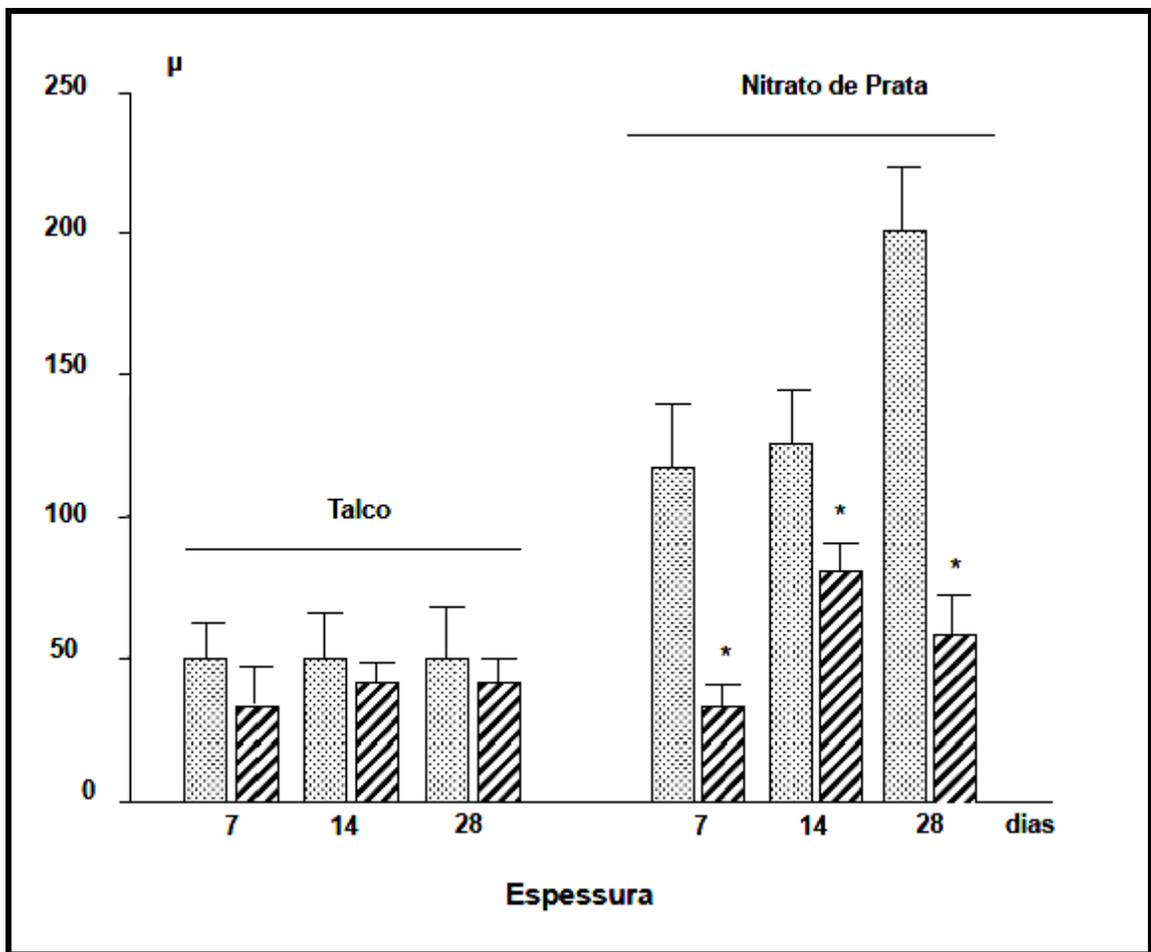


Gráfico 14: Influência da administração prévia de bevacizumab endovenoso sobre o espessamento pleural nos grupos talco e nitrato de prata (* $p<0,05$).
(sem bevacizumab com bevacizumab).

Os gráficos 15 a 18 demonstram os resultados obtidos na avaliação e quantificação do colágeno. Nos animais submetidos à pleurodese com talco, não houve influência do tratamento com bevacizumab sobre a quantidade de colágeno I, III ou total e na proporção entre os tipos de colágeno. No grupo nitrato, observa-se redução da quantidade de colágeno total (Gráfico 15) após 14 (3139 ± 925 vs 1182 ± 424 , $p = 0,01$) e 21 dias (5106 ± 1593 vs 1275 ± 255 , $p = 0,49$), às custas da redução tanto da quantidade de colágeno III (Gráfico 16) como de colágeno I (Gráfico 17). A administração de bevacizumab não modificou de forma significativa a proporção de cada um dos tipos de colágeno (Gráfico 18).

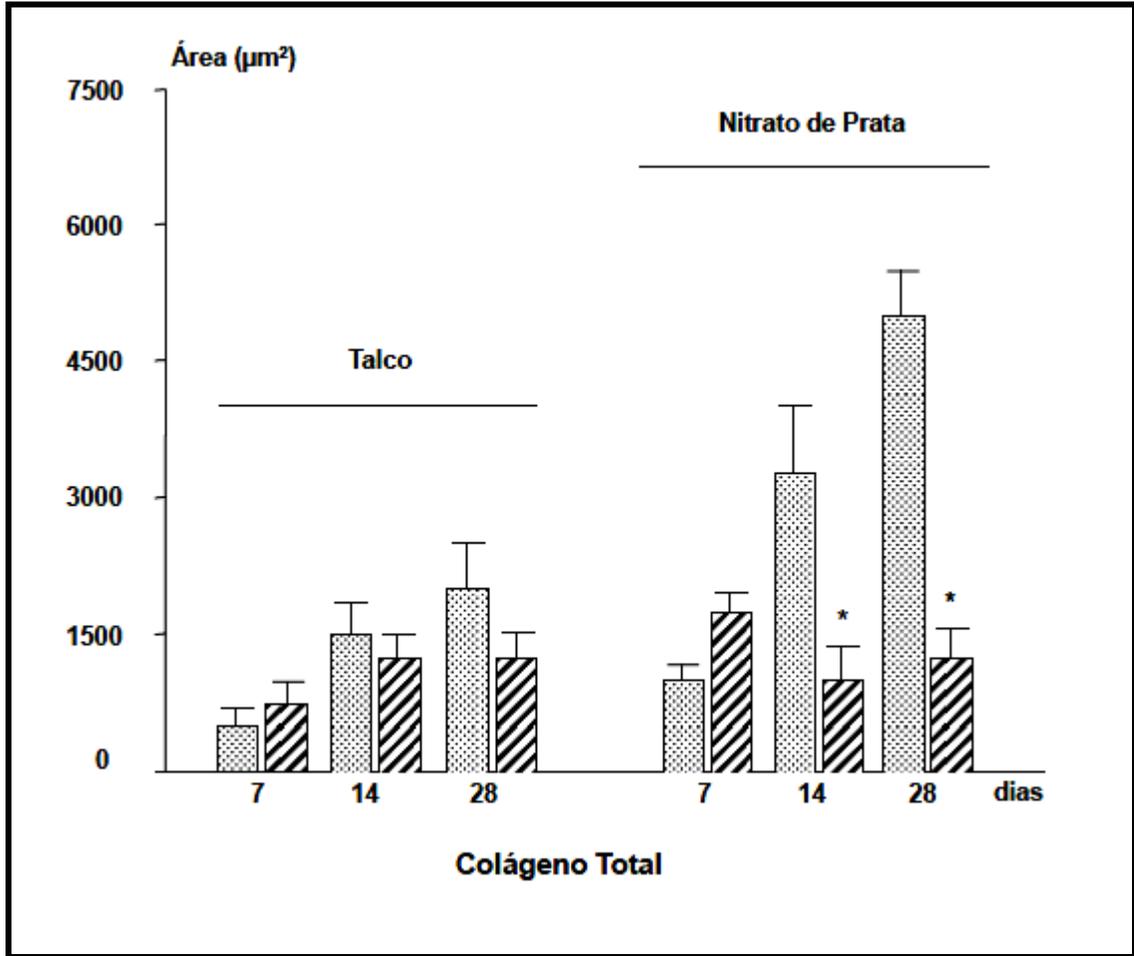


Gráfico 15: Influência da administração prévia de bevacizumab endovenoso sobre o colágeno total nos grupos talco e nitrato de prata (* p<0,05).

(▨ sem bevacizumab ▩ com bevacizumab).

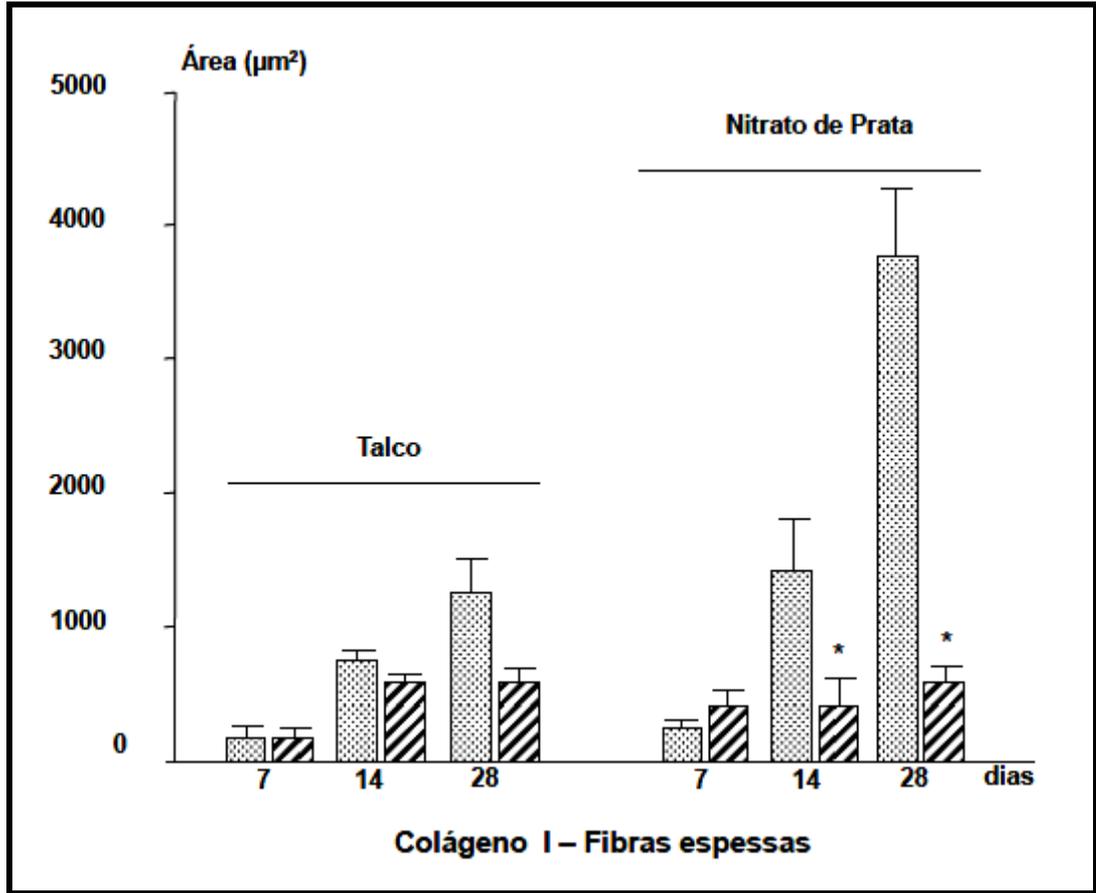


Gráfico 16: Influência da administração prévia de bevacizumab endovenoso sobre o colágeno tipo I nos grupos talco e nitrato de prata (* $p < 0,05$).
 (▨ sem bevacizumab ▨ com bevacizumab).

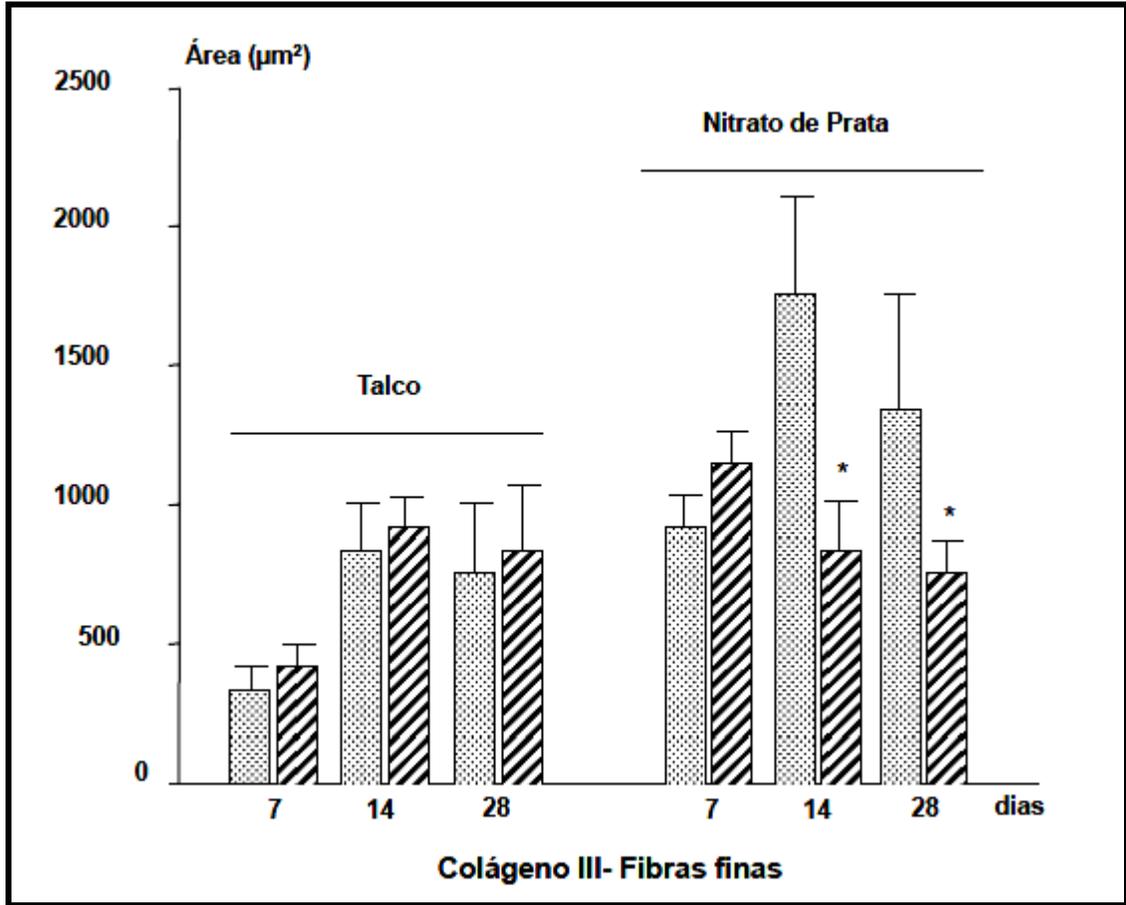


Gráfico 17: Influência da administração prévia de bevacizumab endovenoso sobre o colágeno tipo III nos grupos talco e nitrato de prata (* $p < 0,05$).

(▨ sem bevacizumab ▨ com bevacizumab).

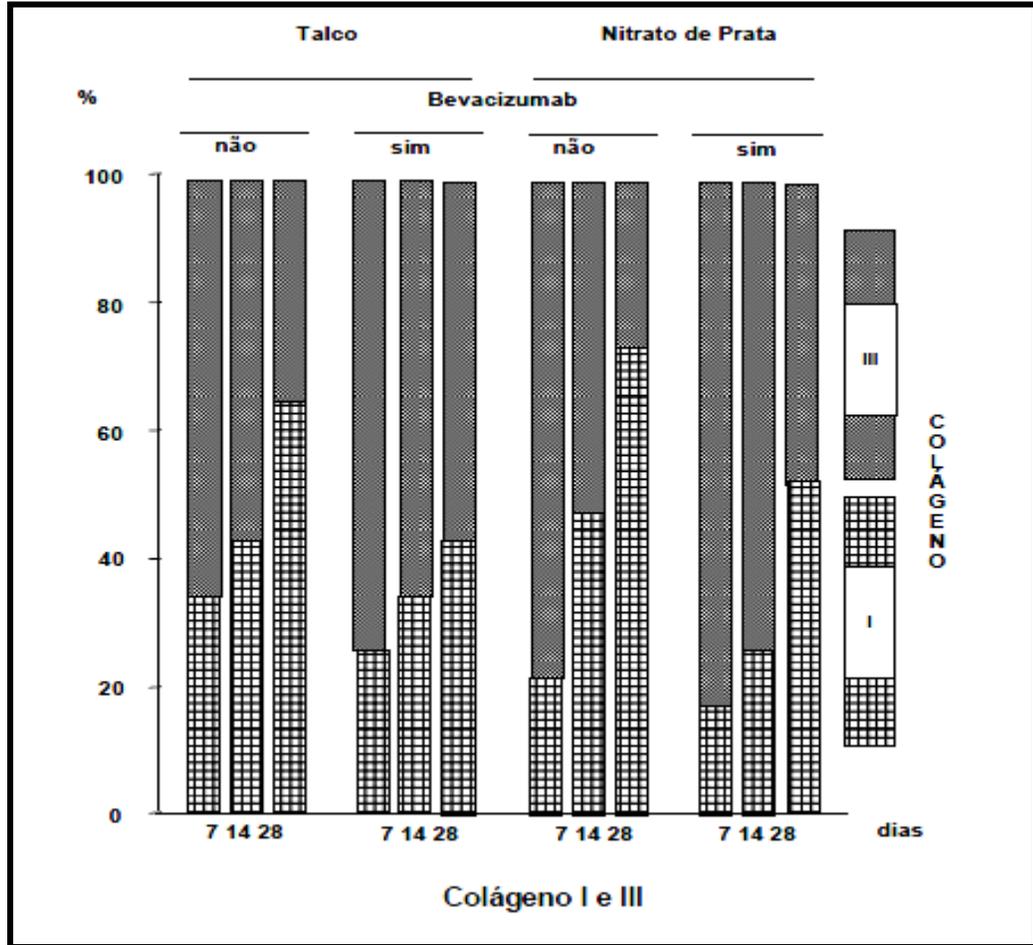


Gráfico 18: Influência da administração prévia de bevacizumab endovenoso sobre a distribuição dos tipos de colágeno nos grupos talco e nitrato de prata (* $p < 0,05$) (▣ sem bevacizumab ▤ com bevacizumab).

5- DISCUSSÃO

5- DISCUSSÃO

Este trabalho tem como objetivo a avaliação do bloqueio do VEGF em um modelo experimental de pleurodese. Observamos que a utilização de um anti-VEGF, em uma fase inicial, reduziu a formação de líquido pleural provavelmente pela interferência na produção de citocinas como o VEGF e IL-8 e na permeabilidade pleural. Em uma fase tardia, observamos redução da densidade vascular e das aderências pleurais, independentemente do esclerosante utilizado.

A redução da formação de líquido pleural na fase precoce em nosso experimento corrobora com os achados de estudos anteriores que utilizaram modelos de derrame neoplásico, confirmando a importância do VEGF na fase precoce da formação do líquido pleural e peritoneal^[20,21]. Marchi e colaboradores^[6,29] estudaram a reação inflamatória aguda após a injeção de talco e nitrato de prata observando níveis significativamente mais elevados de VEGF sérico e pleural em comparação aos animais do grupo controle. Os autores demonstraram também que animais tratados com nitrato de prata apresentaram maiores volumes de líquido pleural e uma reação inflamatória mais intensa, com níveis de VEGF significativamente mais elevados no líquido pleural do que no sangue.

Nosso estudo confirma estes achados. Observamos a formação de volumes de líquido maiores nos animais tratados com nitrato de prata, elevação dos níveis de VEGF após a injeção dos esclerosantes e, principalmente,

notamos uma redução significativa do volume de líquido pleural e dos níveis de IL-8 nos animais tratados com bevacizumab, sugerindo inibição do processo inflamatório agudo mediado por citocinas. Stathopoulos e colaboradores demonstraram redução do volume de derrame pleural em um modelo de derrame neoplásico em camundongos ao interferir com a via do fator nuclear κ B. Ao estudar a concentração pleural de corante após injeção endovenosa de Azul de Evans endovenoso, ele estimou a permeabilidade pleural^[32].

A mesma técnica foi utilizada no presente estudo, demonstrando redução de permeabilidade vascular como um dos mecanismos de ação do VEGF na produção de líquido pleural.

Outro aspecto importante foi a interferência do VEGF na formação de fibrose pleural. Em um estudo recente foram avaliados os níveis de IL-8, fator de necrose tumoral α , interleucina 1β , VEGF e inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 após múltiplas toracocenteses. Os autores observaram que níveis elevados de VEGF e das demais citocinas pro-inflamatórias estão correlacionados com a presença de fibrina na ultrassonografia de tórax, sugerindo uma relação entre VEGF e presença de fibrina e loculações pleurais^[35].

Esta hipótese parece ser reforçada com os nossos resultados onde ao inibir a ação do VEGF observamos redução significativa do número de aderências pleurais macroscópicas tanto na fase precoce como na fase tardia.

Paradoxalmente, não houve redução significativa no escore microscópico de fibrose ou nos níveis de TGF β .

O mecanismo fisiopatológico associado à pleurodese envolve vários fatores, mas aparentemente o ponto comum é a lesão provocada pelo agente esclerosante nas células mesoteliais. Acredita-se que é esta lesão que culmina na formação do líquido pleural exsudativo, que precede a deposição de fibrina e colágeno, levando ao espessamento pleural e formação de adesões entre os dois folhetos, com conseqüente sínfise.

Guo e colaboradores observaram redução da efetividade da pleurodese com TGF β ao utilizar anticorpos anti-VEGF^[36]. Os autores acreditam que a redução de permeabilidade vascular e de angiogênese causados pelo bloqueio do VEGF são responsáveis pela inibição da pleurodese. Este achado, confirmado em nosso estudo, reforça a importância do binômio aumento de permeabilidade vascular/angiogênese para o desenvolvimento de pleurodese eficaz. Na fase tardia observamos que o bevacizumab reduziu as aderências macroscópicas e promoveu diminuição significativa da densidade vascular na indução da pleurodese com os dois agentes. Entretanto, a diminuição da quantidade de fibras de colágeno, resultando em um espessamento pleural menor foi observada somente nos animais que receberam nitrato de prata.

Quando o esclerosante utilizado foi o talco, que produz menor exsudação pleural, a redução na angiogênese parece ter pouca influência na deposição de colágeno. No entanto, a redução na quantidade de aderências macroscópicas

sugere que a administração de anti-VEGF pode interferir na pleurodese com talco.

Quando o agente utilizado foi o nitrato de prata, a ação do bevacizumab sobre as mudanças arquiteturais da pleura foi mais evidente. Além da redução na quantidade de aderências e da densidade vascular, houve redução significativa da deposição de colágeno e do espessamento pleural, com impacto direto na pleurodese. Ao estudar o remodelamento após pleurodese e com talco e nitrato, Genofre e colaboradores observaram que a fase proliferativa, caracterizada por produção abundante de matriz extracelular por miofibroblastos, é mais intensa quando se utiliza o nitrato esclerosante^[9]. Talvez por isto, a ação do bevacizumab foi mais facilmente demonstrada na pleurodese com nitrato.

Nosso estudo apresenta algumas limitações. Dados obtidos através de estudos experimentais devem ser cuidadosamente analisados antes de ser extrapolados para a prática clínica.

A amostra total utilizada é de 152 animais, porém a cada tempo de estudo temos entre 5 e 8 animais em cada grupo, o que pode ser considerado uma amostra pequena. No entanto, nosso objetivo principal era o de observar e analisar cada etapa do processo inflamatório, angiogênese e fibrose e a influência de um anticorpo anti VEGF. Alguns destes fenômenos foram anteriormente descritos de forma adequada com amostra de tamanho semelhante ^[6] e não seria ético utilizar um número maior de animais do que o

estritamente necessário. Outro ponto importante é que o nosso modelo induz inflamação e formação de líquido em uma cavidade pleural previamente normal, talvez não reproduzindo perfeitamente a doença pleural. Apesar disto, os resultados obtidos previamente com este modelo foram confirmados posteriormente através de estudos em humanos^[30,37]. Ao extrapolar os resultados obtidos neste trabalho para a prática clínica, podemos inferir que a indução de pleurodese em paciente que utiliza drogas anti-VEGF pode resultar em sínfise incompleta da cavidade pleural, prejudicando o sucesso do procedimento. A redução da formação de líquido pleural observada na fase precoce do experimento reitera a importância do VEGF na formação do líquido pleural, sugerindo um possível papel do bloqueio desta citocina na terapêutica de derrames pleurais.

6- CONCLUSÃO

6- CONCLUSÃO

- A administração de esclerosantes na pleura gera um processo inflamatório agudo, e a administração prévia de bevacizumab interfere na ação de citocinas como VEGF e IL-8 reduzindo a formação de líquido pleural;
- O aumento da permeabilidade vascular, dependente do VEGF, é um mecanismo importante da formação de líquido pleural e pode ser bloqueado através de drogas anti-VEGF;
- A administração de anti-VEGF reduz a quantidade de aderências e a densidade vascular, interferindo na intensidade da pleurodese;

Nossos achados demonstram que o bloqueio do VEGF interfere com a efetividade da pleurodese. Portanto, sugerimos que pode haver redução da eficácia da pleurodese induzida com talco ou nitrato de prata em pacientes que utilizam medicações anti-VEGF.

7- REFERÊNCIAS

7- REFERÊNCIAS

- 1- Vargas FS, Teixeira LR, Marchi E. Derrame Pleural. 1ª. Ed. São Paulo: Editora Roca, 2004.
- 2- Noppen M, De Waele M, Li R, Gucht KV, D'Haese J, Gerlo E, et al. Volume and cellular content of normal pleural fluid in humans examined pleural lavage. Am J Respir Crit Care Med 2000;162:1023-6.
- 3- Hooper C, Gary Lee YC, Maskell N, on behalf of the BTS pleural guideline group. Investigation of a unilateral pleural effusion in adults. British Thoracic Society pleural disease guideline 2010. Thorax 2010;65(Suppl2):ii4-ii17.
- 4- Bethune N. Pleural poudrage: new technique for deliberate production of pleural adhesions as preliminary to lobectomy. J Thoracic Cardiovasc Surg 1935;4:251-61.
- 5- Vaz MC, Marchi E Vargas FS. Pleurodese: técnica e indicações. J Bras Pneumol 2006;32(4):347-56.
- 6- Marchi E, Vargas FS, Teixeira LR, Acencio MMP, Antonangelo L, Light R. Intrapleural low-dose silver nitrate elicits more pleural inflammation and less systemic inflammation than low-dose talc. Chest 2005;128:1798-804.

- 7- Broaddus VC, Hébert CA, Vitangcol RV, Hoeffel JM, Bernstein MS, Boylan AM. Interleukin-8 is a major chemotactic factor in pleural liquid of patients with empyema. *Am Rev Respir Dis* 1992;146(4):825-30.
- 8- Ceyhan B, Ozgun S, Çelikel T, Yalçın M, Koç M. IL-8 in pleural effusion. *Respir Med* 1996;90:215-21.
- 9- Genofre EH, Vargas FS, Antonangelo L, Teixeira LR, Marchi E, Capellozzi V. Ultrastructural acute features of active remodeling after chemical pleurodesis induced by silver nitrate or talc. *Lung* 2005;183:197-207.
- 10- Mutsaers S, Kalomenidis I, Wilson N, Gary Lee YC. Growth factors in pleural fibrosis. *Curr Opin Pulmon Med* 2006;12:251-8.
- 11- Kalomenidis I, Guo Y, Lane K, Hawthorne M, Light R. Transforming Growth Factor- β 3 induces pleurodesis in rabbits and collagen production of human mesothelial cells. *Chest* 2005;127:1335-40.
- 12- Sack U, Hoffmann M, Zhao XJ, Chan KS, Hui DS, Gosse H et al. Vascular endothelial growth factor in pleural effusions of different origin. *Eur Respir J*. 2005;25:600-4.
- 13- Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997;18:4-25.
- 14- Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995;146:1029-39.

- 15- Rifkin DB, Moscatelli D, Bizik J, Quarto N, Blei F, Dennis P et al. Growth factor control of extracellular proteolysis. *Cell Differ Dev* 1990;32:313-8.
- 16- Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor and its receptors. *FASEB J* 1999;13(1):9-22.
- 17- Berse B, Brown LF, Van de WL, Dvorak HF, Senger DR. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) is expressed differentially in normal tissues, macrophages and tumors. *Mol Biol Cell* 1992;3:211-20.
- 18- Mohammed KA, Nasreen N, Hardwick J, Logie CS, Patterson CE, Antony VB. Bacterial induction of pleural monolayer barrier dysfunction. *Am J Physiol Lung Cell Moll Physiol* 2001;281:119-25.
- 19- Roberts WG, Palade GE. Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *J Cell Sci* 1995;108:2369-79.
- 20- Yano S, Herbst RS, Shinohara H, Knigton B, Bucana CD, Killion JJ et al. Treatment for malignant pleural effusion of human lung adenocarcinoma by inhibition of vascular endothelial growth factor tyrosine kinase phosphorylation. *Clin Cancer Res* 2000;6:957-65.
- 21- Mesiano S, Ferrara N, Jaffe RB. Role of vascular endothelial growth factor in ovarian cancer: inhibition of ascites formation by immunoneutralization. *Am J Pathol* 1998;153:1249-56.

- 22- Cheng D, Rodriguez RM, Perkett EA, Rogers J, Bienvenu G, Lappalainen U et al: Vascular endothelial growth factor in pleural fluid. *Chest* 1999;116:760-5.
- 23- Cheng DS, Lee YC, Rogers JT, Parkett EA, Moyers JP, Rodriguez M et al: Vascular endothelial growth factor level correlates with transforming growth factor beta isoforms levels in pleural effusions. *Chest* 2000,118:1747-53.
- 24- Sasse SA, Jadus MR, Kukes GD. Pleural fluid transforming growth factor-beta1 correlates with fibrosis in experimental empyema. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168(6):700-5.
- 25- Presta LG, Chen H, O'Connor SJ, Chisholm V, Meng YG, Krummen L et al. Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Res* 1997; 57(20):4593-9.
- 26- Shih T, Lindley C. Bevacizumab: an angiogenesis inhibitor for solid malignancies. *Clin Ther* 2006;28(11):1779-802.
- 27- Pichelmayer O, Zielinsky C, Raderer M. Response of a nonmalignant pleural effusion to bevacizumab. *N Engl J Med* 2005;353:740-1.
- 28- Yabe H, Yabe M, Koike T, Shimizu T, Morimoto T, Kato S. Rapid improvement of life-threatening capillary leak syndrome after stem cell transplantation by bevacizumab. *Blood* 2010;115(13):2723-4.

- 29- Marchi E, Vargas FS, Acencio MM, Antonangelo L, Teixeira LR, Genofre EH et al. Talc and silver nitrate induce systemic inflammatory effects in the acute phase of experimental pleurodesis in rabbits. *Chest* 2004;125:2268-77.
- 30- Vargas FS, Teixeira LR, Vaz MA, Carmo AO, Marchi E, Cury P et al. Silver nitrate is superior to talc slurry in producing pleurodesis in rabbits. *Chest* 2000;118:808-13.
- 31- Teixeira LR, Vargas FS, Acencio MMP, Paz PPF, Antonangelo L, Vaz MAC, Marchi E. Influence of antiinflammatory drugs (methylprednisolone and diclofenac sodium) in experimental pleurodesis induced by silver nitrate or talc. *Chest* 2005;128:4041-5.
- 32- Stathopoulos GS, Zhu Z, Everhart MB, Kalomenidis I, Lawson WE, Bilaceroglu S et al: Nuclear Factor- κ B Affects Tumor Progression in a Mouse Model of Malignant Pleural Effusion. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006;34(2):142-50.
- 33- Antonangelo L, Vargas FS, Teixeira LR, Acencio MMP, Vaz MAC, Terra Filho M et al. Pleurodesis induced by talc or silver nitrate: evaluation of collagen and elastic fibers in pleural remodeling. *Lung* 2006;184:105-11.
- 34- Detmar M, Brown LF, Schön MP, Elicker BM, Velasco P, Richard L et al. Increased microvascular density and enhanced rolling and adhesion in the skin of VEGF transgenic mice. *J Invest Dermatol* 1998;111:1-6.

- 35- Chung CL, Yeh CY, Sheu JR, Chen YC, Chang SC. Repeated thoracentesis affect proinflammatory cytokines, vascular endothelial growth factor and fibrinolytic activity in pleural transudates. *Am J Med Sci* 2007;334:452-7.
- 36- Guo, YB, Kalomenidis I, Hawthorne M, Parman KS, Lane KB, Light RW. Pleurodesis is inhibited by vascular endothelial growth factor antibody. *Chest* 2005;128:1790-7.
- 37- Paschoalini M, Vargas FS, Marchi E, Pereira JS, Jatene FB, Antonangelo L et al. Prospective randomized trial of silver nitrate versus talc slurry in pleurodesis for symptomatic pleural effusions. *Chest* 2005;128:684-9.