

Reacção subclínica do pulmão profundo à amiodarona Subclinical pulmonary reaction to Amiodarone

FREITAS M.S.¹, PEGO A.², ROBALO CORDEIRO C.³, MORAIS M.E.⁴, MORAIS J.⁵, LIMA M.A.⁶, SOUSA A.², MACEDO M.², TEIXEIRA A.M.⁷, NOGUEIRA L.M.⁸, LEITE I.², ALCOBIA C.³, ROBALO CORDEIRO A.J.A.⁹.

SERVIÇO DE CARDIOLOGIA DOS HOSPITAIS DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA (H.U.C.)
(Dir. Prof. LUÍS PROVIDÊNCIA)
CENTRO DE PNEUMOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA (Cn C3 - INIC)
(Dir. Prof. ROBALO CORDEIRO)

RESUMO

Com a finalidade de se avaliarem as reacções precoces do pulmão à acção da Amiodarona, estudaram-se 21 doentes sem alterações clínico-radiológicas pulmonares tratados com aquele fármaco (200 mg/dia em 18 doentes e com 100, 300 e 400 mg/dia nos restantes 3). O período de tratamento variou entre 6 meses e 9 anos, o que aconselhou a divisão dos doentes em 2 grupos (Grupo I: < 24 meses, média de 11.65 ± 6.3 meses, n=13; Grupo II: ≥ 24 meses, média de 48.75 ± 26.53 meses, n=8).

Todos os indivíduos foram submetidos, voluntariamente a lavagem broncoalveolar (LBA) para estudos de celularidade; expressão antigénica CD22, CD2, CD4, CD8, CD56, HLA-DR; doseamento de fosfolípidos totais e sua caracterização. No sangue periférico estudaram-se os fenótipos linfocitários CD22, CD2, CD4, CD8, CD56 e realizou-se o teste de transformação linfoblástica (TTL) à

Summary

With the purpose of evaluating the pulmonary changes during long term therapy with Amiodarone, the authors have studied 21 patients (Pts) treated with this drug (200 mg/d in 18 Pts; 100, 300 and 400 mg/day in the remaining 3).

The treatment lasted from 6 months to 9 years, and according to this the studied population was divided into two groups: Gr. I - less than 24 months (11.65 ± 6.3), n = 13; Gr. II - more than 24 months (48.75 ± 26.53), n = 8.

After declared consent, all the patients were submitted to bronchoalveolar lavage (BAL) for differential cell count; phenotyping of lymphocytes CD22, CD2, CD4, CD8, CD56, HLA-DR; total and fractioned phospholipids.

Venous blood was collected to study the lymphocytic phenotypes and specific lymphoblastic transformation test (Amiodarone).

¹ Professor Catedrático da Faculdade de Medicina de Coimbra e Chefe de Serviço de Cardiologia dos H.U.C.

² Assistente Eventual de Pneumologia dos H.U.C.

³ Interno de Pneumologia dos H.U.C.

⁴ Assistente Hospitalar Graduado de Cardiologia dos H.U.C.

⁵ Assistente Hospitalar de Cardiologia dos H.U.C.

⁶ Investigador - Auxiliar da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

⁷ Licenciada em Bioquímica - Bolseira do INIC para o Cn C3

⁸ Técnico Superior da Faculdade de Medicina de Coimbra

⁹ Professor Catedrático de Pneumologia da Faculdade de Medicina de Coimbra e Director do Serviço de Pneumologia dos H.U.C.

Amiodarona. A população de controlo era constituída por 17 voluntários normais. Como resultados estatisticamente significativos encontrou-se linfocitose no LLBA; elevação de linfócitos T (CD2) no LLBA e no sangue; diminuição de linfócitos B (CD22) no LLBA e sangue; elevação de CD4 no LLBA. Relativamente aos dois grupos, havia uma elevação de CD4 e uma diminuição de CD8 no LLBA no Grupo II.

O TTL à Amiodarona no sangue periférico encontrava-se positivo em 35% dos doentes.

Os resultados obtidos sugerem, já nesta fase inicial, um quadro de alveolite linfocitária, com amplificação da sua vertente auxiliadora, o que poderá dar início à cascata do envolvimento pulmonar desencadeada pela Amiodarona.

INTRODUÇÃO

A Amiodarona, fármaco com propriedades vasodilatadoras e antiarrítmicas, é largamente utilizada na Europa desde 1967 [3,4,5]. Usada, inicialmente, no tratamento da angina de peito, é hoje sobretudo aplicada na terapêutica antiarrítmica [4,5,7]. Classificada, farmacologicamente, como droga anfílica catiónica [4,17], a Amiodarona e o seu metabolito primário activo, desetilamiodarona, têm tendência a induzir uma acumulação fosfolipídica em certas células e tecidos, motivada pela inibição da fosfolipase A lisosómica, o que bloqueia a sua degradação [1, 4,8,9]. A incidência dos efeitos adversos associados à sua utilização varia entre 40 - 93 % e inclui perturbações da condução aurículo-ventricular, depósitos corneanos, hipertiroidismo, alterações hepáticas e neuropatias periféricas [4,5,10,16,19]. Mas é talvez a toxicidade pulmonar - que ocorre em cerca de 10% [12] - a que origina maior restrição à sua utilização.

A patogénese da lesão pulmonar induzida pela Amiodarona é controversa [2,11,13]. Enquanto alguns investigadores postulam que a droga é directamente tóxica para o pulmão [14,15] outros sugerem um efeito indirecto, envolvendo um mecanismo imune de mediação celular [15,16,25].

A análise do líquido de lavagem broncoalveolar (LLBA) de doentes e de animais de experiência com toxicidade pulmonar tem revelado uma linfocitose e uma inversão da relação CD4/CD8, classicamente atribuída à elevação de CD8+, achado que é compatível com uma reacção de hipersensibilidade. No entanto, este dado não tem sido sempre constante, encontrando-se alguns doentes com

The studied group was analyzed against a matched normal population of 17 voluntary people.

Statistically the most relevant results were:

- lymphocytosis in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF); higher levels of T lymphocytes both in the BALF and in the venous blood; lower levels of B lymphocytes both in the BALF and in the venous blood; higher levels of CD4 in the BALF.

After comparing Gr. I with Gr. II the authors have observed a higher level of CD4 and a lower level of CD8 in the BALF in Gr. II. The lymphoblastic test was positive in 35% of all patients.

These results point, even from this early stage, to the presence of a pattern of lymphocytic alveolitis with marked increase of CD4 + T cells probably responsible for what was observed during long term therapy with Amiodarone.

linfocitose sem elevação da subpopulação CD8+, outros com aumento isolado dos polimorfonucleares neutrófilos e ainda outros com celularidade do LLBA normal, sugestivos de um mecanismo fisiopatológico diferente ou de estadios evolutivos distintos.

Com a finalidade de contribuir, de algum modo, para a clarificação da patogenia da toxicidade pulmonar induzida pela Amiodarona, os Autores propuseram-se pesquisar, em indivíduos tratados com este fármaco, uma eventual alveolite subclínica, que de algum modo pudesse vir a ser responsabilizada pela eclosão da patologia respiratória.

MATERIAL e MÉTODOS

Material

Estudámos 21 doentes (20 homens e 1 mulher) submetidos à acção terapêutica pela Amiodarona, com idade média de 61.95 ± 8.85 anos (Mn-32 A. e Mx-75 A.). A posologia da Amiodarona foi de 200 mg/dia em 18 doentes e de 100,300 e 400 mg nos restantes 3. O tempo de tratamento variou, em 18 casos, entre 6 e 48 meses e, nos restantes 3 doentes, atingiu um máximo de 108 meses. Após múltiplas análises dos resultados com respeito à pesquisa de alveolite subclínica, pareceu-nos sugestivo dividir os doentes, em dois grupos, de acordo com o tempo de tratamento: Grupo I (<24 meses): média de 19.65 ± 6.3 meses; Grupo II (≥ 24 meses): média de 48.7 ± 26 meses.

Os doentes não apresentavam qualquer alteração clínica e radiológica do foro pulmonar e aderiram voluntariamente à realização de LBA para estudo da

celularidade, populações linfocitárias, marcadores de activação linfocitária e doseamento de fosfolípidios e sua caracterização.

No sangue periférico, estudaram-se os fenotipos linfocitários CD22, CD2, CD4, CD8 e CD56 e analisou-se o teste de transformação linfoblástica (TTL) à Amiodarona.

Serviram de população testemunha 17 voluntários saudáveis, não fumadores, com idade média de 21.5 ± 1.9 anos, para estudo da celularidade do LLBA. Para as populações linfocitárias CD4 e CD8, serviram de controlo 10 indivíduos normais.

Métodos

As técnicas de execução da LBA e respectiva metodologia, bem como a tipagem linfocitária (marcação CD22, CD2, CD4, CD8, CD56 e HLA-DR) no LLBA e no sangue periférico foram efectuadas de acordo com descrições em trabalhos anteriores (21,22).

Utilizou-se a técnica de microcultura dos linfócitos em presença de Amiodarona, com incorporação da timidina tritiada para a análise da proliferação linfocitária, com contagens num contador de cintilações beta.

O fraccionamento dos fosfolípidios foi realizado por cromatografia em camada fina, em placas de sílica-gel. Na análise estatística dos diversos resultados, utilizou-se o teste t de Student-Fisher. As possíveis associações foram determinadas por análise de correlação linear.

RESULTADOS

A celularidade total no LLBA, por mililitro ($\times 10^4$) era de 12.61 ± 17.5 (versus 9 ± 4 na população normal de controlo), não havendo diferença significativa entre os dois valores médios. Quanto às percentagens das populações celulares, consideradas globalmente, eram: 75.20 ± 14.59 de macrófagos (M ϕ) (versus 87 ± 6.5 nos normais), 20.70 ± 14.63 de linfócitos (L) (vs 8.3 ± 4.62) e 2.45 ± 2.21 nos neutrófilos (N) (vs 4.4 ± 2.7). É significativo o aumento dos linfócitos e a diminuição dos M ϕ e N em relação ao grupo controlo (Fig.1). As populações linfocitárias CD2 estavam significativamente aumentadas ($p < 0.001$), quer no LLBA quer no sangue. Assim, os valores dos linfócitos T, no LLBA, eram de 92.20 ± 4.81% (vs 48 ± 3%) e no sangue periférico 80 ± 4.6% (vs 53 ± 4%) (Fig.2). Contrariamente, os valores dos linfócitos B eram significativamente inferiores ($p < 0.001$), tanto no LLBA (1.95 ± 0.99% vs 9 ± 1% nos controlos) como no sangue periférico (7.18 ± 2.76% vs 19 ± 4%) (Fig. 2).

As subpopulações linfocitárias CD4 e CD8 (Fig. 3) no LLBA e no sangue diferiram, por vezes significativamente, das do grupo testemunho.

Assim, no LLBA, os doentes apresentavam 51.37 ± 15% de células CD4 (vs 37.9 ± 9.2% nos normais - $p < 0.025$), 38.09 ± 16% de células CD8, (vs 29.9 ± 5.1% e 1.73 ± 1.04 na relação (vs 1.3 ± 0.1) (Fig. 4). No sangue periférico, os valores dos doentes e dos indivíduos normais eram, respectivamente, os seguintes: CD4 - 47.01 ± 6.38% e 44.4 ± 5.2%; CD8 - 32.24 ± 6.6% e 26.9 ± 6.5% ($p < 0.05$); relação CD4/CD8 - 1.55 ± 0.46 e 1.7 ± 0.5 (Fig 3 e 4).

O seu ordenamento em dois grupos consoante o tempo de tratamento com a Amiodarona revelou algumas diferenças. O Grupo I (<24 meses), constituído por 13 doentes, mostrou uma linfocitose de 18 ± 16% (Mn-2 e Mx 40%) e uma neutrofilia média de 2.25 ± 1.91% (Mn-0 e Mx-6%), enquanto que, nos indivíduos do Grupo II (≥ 24 meses), formado por 8

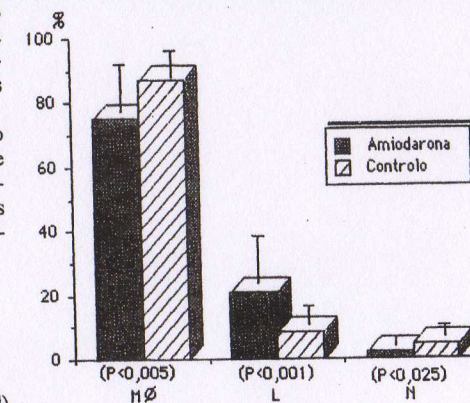


Fig. 1 -- Percentagem de células no LLBA de doentes e de controlos normais.

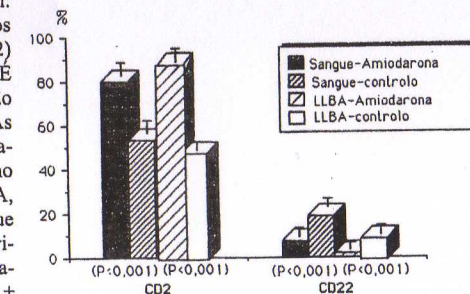


Fig. 2 -- Populações linfocitárias CD2 e CD22 no sangue e no LLBA de doentes e de controlos normais.

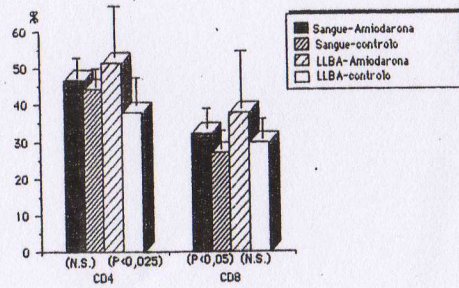


Fig. 3 -- Subpopulações linfocitárias CD4 e CD8 no sangue e no LLBA de doentes e de controlos normais.

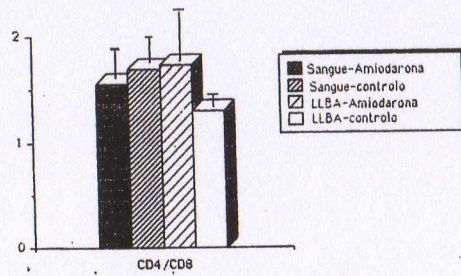


Fig. 4 -- Relações CD4/CD8 no sangue e no LLBA de doentes e de controlos normais.

doentes, a linfocitose média era de 24.6 ± 12.12% (Mn-8 e Mx-44%) e a neutrofilia média de 2.8 ± 2.7% (Mn-0 e Mx-7%), não sendo estatisticamente significativa a diferença entre os valores médios dos linfócitos e dos neutrófilos (Fig. 5).

Nos LLBAs, os valores das subpopulações linfocitárias eram os seguintes (Fig 6 e Quadro I): CD4 : 44.8 ± 15% (Mn-22.3 e Mx-70.3%) no Grupo I e 61.92 ± 8.6% (Mn-45 e Mx-70.7%) no Grupo II (p<0.02); CD8: 44.77 ± 16% (Mn-23 e Mx-73,3%) no Grupo I e 27.24 ± 8.44% (Mn-17.3 e Mx-45%) no Grupo II (p<0.02); CD4/CD8: 1.24 ± 0.8 (Mn-0.33 e Mx-3) no Grupo I e 2.47 ± 0.8 (Mn-1 e Mx-3.7) no Grupo II (p<0.005) (Quadro I). Relativamente à identificação de células NK(CD56) no LLBA, foram encontrados valores médios de 3.04 ± 4.11% no Grupo I e 3.10 ± 3.52% no Grupo II (n.s.).

No sangue periférico, as diferenças entre os dois grupos eram reduzidas: CD4 - 47.39 ± 6.5%; CD8 - 32.86 ± 7.2%; relação CD4/CD8 - 1.55 ± 0.49 no Grupo I e CD4 - 46.18 ± 6%; CD8 - 31.22 ± 5.8%; relação

CD4/CD8 - 1.55 ± 0.44 no Grupo II (Fig. 6 e Quadro I). A expressão antigénica HLA-DR no LLBA encontra-se mais elevada no Grupo II (6.62 ± 3.6%) em relação ao Grupo I (4.54 ± 3.15%), todavia sem atingir significado estatístico. Também, no que se refere à marcação NK no sangue, os valores encontrados foram semelhantes: Grupo I - 16.62 ± 9.5%; Grupo II - 22 ± 11.48% (n.s.). A transformação linfoblástica à Amiodarona, no sangue periférico, apresentou valores de índice mitogénico superior a 2 - e por isso considerados positivos - em 35% dos doentes.

Os fosfolípidos totais recolhidos por LLBA eram sensivelmente idênticos aos encontrados no grupo controlo (Fig 7), o mesmo se registando entre os grupos I e II. Aliás, cromatograficamente (Fig.8), apenas se detectou, no Grupo I, um ligeiro aumento da esfingomiélna (p<0.05) em relação ao Grupo II, mantendo-se quase inalteradas as restantes fracções (lecitina, fosfatidilinositol e fosfatidiletanolamina).

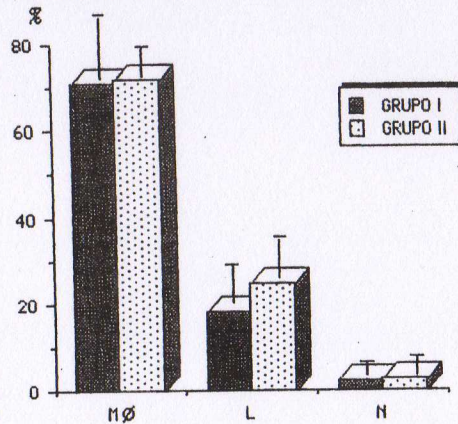


Fig. 5 -- Percentagem de células no LLBA dos grupos I e II.

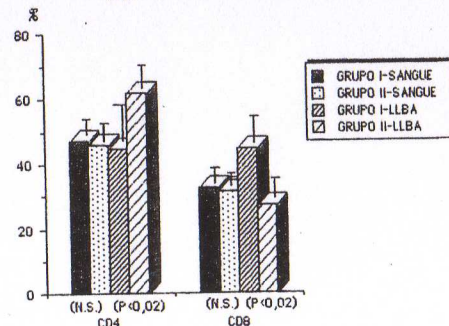


Fig. 6 -- Subpopulações linfocitárias CD4 e CD8 no sangue e no LLBA dos Grupos I e II.

QUADRO I -- Percentagem das subpopulações linfocitárias T no LLBA e no Sangue de doentes e de controlos normais.

	CD4		CD8		CD4/CD8	
	LLBA	SANGUE	LLBA	SANGUE	LLBA	SANGUE
CONTROLO :	37.9+9.2	44.4+5.2	29.9+5.1	26.9+6.5	1.3+0.1	1.7+0.5
	p<0.025		p<0.05			
TOTAIS :	51.37+15	47.01+6.3	38.09+16	32.24+6.6	1.73+1.04	1.55+0.46
GRUPO I : <24 MESES	44.88+15	47.39+6.5	44.77+16	32.86+7.2	1.24+0.8	1.55+0.49
	p<0.02		p<0.02		p<0.005	
GRUPO II : ≥24 MESES	61.92+8.6	46.18+6	27.24+8.44	31.22+5.8	2.47+0.8	1.55+0.44

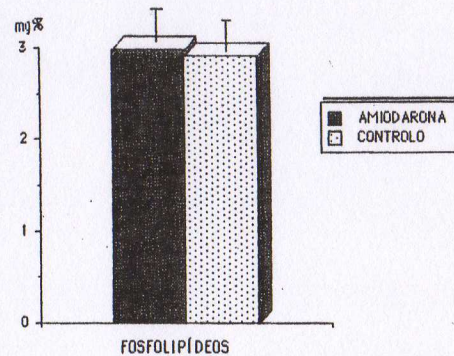


Fig. 7 -- Fosfolípidos no LLBA de doentes e de controlos normais.

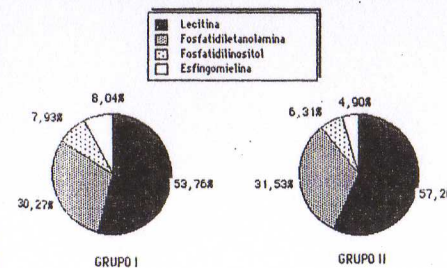


Fig. 8 -- Análise cromatográfica dos fosfolípidos do LLBA nos Grupos I e II.

DISCUSSÃO

De acordo com a grande maioria dos autores que têm estudado pneumopatias induzidas pela Amiodarona, [3,11,17], também nós tivemos oportunidade de detectar, nos líquidos de lavagem broncoalveolar dos nossos casos sem pneumopatia demonstrável, níveis de linfócitos significativamente superiores (p< 0.001) àqueles que foram determinados no grupo controlo, tradutores de uma alveolite linfocitária e sugestivamente testemunhando a importância patogénica assumida por estes elementos celulares na evolução da toxicidade pulmonar.

A população linfocitária B encontrava-se significativamente diminuída em relação ao grupo controlo, o que poderá sugerir a limitada participação de fatores humorais, pelo menos nesta fase.

Embora a maioria dos autores aponte para um aumento dos linfócitos CD8+ na fase de pneumonite instituída, Martin e col.(17) encontraram, tal como nós em fase preclínica, um subgrupo de doentes que apresentavam uma linfocitose CD4+, com consequente aumento da relação CD4/CD8.

Parece, assim, poderem admitir-se, na evolução da toxicidade pulmonar induzida pela Amiodarona, três fases: (1ª) Uma inicial, subclínica, com linfocitose em alguns casos, já presente em doentes submetidos ao fármaco por um período inferior a 24 meses (percentagem de linfócitos totais de 18 ± 16 e de subpopulações CD4 e CD8 de 44.77 ± 15 e 44.77 ± 16), a qual parece ir-se acentuando nos doentes com mais tempo de exposição à custa da população CD4+ (L - 24.6 ± 12.12 CD4 - 61.9 ± 8.2 e CD8 - 27.24 ± 8.44), com correlação

positiva entre o aumento dos linfócitos CD2+ e a relação CD4/CD8 (Fig. 9) e sugerindo assim um mecanismo de apresentação antigénica (pela via endossómica) por células macrofágicas no contexto da

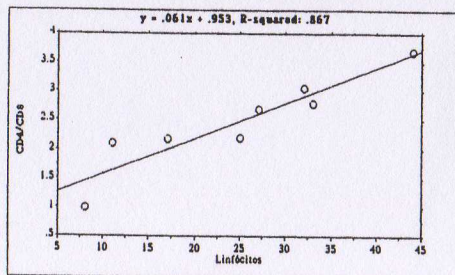


FIG. 9 -- Correlação entre a percentagem de CD2 e a relação CD4/CD8 no LLBA do grupo II.

classe II do HLA conduzindo ao recrutamento e activação das células CD4+; nesta fase da alveolite subclínica, os linfócitos recolhidos no LLBA, encontram-se em número elevado e com evidência de activação, e a acentuação do fenótipo HLA-DR no grupo de doentes com exposição mais prolongada (4.54 ± 3.15 , vs 6.62 ± 3.6), assim como o TTL à Amiodarona (positivo em 35% dos doentes), são também sugestivos duma hipersensibilidade mediada por células. (2^a) Numa segunda fase, em alguns casos tentar-se-ia corrigir esta evolução das interrelações CD4/CD8 e, assim, as subpopulações CD8 antes genericamente elevadas, diminuiriam; mas, nos casos evoluindo para pneumopatia, a manutenção da expansão destas mesmas linhagens celulares acabaria por ultrapassar o seu objectivo moderador. (3^a) E, assim, numa fase ulterior já com alterações clinicoradiológicas, os estudos em

LLBA efectuados por vários Autores demonstram já a existência de alveolites linfocíticas com franco predomínio das populações CD8+. Esta predominância poderá, pois, corresponder a uma espontânea modulação correctiva, que assim se oporia à perpetuação de uma via favorecedora dos processos de activação imunológica. É também nesta fase que têm sido referenciadas alterações de outras linhas celulares do LLBA, como o aumento dos eosinófilos e polimorfonucleares neutrófilos; no período subclínico, no entanto e segundo os resultados do nosso estudo, não parece haver compromisso destas células.

O valor prognóstico da presença da relação CD4/CD8 aumentada, interpretada por alguns autores como uma tendência mais fibrosante, só poderá ser avaliada por estudos longitudinais e que incluam a avaliação correlativa deste parâmetro.

Sabe-se, ainda, que o uso de Amiodarona induz acumulação de fosfolípidos em células e tecidos, o que tem motivado, por parte de vários Autores [4,17], estudos de identificação de corpos lamelares em diversos tipos celulares. Esta agressão pode provocar lesão das células envolvidas, nomeadamente dos pneumócitos tipo II e dos macrofagos, dos linfócitos e dos polimorfonucleares constituindo uma eventual via de activação imunológica não específica.

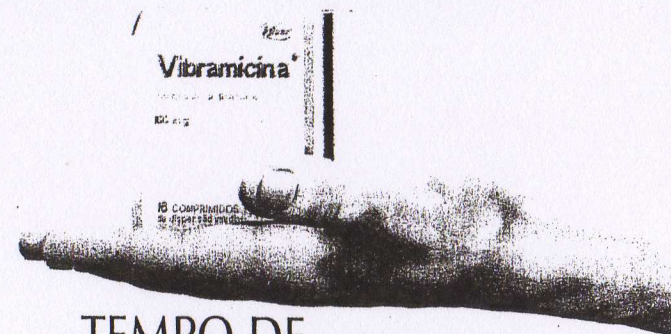
No nosso estudo, procedeu-se ao doseamento de fosfolípidos totais no LLBA, que não diferiram significativamente do grupo controlo. Fez-se, ainda, o estudo fraccionado dos fosfolípidos no mesmo líquido tendo-se encontrado, no grupo de doentes com exposição mais prolongada e com maiores alterações imunológicas uma redução significativa dos valores da esfingomiélinina, o que poderá ser relacionável com um eventual distúrbio da produção da substância tensoactiva pelos pneumócitos tipo II e consequente repercussão na instalação do quadro patológico.

BIBLIOGRAFIA

- [1] BARBARA D W, ANDRZEJ J J, MARDA E D, MICHAEL L L. Amiodarone-Induced Pulmonary Toxicity in the rat. *Lung*, 167: 301-311; 1989
- [2] CANTOR J O, OSMAN J M, CERRETA R, SUAREZ R, MANDL I, TURINO G M. Amiodarone-induced pulmonary fibrosis in hamsters. *Lung Res*, 6: 1-10 1984.
- [3] DOMINIQUE ISRAEL-BIET, ALAIN V, ISABELLE C, GILLES B, CLAIRE D, JACQUES CHRÉTIEN, ALLAN J. Hance Bronchoalveolar Lavage in Amiodarone Pneumonitis. *Chest* 191/2 February, 1987.
- [4] GENEVIÈVE NICOLETE-CHATELAIN, PREVOST M C, ESCAMILLA R, MIGUERES J. Amiodarone-Induced Pulmonary Toxicity. *Chest*, 99, 2, February, 1991.
- [5] GEORGES M. AKOUN, SARVAT GAUTHIER-RAHMAN, MILLERON J, PERROT J Y, MAYAUD C M. Amiodarone-induced Hypersensitivity Pneumonitis. *Chest*, 85, 1, January, 1984.
- [6] GLENN D ADAMS, RICHARD KEHOE, LESCH M, GLASSROTH J. Amiodarone-induced Pneumonitis. *Chest*, 93, 2, February, 1988.
- [7] HAGFEE C L, LOVE J C, ALPERT J S, ASDOURIAN G K, SLOAN K C. Efficacy and safety of long-term amiodarone in treatment of cardiac arrhythmias: dosage experience. *Am Heart J*, 106: 953 - 62, 1983.

INVERNO

TEMPO DE BRONQUITES, SINUSITES
E COMPLICAÇÕES PÓS-GRIPAIS



TEMPO DE
Vibramicina[®]
(Monohidrato de doxiciclina)

- * ABSORÇÃO RÁPIDA E COMPLETA
- * ELEVADO GRAU DE PENETRAÇÃO TECIDULAR
- * EXCELENTE TOLERÂNCIA

FORMA DE APRESENTAÇÃO	PREÇO DE VENDA AO PÚBLICO	COMPARTICIPAÇÃO DO ESTADO	UTENTE	CUSTO MÉDIO DO TRATAMENTO/DIA	SNS
16x comps. de dispersão imediata x 100 mg	1378\$00	1103\$00	275\$00	172\$20	34\$40
16 cáps. x 100 mg	1469\$00	1176\$00	293\$00	183\$60	36\$60
Xarope fr. 60 ml (10 mg/ml)	601\$00	481\$00	120\$00	120\$20	24\$00

Roerig
DIVISÃO DOS
LAB. PFIZER, S.A.

Para mais informações sobre o produto solicitar a Laboratórios Pfizer, S.A. Apartado 1402 - 1012 LISBOA CODEX
Sede: Porto Zemouto, Coia Seixal • Capital Social: Escudos 850 000 000 • Conserv. Reg. Seixal - Matrícula NR 775