

Juçara Zulli Mohovic

Análogos de Asp f 1 ( $\alpha$ -sarcina, mitogilina e restrictocina)  
no diagnóstico e estadiamento da aspergilose  
broncopulmonar alérgica

Tese apresentada á Faculdade de Medicina  
da Universidade de São Paulo para obtenção  
do Título de Doutor em Ciências

**Área de Concentração:** Alergia e  
Imunopatologia

**Orientador:** Prof. Dr. Jorge Elias Kalil  
Filho

São Paulo  
2008

# FICHA CATALOGRÁFICA

## Dedicatórias

À minha família: ao meu esposo Tomás Mohovic , às minhas filhas: Tatiana Mohovic, Bruna Mohovic, Julia Mohovic, ao meu netinho Rafael e aos meus genros: Douglas Colognesi dos Santos, Ângelo Franchini, Guilherme Renzo Rocha Brito.

À minha mãe: Sonia e ao meu pai Carlos e irmãos Silvana e José Carlos "in memoriam".

Além da colaboração com as figuras, tabelas e opiniões científicas, o carinho foi o mais importante.

## **Agradecimentos**

Ao professor Jorge Kalil pelo apoio dado ao meu projeto e por suas orientações firmes e positivas.

À Prof.Dra. Luiza Karla Arruda pelos extratos e pelas instruções iniciais para a realização do experimento.

Ao Dr Pedro Francisco Giavinna-Bianchi Junior pelo diálogo franco e produtivo fundamentado em seu amplo conhecimento sobre asma e imunologia geral e por sua incansável disposição para ajudar.

Ao Dr. Rafael Stelmach e Dr. Alberto Cukier pelo apoio científico fundamental ao trabalho.

À Dra Myrthes Toledo Barros por ter feito a pergunta fundamental que motivou esse experimento

À Dra Luiza Guilherme Guglielmi por sua generosidade e por ter mantido abertas as portas de seu laboratório para um projeto tão diferente de sua linha de pesquisa.

Aos residentes e preceptores: Ana Karolina B De Oliveira, Marisa, Maria Helena, Luciana Kase Tano pela colaboração.

Ao Prof Dr Edécio Cunha Neto por ter orientado e proporcionado o material necessário à realização da imunoeletroforese.

À Dra Cristina Caldas pela dosagem de endotoxinas nos extratos.

Ao Dr Luiz Augusto Fonseca pelas preciosas correções que conduziram a uma visão mais objetiva desse trabalho.

À Dra Cristina Kokron e aos técnicos do lim-60, principalmente ao Carlos Roberto Palma pelas dosagens de imunoglobulinas.

À Dra Andréa Cohn pela amizade.

Aos técnicos do ambulatório: Serafim Hidalgo, Rosana Vieira Coutinho, Maurício Gonçalves Freitas, Hilário Polido Vasques e Leoni Bacci pelo apoio quanto aos procedimentos com os pacientes.

À Dra Fabiane Pomersianski pela ajuda nesse projeto com as primeiras biópsias.

Aos pacientes do Ambulatório de Imunologia Clínica e Alergia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo que entenderam o motivo de se submeterem a exames inovadores que, com sorte, mudarão o seu tratamento e melhorarão a sua qualidade de vida.

*Esta tese está de acordo com as normas, em vigor no momento desta publicação:*

*Refêrencias: adaptado de International Committee of Medical Journals Editores (Vancouver)*

*Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações e teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005)*

## SUMÁRIO

Resumo  
Summary

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
1.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	15
1.2	HISTÓRIA NATURAL DA ASPERGILOSE BRONCOPULMONAR ALÉRGICA .....	20
1.3	CARACTERIZAÇÃO DO AGENTE INFECCIOSO .....	20
1.3.1	<b>O fungo <i>Aspergillus fumigatus</i></b> .....	26
1.3.2	<b>Extratos de <i>Aspergillus fumigatus</i> e conteúdo antigênico</b> .....	32
1.4	MECANISMOS DE DEFESA DO HOSPEDEIRO CONTRA O <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	41
1.4.1	<b>Resposta inata</b> .....	41
1.4.2	<b>Resposta imune humoral</b> .....	43
1.4.3	<b>Resposta imune celular</b> .....	44
1.5	FISIOPATOGENIA .....	48
1.5.1	<b>Produção de citocinas na Aspergilose Broncopulmonar Alérgica</b> .....	57
1.6	DIAGNÓSTICO E ESTADIAMENTO DA ABPA .....	59
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	68
2.1	OBJETIVO GERAL.....	68
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	68
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	70
3.1	DELINEAMENTO DO ESTUDO .....	70

3.2	DINÂMICA DO ESTUDO.....	72
3.3	CARACTERIZAÇÃO GERAL DA POPULAÇÃO ENCAMINHADA PARA INVESTIGAÇÃO DO DIAGNÓSTICO DE ASPÉRGIOSE BRONCOPULMONAR ALÉRGICA .....	74
3.4	CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS POR DIAGNÓSTICO QUE FORAM SUBMETIDOS AOS TESTES INTRADÉRMICOS COM OS ANTÍGENOS A-SARCINA, MITOGILINA E RESTRICTOCINA E À BIÓPSIA .....	75
3.5	TESTES CUTÂNEOS PARA TRIAGEM.....	77
3.5.1	<b>Antígenos para testes epicutâneos utilizados na rotina de atendimento do Serviço de Imunologia Clínica e Alergia do Hospital das Clínicas .....</b>	<b>77</b>
3.5.1.1	Critério de positividade para os testes de triagem.....	78
3.5.1.2	Testes epicutâneos tempo de leitura.....	78
3.4.2	<b>Antígenos para testes intradérmicos para triagem .....</b>	<b>78</b>
3.4.2.1	Antígenos totais.....	79
3.4.2.2	Critério de positividade .....	79
3.5	TESTES INTRADÉRMICOS COMO S ANÁLOGOS DEASP F1: A-SARCINA, MITOGILINA E RESTRICTOCINA .....	80
3.5.1	<b>...Análise da concentração de endotoxinas nos extratos.....</b>	<b>80</b>
3.5.2	<b>Eletroforese em gel de ágar para caracterização da <math>\alpha</math>-sarcina, mitogilina e restrictocina por Peso Molecular.....</b>	<b>80</b>
3.5.3	<b>Titulação:determinação da concentração ideal de <math>\alpha</math>-sarcina, mitogilina e restrictocina para testes intradérmicos.....</b>	<b>81</b>



3.5.4	<b>Testes intradérmicos – metodologia e tempo de leitura da reação imediata e da reação tardia dos antígenos <math>\alpha</math>-sarcina, restrictocina e mitogilina</b> .....	81
3.6	ESPIROMETRIA .....	82
3.7	TOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA DE ALTA RESOLUÇÃO .....	84
3.8	TESTES SOROLÓGICOS.....	85
3.8.1	<b>Teste imunofluorescência :</b> <b>Fluoroenzymeimunoassay UNICAP® IgE - m3</b> .....	85
3.8.1.1	Materiais empregados .....	85
3.8.1.2	Princípio geral do teste .....	86
3.8.2	<b>Teste imunofluorescência:</b> <b>Fluoroenzymeimunoassay UNICAP® IgG - Gm3</b> .....	87
3.8.2.1	Materiais para a medida de IgG específica para <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	87
3.8.2.2	Metodologia .....	89
3.8.3	<b>Reações de precipitação</b> .....	90
3.9	BIÓPSIA DE PELE PARA PESQUISA DE IMUNOCOMPLEXOS.....	91
3.9.1	<b>Técnica de Imunofluorescência direta</b> .....	92
3.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	93
4	<b>RESULTADOS</b> .....	95
4.1	CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO ESTUDADA PELA ANÁLISE DOS RESULTADOS DOS EXAMES REALIZADOS.....	95
4.2	DOSAGEM DE ENDOTOXINAS NOS EXTRATOS UTILIZADOS .....	97

4.3	DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR DOS ANTÍGENOS A-SARCINA, MITOGILINA E RESTRICTOCINA .....	98
4.4	TESTES CUTÂNEOS COM OS ANTÍGENOS A-SARCINA, MITOGILINA E RESTRICTOCINA .....	99
4.4.1	<b>Titulação dos antígenos <math>\alpha</math>-sarcina, mitogilina e restrictocina: para testes cutâneos intradérmicos.....</b>	<b>99</b>
4.4.2	<b>Reações imediatas .....</b>	<b>100</b>
4.4.3	<b>Reações tardias .....</b>	<b>100</b>
4.4.3.1	Leitura semi-tardia da reação tardia produzida pela $\alpha$ -sarcina.....	102
4.4.3.2	Leitura semi-tardia da reação tardia produzida pela mitogilina .....	104
4.4.3.3	Leitura semi-tardia da reação tardia produzida pela restrictocina .....	105
4.4.3.4	Determinação da sensibilidade da mitogilina na concentração de 10mcg/ml.....	107
4.4.4	<b>Resultados da análise do material obtido por biópsias de pele.....</b>	<b>108</b>
4.5	ANÁLISE DAS MEDIDAS DE IGE TOTAL NOS GRUPOS ANALISADOS PARA O ESTUDO ATUAL .....	109
4.6	ANÁLISE DO VOLUME EXPIRADO NO 1º SEGUNDO (FEV1%) NOS GRUPOS ESTUDADOS.....	110
4.7	ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES ENCONTRADAS NAS TOMOGRAFIAS COMPUTADORIZADAS .....	111
5	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>115</b>
6	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>127</b>
	<b>APÊNDICES.....</b>	<b>131</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>166</b>



## RESUMO

Mohovic JZ Análogos de Asp f 1 ( $\alpha$ -sarcina, mitogilina e restrictocina) no diagnóstico e estadiamento da aspergilose broncopulmonar alérgica [Tese]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2008. 1 p.

A Aspergilose Broncopulmonar alérgica (ABPA) é uma doença complexa, desencadeada por uma reação de hipersensibilidade ao *Aspergillus fumigatus*, que apresenta vários estágios, sendo que no estágio mais grave, os pacientes apresentam bronquiectasias. O diagnóstico da doença é difícil e o maior problema é a falta de antígenos padronizados necessários para a determinação de anticorpos específicos. O objetivo do presente estudo é avaliar se os testes cutâneos com os análogos de Asp f 1 podem auxiliar no diagnóstico e no estadiamento da ABPA. Três grupos de pacientes classificados por testes sorológicos foram obtidos a saber 20 ABPA (16BQ+; 4BQ-), 25 possíveis -ABPA (14BQ+;11BQ-) e 24 asmáticos sem ABPA (11BQ+;13BQ-). Fizeram parte do estudo 10 pessoas sem asma . Todos foram submetidos a testes intradérmicos com três antígenos  $\alpha$ -sarcina, mitogilina e restrictocina. Houve uma intensa reação a todos os antígenos e as reações produzidas foram semelhantes para os três antígenos. As reações de leitura tardia positivas à mitogilina foram biopsiadas. As biopsias de 2 (12,5%) dos pacientes BQ+ do grupo ABPA e 5 do grupo ABPA possível com BQ+ (35,6%) mostraram vasculite por depósito de imunocomplexos. 11 pacientes do terceiro grupo não apresentaram vasculite. O quarto grupo não apresentou reação tardia. Todos os pacientes com reação positiva apresentaram BQ+.  $\alpha$ - sarcina, a mitogilina e a restrictocina diferenciaram pacientes com ABPA por testes intradérmicos e podem ser aplicados no diagnóstico da doença. A maior incidência de bronquiectasias foi encontrada no primeiro grupo(80%) e no segundo (56%). No terceiro grupo nenhum caso foi encontrado em 23 pacientes com asma e teste ID positivo ao *aspergillus fumigatus*. todos os pacientes com vasculite tinham

bronquiectasia. Há possibilidade de que as lesões produzidas nos pulmões sejam produzidas por vasculite. Abreviações : ASP f 1 : fração de 18kDa do *Aspergillus fumigatus*; BQ+ : bronquiectasias-positivo; BQ- bronquiectasias -negativo.

Palavras-chave: ABPA : Aspergilose broncopulmonar Alérgica. Alérgenos. Análogos. Testes Cutâneos. Biópsias. Imunocomplexos. Vasculite.

## SUMMARY

Mohovic JZ. Analogs of Asp f 1 (mitogillin,  $\alpha$ -sarcin and restrictocin) on the diagnosis and stage assessment of Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2008. 172 p.

Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis (ABPA) is a complex disease, triggered by a hypersensitivity reaction to *Aspergillus fumigatus*. The disease diagnosis is difficult, and a major problem is the lack of standardized allergens for the determination of specific antibodies. The aim of the present study is to evaluate if intradermal (ID) tests with analogs of Asp f 1 can aid in the diagnosis and stage assessment of abpa. Three groups of patients classified by serological tests were obtained. 20 ABPA (16BQ+; 4BQ-), 25 possible-ABPA (14BQ+; 11BQ-), 24 asthmatic-ABPA-free (11BQ+; 13BQ-) and 10 asthma-free people were submitted to id tests with three antigens: mitogillin,  $\alpha$ -sarcin and restrictocin. There was intense reaction to all three antigens and the response was similar. The positive reactions to mitogillin were biopsied. The skin biopsies of two (12,5%) bq+ patients of the first group and 5 BQ+ (35,6%) patients of the second one showed vasculitis by immune complexes (IC) deposition. 11 patients of the third group had negative biopsies. The fourth group didn't have late-reaction. All patients with positive reaction were BQ+. By ID test,  $\alpha$ -sarcin, mitogillin and restrictocin could differentiate patients with abpa and can be applicable in disease diagnosis. The higher incidence of bronchiectasis was found in the first (80%) and second (56%) groups. In the third group, IC wasn't found in 23 asthma patients and id test was positive to *A. fumigatus*. All patients with vasculitis by IC had bronchiectasis. Therefore, the results indicate that this kind of pulmonary lesion is caused by vasculitis.

Abbreviations: Asp f 1 : *Aspergillus fumigatus* 18 kDa fraction;  
BQ+: bronchiectasis-positive; BQ- bronchiectasis-negative. ID:  
Intradermal test; IC: Immune complexes

Key words: Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis (ABPA).  
Allergens. Analogs. Skin tests. Biopsies. Immune  
complexes. Vasculitis.

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.2 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas inferiores caracterizada por hiperreatividade brônquica e por limitação reversível ao fluxo aéreo, que remite espontaneamente ou com tratamento e que se manifesta por episódios recorrentes de sibilância, dispnéia, tosse e sensação de aperto no peito principalmente à noite e ao despertar. A asma é resultado da interação de fatores genéticos com a exposição ambiental a irritantes e alérgenos. Os alérgenos que desencadeiam crises de asma com maior frequência são os derivados de ácaros, pólenes, epitélio de gato, fungos e baratas (Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia, 2006).

A incidência de asma tem aumentado em todos os países industrializados. No Brasil, 396 000 pacientes foram internados em 2004, o equivalente a 2,3% do total de internações pelo SUS.



Esta taxa representa a terceira causa de internação de crianças e adultos jovens (Sistema de informações hospitalares do Sistema Único de Saúde, 2004). Dos pacientes internados, 2050 morreram, o que demonstra a necessidade da aplicação de medidas que possibilitem o manejo adequado e o diagnóstico etiológico precoce das várias formas de asma (Global Initiative for Asthma-Gina, 2006).

O termo asma de difícil controle começou a ser empregado na década de 90 e nos trabalhos iniciais sua definição se confundia com a de asma resistente a corticóides (Irwin, 1993).

Atualmente, essa expressão abrange uma série de condições em que as estratégias habituais de tratamento tornam-se insuficientes para o controle da doença, não necessariamente por resistência aos corticóides mas também pela presença de comorbidades, as quais, quando não controladas, contribuem para a persistência da asma (Global Initiative for Asthma-Gina, 2006).

Entre essas doenças, as que mais comumente se associam à asma de difícil controle são: as rinossinusites, a doença do refluxo gastroesofágico, a disfunção de pregas vocais e a Aspergilose Broncopulmonar Alérgica (ABPA), cujo tratamento é fundamental para o controle da doença de base.

A Aspergilose Broncopulmonar Alérgica é uma doença pulmonar de hipersensibilidade mediada por uma resposta inflamatória imediata e tardia aos antígenos do *Aspergillus fumigatus* em indivíduos geneticamente predispostos como os portadores de asma e fibrose cística (Knutsen, 2003). Esses pacientes têm em comum alterações no mecanismo de limpeza mucociliar o que os torna susceptíveis à doença (Imbeau et al., 1977).

Storm van Leewen foi o primeiro autor a estabelecer associação entre o *Aspergillus fumigatus* e o aumento de casos de asma em Leyden, na Holanda (1922). A denominação Aspergilose Broncopulmonar Alérgica (ABPA) foi proposta por Hinson em 1952, mas há registros de casos sugestivos da doença bem

anteriores (Sluyter<sup>1</sup>, 1847 apud Varkey, 1998, p. 14; Pasteur, Giroud, 1928).

Não foram identificadas imunodeficiências congênitas nos pacientes asmáticos susceptíveis às formas alérgicas da aspergilose. Nesses indivíduos, para colonizar os tecidos, o fungo deve aderir à mucosa, penetrar nos tecidos para atingir os órgãos-alvo ou o sangue, multiplicar-se *in vivo* adaptando-se à temperatura do hospedeiro, ter habilidade para evitar seus mecanismos de defesa e danificar os tecidos do ser parasitado (Richardson, Shankland, 1991).

Além de ser uma comorbidade da asma, principalmente nos pacientes aonde a doença tem um padrão de difícil controle, a ABPA também está associada à fibrose cística.

O diagnóstico de aspergilose pulmonar nos pacientes com fibrose cística é feito na infância, pois os danos no clearance mucociliar estão presentes desde o nascimento. Atualmente, com o aumento da sobrevida desses pacientes tem que se levar em

---

<sup>1</sup> Sluyter T. De vegetalibus organismi animalis parasitis. Dis Inaug Berlini, 1847.

conta a possibilidade de associação de Aspergilose Broncopulmonar Alérgica e Fibrose Cística em adultos (Adde, 2004).

Nos asmáticos a doença se manifesta na terceira ou quarta década da vida, sendo difícil o seu aparecimento na terceira idade.

O tratamento de escolha para a ABPA baseia-se no uso de corticóides e em casos especiais, quando o uso desses medicamentos se torna insuficiente, aplicam-se antifúngicos (Stevens et al., 2000). Alguns autores preconizam ainda o uso de imunoterapia (Stevens et al., 2000; Svirshchevskaya, Kurup, 2003).

## 1.2 HISTÓRIA NATURAL DA ASPERGILOSE BRONCOPULMONAR ALÉRGICA

A classificação das síndromes produzidas pelo *Aspergillus fumigatus* nos pulmões de seres humanos se faz através da análise de dois tipos de doença : as infecciosas e as alérgicas.

Entre as primeiras observamos doenças cada vez mais graves à medida que aumenta o imunocomprometimento do indivíduo : os aspergilomas, que são colonizações saprofíticas de cavidades pré-existentes de indivíduos sem imunodeficiência; há as formas semi-invasivas como as traqueobronquites e a granulomatose broncocêntrica em que ocorre pneumonia com abscesso pulmonar e com maior gravidade, observamos a bronquite com infarto pulmonar, as cavidades múltiplas com derrame pleural e a aspergilose pulmonar crônica necrotizante; por fim, as formas invasivas e disseminadas acometem indivíduos imunocomprometidos por leucemia e transplantados de medula as quais podem atingir vários órgãos com alto índice de mortalidade. Entre as formas alérgicas podem ser destacadas a asma alérgica com sensibilização ao *Aspergillus sp*, que representa a forma mais branda da doença, seguindo-se a Aspergilose Broncopulmonar Alérgica e a alveolite alérgica extrínseca ( Bardana, 1980).

Pepys<sup>2</sup> (1969 apud McCarthy, Pepys, 1971, p. 20-41.) descreveu várias doenças provocadas por *Aspergillus fumigatus* e

os mecanismos imunológicos envolvidos e uma dessas formas, a ABPA, teve seu complexo diagnóstico sistematizado por Patterson et al. (1982). Nessa época a ABPA passou a ser reconhecida como uma doença que tem início a partir de um quadro de asma ou de fibrose cística e funciona como um fator de agravamento, persistência dos sintomas e piora da evolução (Greenberger, 1988).

Além da asma, as características gerais da ABPA são : o aumento de IgE total e de IgE específica, eosinofilia e infiltrados pulmonares. O aumento de IgG total também foi descrito e pode ser observado em alguns casos, bem como o aumento de IgG específica. O aparecimento de bronquiectasias císticas ou cilíndricas, caracteristicamente de localização central, em pelo menos 2 lobos pulmonares e de fibrose pulmonar, nem sempre são visualizados no mesmo indivíduo e ocorrem principalmente nas formas mais graves da doença (Patterson et al., 1982).

---

<sup>2</sup> Pepys J. Hipersensitivity diseases of the lungs. In: monographs in Allergy. New York: 1969.

As alterações produzidas pela ABPA nos pulmões de pacientes com asma são resultantes de diferentes mecanismos imunológicos. Há tanto uma nítida reação de hipersensibilidade mediada por IgE, ou reação do tipo imediato como lesões por deposição de imunocomplexos que seriam responsáveis pelas alterações pulmonares mais graves e que resultam da resposta crônica aos antígenos liberados durante a colonização do fungo. O encontro de linfócitos do tipo Th2 que participam do processo de produção de IgE, permite supor que as alterações pulmonares estão associadas a mecanismo tipo IV da classificação de Gell e Coombs (Bhattacharya, 1999).

Embora a ABPA seja uma doença alérgica de caráter agressivo, o processo destrutivo é autolimitado e os relatos de evolução de ABPA para aspergilose invasiva são raros (Riley et al., 1975; Nikolaizik et al., 1996). Outras formas de doença pulmonar como os aspergilomas não se associam à ABPA (Safirstein, 1973b; Shah et al., 1989). Em alguns casos descritos encontram-se processos granulomatosos não necróticos com encontro de hifas em seu interior mostrando que o comprometimento dos tecidos é

limitado (Cooper et al., 1981; Henderson, 1968; Wahner, 1963; Husebye, 1967).

Foi registrada prevalência de 23% de indivíduos sensibilizados ao *Aspergillus fumigatus* em um estudo realizado em 656 casos de asma, empregando testes cutâneos de leitura imediata para triagem diagnóstica (Hendrick et al., 1975). Estudando 201 pacientes com asma e rinite em São Paulo, através da aplicação de testes intradérmicos encontramos 22,9% de pacientes sensibilizados ao *Aspergillus fumigatus* (Mohovic et al., 1988).

A prevalência de Aspergilose Broncopulmonar Alérgica varia quanto à população pesquisada. De um modo geral, a ABPA afeta 2% dos indivíduos com asma (Novey, 1998), 11% dos asmáticos corticodependentes (Basich et al., 1981) e 15% dos pacientes com fibrose cística sensibilizados ao fungo, segundo pesquisas nos países nórdicos (Becker et al., 1995). No Rio de Janeiro observou-se prevalência de 20% de pacientes com



Aspergilose Broncopulmonar Alérgica em indivíduos com asma sensibilizados ao fungo (Serpa, 1997).

As mudanças no mecanismo de limpeza mucociliar favorecem a adesão do *Aspergillus fumigatus* com posterior brotamento dos conídios . Sabe-se que na fibrose cística essas alterações estão relacionadas à mutação genética que determina a alteração da proteína reguladora da condutância através da membrana citoplasmática das células epiteliais das glândulas exócrinas (Miller et al., 1996) o que resulta em alterações no transporte de sódio, cloro e água entre os espaços intra e extracelular. Como consequência há o espessamento das secreções, o que dificulta o movimento dos cílios e a eliminação dos microorganismos presentes na luz bronquiolar (Zach, 1990, Galvão, 1993). A mutação mais frequente, a CF 508 foi encontrada em 28,5% dos pacientes com fibrose cística e em 4,6% dos pacientes com asma sensibilizados ao *Aspergillus fumigatus* que podem desenvolver a doença na presença de condições ambientais favoráveis à dispersão aérea do fungo (Marchand et al., 2001).

A identificação precoce da ABPA é importante, pois possibilita prevenir as apresentações mais graves da doença, representadas por bronquiectasias e fibrose (Denning, 2001). Contudo, os métodos sorológicos existentes para o diagnóstico são pouco difundidos e apenas as formas mais graves são diagnosticadas na maior parte das vezes. Os critérios estabelecidos internacionalmente para o diagnóstico de ABPA se baseiam no aumento do número de eosinófilos, em dosagens séricas de IgE e IgG totais e específicas para o *Aspergillus fumigatus* e em exames radiológicos para detecção de lesões pulmonares características como as bronquiectasias centrais (Patterson,2000).

A busca pela identificação de lesões pulmonares características da doença era feita pela observação de exames radiológicos simples que podiam revelar lesões como bronquiectasias centrais, traduzidas pela imagem em "anel de sinete", impactação mucoide identificada por "dedos de luva" e "nódulos" e imagens em "pasta de dente" e "linha de trem" revelando a presença de espessamentos brônquicos (Varkey,

1998). Com a difusão do uso da tomografia computadorizada alterações mais sutis como "mosaico" e "vidro despolido" foram evidenciadas (Neeld et al., 1990). A tomografia de alta resolução, de cortes de 1,5 mm permite identificar bronquiectasias císticas, cilíndricas e varicosas típicas da ABPA, além de cistos com nível hidroaéreo (Angus et al., 1994).

### 1.3 CARACTERIZAÇÃO DO AGENTE INFECCIOSO

#### 1.3.1 O fungo *Aspergillus fumigatus*

O agente etiológico da ABPA é o *Aspergillus fumigatus*, um fungo filamentosos pertencente à família Aspergillaceae, cujo habitat é o solo, mas amplamente difundido sendo mais encontrado em locais úmidos como plantações irrigadas, guano de herbívoros e de pássaros, ninhos de pássaros e de jacarés, grãos de cereais e farinha embolorada (Summerbell, 1998). A

reprodução do fungo se faz por brotamento ou por ramificação e seus conídios, unidades de reprodução assexuada medem entre 2 e 5  $\mu\text{m}$  de diâmetro, o que garante a sua penetração até os bronquíolos terminais. O *Aspergillus fumigatus* é considerado um patógeno oportunista associado a uma vasta gama de doenças, e as formas invasivas que acometem indivíduos imunocomprometidos estão se tornando cada vez mais frequentes devido ao aumento da sobrevivência dos pacientes com doenças como a síndrome de imunodeficiência adquirida, muitos tipos de cânceres e transplantes (Lacaz et al., 2002).

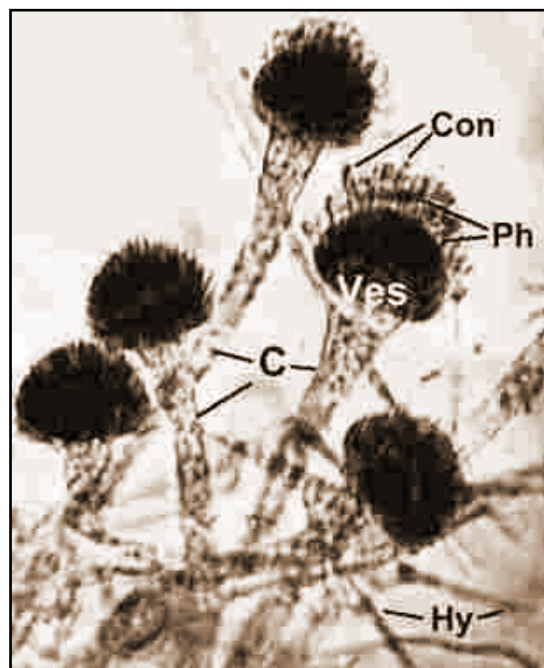
As espécies de *Aspergillus* apresentam em comum uma estrutura denominada conidióforo que possui uma dilatação globosa numa de suas extremidades, a vesícula. A essa formação se inserem ramificações alongadas, ou métulas, com estruturas menores ligadas às suas extremidades ou fiálides, às quais se ligam as cadeias de conídios arredondados. Michelli<sup>3</sup>, monge botânico, observou em (1729 apud Bardana, 1980, p. 21-83) a

---

<sup>3</sup> Michelli PA. Nova plantarum genera juxta tournefortii methodum disposita. Florença, 1729

semelhança da vesícula com um aspersor de água benta que é notada quando as métulas se destacam deixando nesta, impressões arredondadas que fazem lembrar orifícios. Tanto as fiálides como os conídios são unidades reprodutoras e dão origem a hifas que ramificam formando ângulos de 45°. A identificação das espécies de *Aspergillus* se faz pela coloração das colônias, rugosidade da superfície dos conidióforos e pela presença de métulas, que no caso do *Aspergillus fumigatus* estão ausentes e por isso seus conidióforos são chamados de unisseriados.

Um dos fatores úteis na diferenciação das espécies é a forma e o tamanho dos conídios. O destacamento e a dispersão dos conídios, das vesículas e das fiálides se dá pela movimentação do ar, não havendo dispersão por mecanismos especiais próprios de outros gêneros de fungos (Summerbell, 1998).



Con: conídios; ph:fiálides; Ves: vesículas; C: conidióforo

Figura 1 - *Aspergillus fumigatus* estruturas de reprodução assexuada

Há mais de 350 espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus*, mas só algumas são termofílicas como o *Aspergillus fumigatus* e o *Aspergillus niger*. Essa propriedade confere

resistência a temperaturas de até 45° e explica o fato de que 90% das doenças por *Aspergillus sp* em seres humanos estão associadas a uma dessas duas espécies (Sharma, Chwogule, 1998). Outro fator de resistência é a osmotolerância que possibilita a sobrevivência do fungo em condições de restrição de água.

Atividades que liberam na atmosfera grande número de partículas do fungo como movimentação de terras ou demolição de prédios expõe pessoas mais susceptíveis a todas as formas de aspergilose.

No Brasil, os primeiros trabalhos que assinalaram a importância da associação da asma com o *Aspergillus fumigatus* datam da década de 70 (França, 1974).

Um levantamento abrangendo a região da Grande São Paulo registrou a presença do gênero *Aspergillus* durante todo o ano, com maior frequência de isolamentos no verão. A incidência do fungo variou de 15% a 36% das amostras, conforme o local pesquisado, sendo mais freqüente na região de Moema (Gambale et al., 1977). Esses registros mostraram que a população da região São Paulo está constantemente exposta ao fungo, condição

essencial para a sensibilização e para o desenvolvimento da doença em indivíduos predispostos. Algumas condições especiais como o hábito de fumar maconha mal desidratada ou estocada em locais úmidos pode favorecer o desenvolvimento da doença (Llamas et al., 1978; McPartland, 1994).

Existem substâncias produzidas pelos conídios como adesinas, pigmentos, moléculas tóxicas e enzimas que têm importância fundamental para a adesão à camada epitelial dos brônquios e que são responsáveis pelas lesões que acontecem durante a colonização do fungo. As adesinas promovem a interação das proteínas das células do hospedeiro com o *Aspergillus fumigatus*. Entre essas proteínas há os receptores de complemento com peso molecular em torno de 54 a 58 kDa, os receptores de laminina com peso molecular de 72 kDa e as hidrofobinas com peso molecular de 14 e 16 kDa.

Os pigmentos inibem a fagocitose dos conídios e uma das substâncias descritas é a dihidroxi-naftaleno-melanina (Langfelder et al., 2003). As moléculas tóxicas têm como efeito a indução da morte das células do hospedeiro e são representada pela RNase



de 18 kDa, pela hemolisina de 30 kDa que acarreta a lise de eritrócitos e a gliotoxina que induz a fragmentação do DNA dos macrófagos com conseqüente imunossupressão (Waring, 1990).

As enzimas que têm a função de promover a colonização do fungo na matriz pulmonar são : a serino-protease com peso molecular de 33 kDa, a aspártico-protease com 38 kDa, a metaloprotease com 40 kDa e as dipeptidilpeptidases com 88 e 94 kDa. Há também as moléculas que atuam como antioxidantes durante a fagocitose, como a catalase de 350 kDa e as superoxidodismutases de 27 e de 67 kDa. As fosfolipases têm ação direta no epitélio, danificando as mucosas (Birch et al., 1996). Um estudo experimental com macrófagos isolados de ratos Wistar foi identificada uma toxinas de peso molecular menor que 10kDa que inibe o mecanismo de queima oxidativa dessas células (Slight et al., 1996).

### 1.3.2 Extratos de *Aspergillus fumigatus* e conteúdo antigênico

Foram descritas 44 frações antigênicas do *Aspergillus fumigatus* por análise imunoquímica (Tomee et al., 1997). Alguns desses antígenos foram caracterizados na década de 80 e testados para aplicação no diagnóstico de várias formas da doença.

A primeira fração do *Aspergillus fumigatus* a ser descrita, o antígeno Asp f 1 de 18 kDa foi inicialmente obtido de filtrado de cultura e neste meio encontra-se mil vezes mais concentrado do que nos extratos de micélio e de esporos, o que indica que a germinação dos esporos e o crescimento dos fungos são essenciais para a produção do alérgeno (Arruda et al., 1992b). Por essa razão é necessário empregar extratos de filtrado de cultura e de micélio em testes clínicos e de laboratório. Esse antígeno que pertence à família das mitogilinas que são citotoxinas foi isolado por várias técnicas, inclusive por clonagem molecular. Um estudo comparativo de Asp f 1 e da mitogilina empregando inibição cruzada com soros de pacientes com ABPA e testes cutâneos

mostrou que essas substâncias são antigênicamente semelhantes (Arruda et al., 1990).

A restrictocina isolada do *Aspergillus restrictus* apresenta alto grau de homologia com o Asp f 1 e foi isolada de sítios de infecção por *Aspergillus sp* sendo considerada um provável fator de virulência (Lamy et al., 1991). Essa fração difere da mitogilina por apenas um aminoácido. Na posição 115 da cadeia da mitogilina, em lugar do ácido aspártico encontrado na cadeia da restrictocina, encontra-se a asparagina.

A  $\alpha$ -sarcina, isolada do *Aspergillus giganteus*, também pertence à família das ciclofilinas, apresenta 86% de homologia com a Asp f 1 e por ser um antígeno secretado, o encontro dessa fração estabelece ligação com a colonização do fungo (Arruda et al., 1992b).

A  $\alpha$ -sarcina, a mitogilina e a restrictocina são citotoxinas e existe grande interesse em identificá-las como fatores de virulência pelas possibilidades de sua utilização em testes diagnósticos.

Asp f 2 é uma proteína que pode se ligar ao fibrinogênio e tem peso molecular de 37 kDa. Foi constatada sua capacidade de ligação a IgE em pacientes com ABPA através da comparação de soros de pacientes com asma sensibilizados e indivíduos sem asma e não sensibilizados, empregando as técnicas de Western-blot, "RAST" e ELISA (Banerjee et al., 1996). Essa fração é uma proteína de 310 aminoácidos que, segundo alguns autores apresenta alta ligação com a IgE sérica de pacientes com ABPA, especialmente os que apresentam bronquiectasias centrais. Essa substância apresenta homologia com uma glicoproteína de 37 kDa obtida do filtrado de caldo de cultura e com outra com 55 kDa da porção solúvel de extrato de micélio.

A alta concentração de IgE específica para esse antígeno em pacientes com ABPA com bronquiectasias pode indicar sua participação nas lesões irreversíveis dos pulmões (Crameri et al., 1998b).

A fração Asp f 3 é uma proteína peroximal que apresenta reação cruzada com duas proteínas homólogas de *Candida boidiini* e de *Malassezia furfur*. Uma proteína recombinante obtida a

partir de Asp f 3 demonstrou aplicação em testes cutâneos (Hemmann et al., 1998).

A fração Asp f 4 é uma proteína com função bioquímica ainda não esclarecida. Experimentos básicos para o encontro da proteína usando anticorpos monoclonais contra Asp f 4 indicam que essa fração não é secretada pelo fungo.

A fração antigênica 5 do *Aspergillus fumigatus* pertence a uma família de proteases secretadas. Trata-se de uma metaloprotease que tem propriedades alergênicas e trabalhos recentes imputam a essa enzima características próprias de fatores de virulência (Banerjee, Kurup, 2003). A alergenicidade da Asp f 9, uma protease aspártica foi confirmada, bem como sua capacidade de danificar as mucosas por ação enzimática.

O alérgeno Asp f 6 é uma proteína de 26,7 kDa identificada como uma enzima superóxido dismutase de manganês que foi clonada e isolada de uma biblioteca de DNA citoplasmático disposta na superfície de um fago filamentoso (Cramer et al., 1998a). O clone de Asp f 6 apresenta 51,1% de identidade e

67,2% de homologia com uma proteína humana (P2) (Mayer et al., 1999).

Asp f 12 : com 65 kDa é uma proteína de fusão clonada e expressada a partir de uma biblioteca de cDNA e que pertence à família de proteínas de choque térmico 90 (Hsp 90); é reconhecida por se ligar a anticorpos IgG e IgE de pacientes com ABPA. As proteínas de choque térmico em geral são consideradas proteínas importantes na resposta inflamatória por serem altamente conservadas filogeneticamente e por seu poder imunogênico. A imunogenicidade da família de proteínas Hsp 70 e Hsp 90 foi comprovada pelo efeito estimulador dessas proteínas na resposta imunológica contra a malária em macacos. Esses dados sugerem o efeito imunogênico para a fração 12 (Banerjee, 2003).

A fração Asp f 13, com peso molecular de 33 kDa foi identificada, purificada e caracterizada como uma serino protease alcalina extracelular (Jaton\_Ogay et al., 1992).

Outras frações já foram descritas como : Asp f 15, Asp f 16, Asp f 17 e Asp f 18, mas apenas a Asp f 15 e a Asp f 17 produziram testes cutâneos positivos.

Os testes cutâneos com extratos de fungos são utilizados há muitos anos para o diagnóstico de pacientes sensibilizados (Aas et al., 1980) e desde então sempre dependeram da padronização dos extratos. Através da utilização desse método pesquisadores concluíram que a medida das pápulas produzidas pelo mesmo extrato nos indivíduos com ABPA e naqueles apenas com asma, sensibilizados ao *Aspergillus fumigatus*, mas sem ABPA, era semelhante, não sendo possível distinguir doentes e sensibilizados através de teste cutâneo (Bousquet, Michel, 1993).

Através de clonagem foi obtida uma forma recombinante do Asp f 1 (Moser et al., 1992). Esse recombinante foi utilizado para determinar a concentração de Asp f 1 dos extratos comerciais e pelo método de ELISA, foi possível estabelecer equivalência entre as medidas das pápulas produzidas pelos extratos "tradicionais" e pelos recombinantes. Um trabalho do mesmo grupo, utilizando testes cutâneos com Asp f 1 recombinante diferenciou estatisticamente os pacientes com ABPA dos sem ABPA, demonstrando sua aplicabilidade em testes diagnósticos com muitas vantagens. Os antígenos recombinantes

podem ser produzidos em quantidades ilimitadas, sem a variabilidade dos antígenos naturais, são padronizados mais facilmente e não tendem a apresentar frações contaminantes, com diferentes pesos moleculares, atividade bioquímica e diferentes graus de ligação a IgE e IgG (Moser et al., 1993).

A aplicabilidade desses recombinantes foi confirmada em pacientes com fibrose cística (Nikolaizik et al., 1996) e outro estudo mostrou que a mitogilina recombinante tem as mesmas propriedades que as proteínas naturais no que se refere aos testes sorológicos (Weig et al., 2001; Cramer, 2002).

Os antígenos recombinantes ainda não estão disponíveis comercialmente no Brasil, mas alguns países já dispõem dessa tecnologia. Foi realizado um estudo recentemente em nosso meio empregando as frações recombinantes 1, 2, 3, 4 e 6 provenientes do laboratório que os comercializa na Suíça. Pela pesquisa, a determinação sérica da IgE específica contra alérgenos recombinantes do Asp f não auxiliou no diagnóstico de ABPA, como também não foi eficiente na detecção de sensibilização pelo fungo (Oliveira, 2003). A aplicação desses antígenos a um número



maior de pacientes talvez permita diferenciar pacientes com ABPA e pacientes com asma sensibilizados ao fungo.

Extratos brutos de *Aspergillus fumigatus* têm sido aplicados em testes sorológicos para diagnóstico, como ELISA e Western-blot para diagnóstico, com resultados variáveis, uma vez que o conteúdo alergênico dos extratos utilizados não é homogêneo.

Alérgenos de A f	Propriedades	Tamanho(bp)	Peso Molecular(Kd)	Reatividade a IgE
Asp f 1	Ribonuclease	678	18	Intensa
Asp f 2		1572	37	Intensa
Asp f 3	Prot peroximal	630	21	Intensa
Asp f 4		1080	40	Intensa
Asp f 5	Metaloprotease	1270	42	Intensa
Asp f 6	Superoxidodismutase de Manganese	666	26,7	Intensa
Asp f 7		860	10	Regular
Asp f 8		870	38	Intensa
Asp f 9		920	43	Intensa
Asp f 10	Protease aspártica	1000	34	Regular
Asp f 11	Peptidil-prolil-isomerase	—	24	—
Asp f 12	Heat-shock protein	1649	47	Regular

Fonte: IUIS Allergen Nomenclature Subcommittee.

Figura 2 - Alérgenos recombinantes de *Aspergillus fumigatus*

## 1.4 MECANISMOS DE DEFESA DO HOSPEDEIRO CONTRA O *Aspergillus fumigatus*

O sistema de defesa do hospedeiro contra a infecção compreende a resposta inata, altamente eficiente em pessoas saudáveis e a resposta adaptativa da qual fazem parte os linfócitos Th1 e Th2, as células reguladoras, os linfócitos B e os anticorpos produzidos contra aos fatores de virulência dos fungos (Huffnagle, Deepe, 2003).

### 1.4.1 Resposta inata

As células epiteliais da mucosa de revestimento das vias aéreas funcionam como uma barreira à entrada do fungo, as células excretoras presentes na mucosa produzem glicoconjugados, defensinas e enzimas que auxiliam a eliminação das partículas inaladas.

O movimento coordenado dos cílios elimina o material impactado para fora das vias aéreas. A modulação desse clearance é feita por mediadores como prostaglandinas, que apresentam mecanismo regulador desconhecido e cuja ação é inibida por substâncias secretadas por bactérias e fungos.

A defesa da mucosa é feita também por peptídeos com atividade microbicida cuja produção é intensificada pela presença de bactérias. A  $\alpha$ -defensina e a  $\beta$ -defensina-1 pertencem à família das defensinas catiônicas e têm alto poder bactericida (Stolzenberg et al., 1997).

As defensinas estão entre os peptídeos antibióticos mais estudados por sua capacidade de inibir a atividade de algumas proteínas séricas. A antileucoprotease (ALP) é um inibidor da leucoprotease de bactérias e foi possível mostrar que além de ser uma antiprotease ela também tem a propriedade de inibir fortemente a proliferação dos fungos. Essa propriedade foi verificada também em sua forma recombinante (Moser et al., 1994). O peptídeo antimicrobiano traqueal (TAP), o peptídeo

antimicrobiano lingual (LAP) e os peptídeos LL-37 têm atividade inibitória sobre a proliferação de microorganismos. Os macrófagos alveolares dos indivíduos imunocompetentes têm função essencial fagocitando e eliminando os esporos inalados de modo eficiente (Latgé, 1999; Marr et al., 2001).

#### **1.4.2 Resposta imune humoral**

Embora o alto índice de IgE seja considerado um dos marcadores mais importantes da *Aspergilose Brocopulmonar Alérgica*, a resposta aos antígenos de *Aspergillus fumigatus* é policlonal, o que ficou estabelecido por Brummund em 1991, que registrou aumento de IgG, IgM, IgD, IgA e IgE em 13 pacientes com esse diagnóstico, o que não foi registrado em pacientes com asma sensibilizados ao *Aspergillus fumigatus* e em indivíduos normais (Greenberger, 1988).

A resposta imunológica alérgeno-específica aos antígenos de *Aspergillus fumigatus* começa com a interação de peptídeos do

complexo MHC de células apresentadoras de antígeno com os receptores de linfócitos T. As células T-helper recebem sinais co-estimulatórios de células apresentadoras dos antígenos do fungo e são estimuladas a proliferar e a secretar citocinas.

Embora se verifique uma diferença significativa de níveis de IgE total em pacientes com ABPA e sensibilizados ao fungo comparados com asmáticos e indivíduos não sensibilizados, há relatos de pacientes com dosagem de IgE baixa, talvez por se encontrarem em fase de remissão da doença (Murali et al., 1998).

#### **1.4.3 Resposta imune celular**

Os eosinófilos estão presentes nas vias aéreas de pacientes com asma e tem sido considerados marcadores da doença com papel importante na sua fisiopatogenia pela liberação de substâncias inflamatórias como a proteína catiônica eosinofílica. A presença de eosinofilia associada aos quadros de ABPA foi registrada nos primeiros relatos de caso da doença e

passou a ser considerada um dos critérios essenciais no seu diagnóstico. Nesta última o número de células circulantes é bem mais elevado nos pacientes que não estejam fazendo uso de corticóides do que na asma sem ABPA em que a concentração de eosinófilos acontece mais nos tecidos e nas secreções (Greenberger, 1988).

O padrão de células inflamatórias nas secreções das vias aéreas em pacientes com ABPA e em controles com asma sensibilizados e asma tem sido investigado há muitos anos.

Em 1994 Walker encontraram no lavado broncoalveolar de 5 pacientes com ABPA, um padrão misto de eosinófilos, linfócitos e neutrófilos, além de níveis aumentados de fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos, GM-CSF e de IL4, IL5, citocinas associadas a linfócitos Th2 vistos na asma alérgica.

Entretanto, observaram também IL-2 e IFN- $\gamma$ , produzidas por linfócitos Th1 (Tomee et al., 1997), o que já havia sido demonstrado no sangue periférico (Graziutti et al., 1998). Concluíram que alguns peptídeos do fungo são capazes de

estimular citocinas próprias de resposta Th2 mas também de Th1. TGF- $\beta$ 1, que é uma citocina que ativa a fibrinogênese e é ativada por duas vias MMP-9 e pela via plasmina-dependente, conforme estudo recente (Lee et al., 2001).

Hoje sabemos que na ABPA ocorre um desequilíbrio Th1/Th2 com "inclinação" para Th2 em que IL4 desempenha papel central (Knutsen, 2003), previamente existente na asma e intensificado pelos antígenos das hifas e conídios do fungo (Schwartz, Greenberger, 1991), que estimulam a diferenciação de clones de linfócitos CD4<sup>+</sup> Th2, que, por sua vez, através de citocinas, estimulam linfócitos B a produzir IgE e recrutam eosinófilos ao local da inflamação. O resultado é o espessamento da membrana basal e a hipertrofia dos músculos lisos. IL-10 parece estar envolvida na regulação desse mecanismo (Grunig et al., 1997).

TNF- $\alpha$ , uma citocina de 17 kDa secretada por várias populações de macrófagos inclusive os alveolares apresentam atividade protetora contra a presença de conídios na árvore

brônquica o que ficou demonstrado em um experimento em que camundongos BALB/c imunocompetentes inoculados com conídios de *Aspergillus fumigatus* apresentaram aumento importante da concentração dessa citocina e rápida resolução da resposta inflamatória enquanto os mesmos animais tratados com ciclofosfamida e que tiveram as células depletadas apresentaram uma resposta inflamatória mais duradoura (Mehrad et al., 1999).

Linfócitos CD4+ são encontrados em todas as fases da doença com predominância de linfócitos CD4+ do tipo Th2 nas fases iniciais e CD4+ do tipo Th1 nas fases tardias da doença.

Esta condição conduz a novas estratégias terapêuticas, como o uso de anticorpos anti-interleucinas e anti-receptor celular que poderão ser aplicados para impedir o agravamento das alterações pulmonares (Kurup et al., 1997). Por outro lado, as células T-helper deixam de responder quando os sinais co-estimulatórios são bloqueados ou quando se expõe a célula a uma alta concentração de peptídeos antigênicos.



Uma análise mais profunda permitiu observar que certos epitopos de alérgeno podem funcionar como fortes inibidores de células T, daí o cuidado em adequar o antígeno aos estudos de linfoproliferação.

A pesquisa de populações de linfócitos dos pacientes com ABPA tem revelado uma significativa associação de fenótipos HLA-DR, principalmente subtipos DRB1\*1501, \*1503; DRB1 \*1601 para HLA-DR2 e para HLA-DR5 os subtipos DRB1 \*1101, \*1104 e \*1202. em pacientes com ABPA. O fenótipo DQ parece conferir resistência (Chauhan et al., 1997).

## 1.5 FISIOPATOGENIA

Os mecanismos imunológicos envolvidos na ABPA são do tipo I, III e IV, pela classificação de Gell e Coombs. As reações imunológicas caracterizadas pelo tipo I, mediadas por IgE, resultam em broncospasmo, eosinofilia e resposta cutânea imediata, sendo que todas essas situações foram reproduzidas

experimentalmente através de testes cutâneos ou com broncoprovocação com extratos de *Aspergillus sp* (Kauffman, Tomee, 2002). Conforme ficou evidenciado, o infiltrado eosinofílico é mediado por uma reação tardia induzida por substâncias derivadas da degranulação de mastócitos que vão promover a ativação das células epiteliais (Kauffman, 1998).

Biópsias de pulmão realizadas nos casos em que a presença de atelectasias, infiltrados ou nódulos foram indicadas por especialistas, permitiram observar deposição de imunoglobulinas no endotélio vascular característica de reação do tipo III ou reação de "Arthus". A reação de hipersensibilidade do tipo III acontece na presença de excesso de antígenos inalados que reagem com anticorpos circulantes formando imunocomplexos que se depositam e ativam a cascata do complemento com conseqüente dano no tecido alveolar pulmonar (Cockrill, 1999).

Outro modelo proposto para explicar a patogênese das alterações pulmonares sugere um mecanismo do qual participam as células epiteliais, permanentemente ativadas pela presença

constante de enzimas do fungo na árvore brônquica, liberando citocinas inflamatórias (Kauffman, 2003). Provavelmente os dois processos estejam envolvidos na fisiopatogenia das bronquiectasias.

Uma reação cutânea semelhante à produzida pela tuberculina caracterizando mecanismo tipo IV ainda não ficou comprovada. Entretanto, a descoberta de linfócitos sensibilizados aos antígenos do *Aspergillus fumigatus* e seus mediadores, encontrados em estudos de proliferação com linfócitos de sangue periférico além da presença de infiltrados de células mononucleares nos granulomas observados em alguns pacientes com ABPA sugerem esse mecanismo (Knutsen, 2003).

Estudos experimentais permitiram acompanhar a seqüência de alterações que acontecem na árvore respiratória a partir da instalação do *Aspergillus fumigatus*. Na fase inicial da doença há perda da integridade da mucosa pela ação das proteases liberadas pelo fungo que facilitam a passagem dos antígenos para a circulação induzindo macrófagos e eosinófilos a

liberar citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas com conseqüente destacamento das células epiteliais da árvore respiratória que caracteriza o remodelamento (Tomee et al., 1997; Kauffman, 2003). Conseqüentemente há dano no mecanismo de limpeza mucociliar, dificultando a eliminação dos microorganismos instalados nos brônquios. Numa fase subseqüente os alvéolos são danificados e o surfactante fica alterado. Verificou-se que as frações A e D do fibrinogênio constituem elementos de defesa, pois participam do processo inflamatório que acompanha a penetração do fungo (Annaix et al., 1992), aumentando a aglutinação, a fagocitose e a morte dos conídios (Coulot et al., 1994; Madan et al., 1997).

Esses eventos poderiam explicar as alterações radiológicas características das fases iniciais da doença: bronquiolite, espessamento brônquico e impactação mucóide que se traduz pela eliminação de moldes de muco da árvore bronquiolar (Kauffman, Tomee, 2002).

Quando os fungos permanecem na árvore brônquica, a inflamação das vias aéreas pode se intensificar com infiltração de eosinófilos e liberação de peptídeos alergênicos que aumentam a permeabilidade vascular. O comprometimento das vias aéreas poderá se tornar mais intenso, evoluindo para espessamento brônquico e fibrose (Kauffman, 2003).

Os brônquios proximais apresentam-se dilatados à broncoscopia e preenchidos por rolhas de muco, cristais de Charcot-Leyden, espirais de Curshmann e hifas. A mucosa brônquica pode apresentar metaplasia escamosa e os bronquíolos terminais contêm muco impactado. Encontram-se áreas de bronquiolite obliterante e o parênquima pulmonar que circunda os bronquíolos podem apresentar áreas de pneumonia eosinofílica (Tomee et al., 1997).

Trabalhos recentes têm proposto um modelo mais completo para explicar a imunopatogênese da doença, sugerindo que citocinas, como a IL-4, IL-6, IL-8 e IL-13 (Borger et al., 1999; Blease et al., 2001; Kauffman, 2003). Várias quimiocinas

como a eotaxina, C-10, RANTES e MCP-3 derivadas de células epiteliais, endoteliais e fagócitos mononucleares que induzem a quimiotaxia e ativação de eosinófilos participam do processo (Hogaboam et al., 1999). Moléculas de adesão como VCAM-1 estão envolvidas no processo de remodelamento do epitélio brônquico e no desenvolvimento de bronquiectasias e fibrose (Alam, 1997).

A observação de pacientes com asma e sensibilidade ao *Aspergillus fumigatus*, com gravidades diferentes da doença tem conduzido investigações sobre a imunomodulação da defesa contra a aspergilose. Os linfócitos desses indivíduos apresentam características fenotípicas diferentes da população de asmáticos sem ABPA. Os trabalhos de Chauhan et al. (1996, 1997) indicaram que pacientes sensibilizados que não evoluem para formas clínicas e radiológicas mais graves apresentam fenótipos HLA-DQ associados à proteção contra a doença.

Foram descritos clones de células T específicos para o antígeno Asp f 1 (Banerjee, Kurep, 2003) e a maioria desses clones de linfócitos reagiram com dois epitopos da mitogilina. Dois

fragmentos de peptídeos de Asp f 1 representando os resíduos de aminoácidos 46 a 65 e 106 a 125 estimulam apenas os leucócitos humanos com fenótipo HLA-DR2 e HLA-DR5. Usando ratos como modelo experimental, verificou-se que peptídeos de Asp f 1 podem tanto estimular a proliferação de linfócitos CD4+ Th2 como CD4+ Th1 (Kauffman, 2003).

O conhecimento dos mecanismos de resposta imunológica celular ao crescimento do *Aspergillus sp.* na árvore brônquica tem trazido possibilidades de diagnóstico e tratamento da doença. O exame da função das células do sangue periférico revelou uma ativação predominante de células Th2 CD4+, com produção de citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, que promovem a síntese de anticorpos e, portanto, estimulam a imunidade humoral.

Linfócitos Th1 também estão presentes, caracterizando uma resposta à exposição contínua da árvore brônquica aos antígenos do *Aspergillus fumigatus* (Huang et al., 1995). Um fato que ilustra a resposta de Th1 aos antígenos do fungo foi recentemente relatado (Mayer et al., 1999). Esse autor

demonstrou que a proteína P2 de 13 kDa tem capacidade de provocar reações auto-ímmunes, por sua homologia com uma proteína humana (Kurup et al., 1994). A proteína P2-humana é uma proteína acídica, ribossômica de 11,1 kDa que foi encontrada em indivíduos portadores de lúpus eritematoso sistêmico, o que sugere a participação de antígenos do fungo em processos de auto-ímmunidade e que pode estar relacionada com as lesões de pulmão nas formas mais crônicas da doença. O encontro de anticorpos para essa proteína foi registrado nas fases tardias, mas não nos estágios iniciais da mesma, sugerindo a existência de um processo auto-ímmune nas fases avançadas da doença.



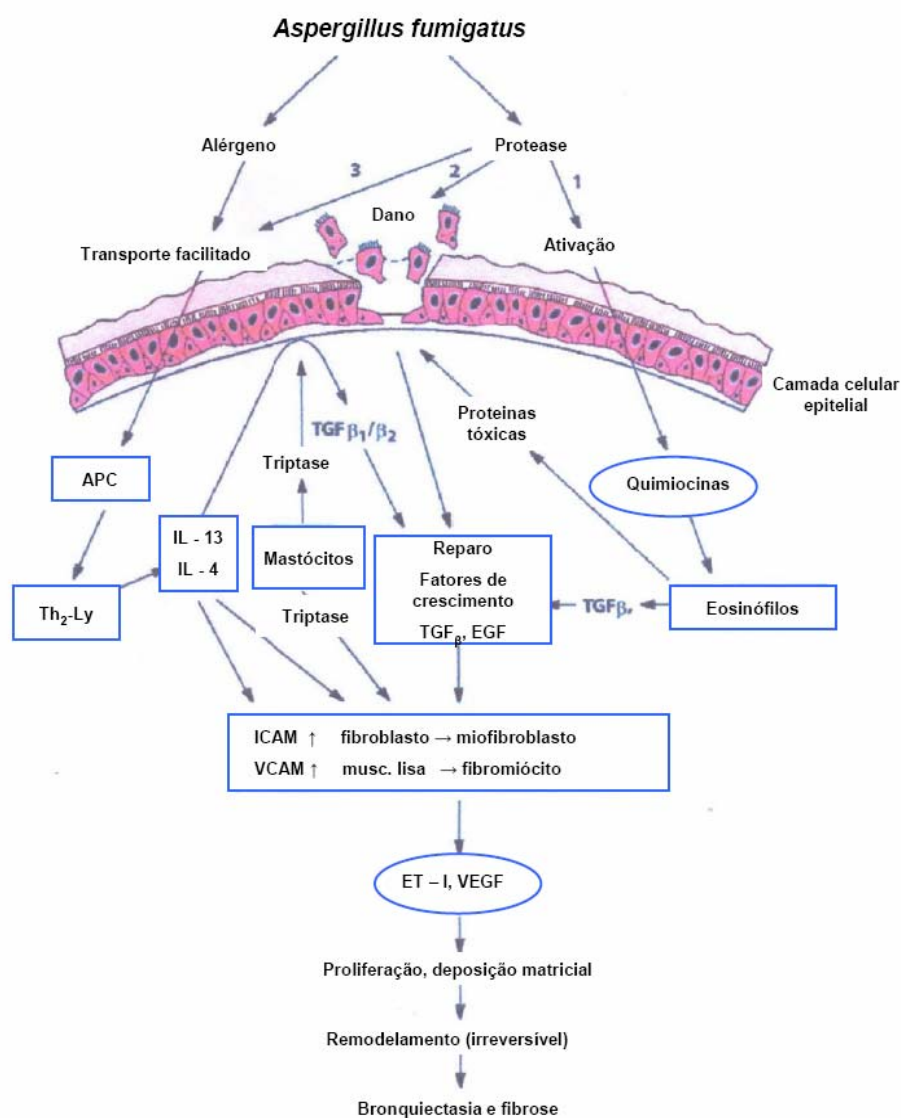


Figura 3 - Esquema ilustrativo dos mecanismos fisiopatogênicos da Aspergilose Broncopulmonar Alérgica

Legenda: APC-célula apresentadora do antígeno; Th<sub>2</sub>- Ly: Linfócito T-helper 2; IL-13 e IL-4: Interleucinas-13 e 4; ICAM e VCAM; moléculas de adesão; EGF -Fator de crescimento de eosinófilo; TGF: Fator de crescimento tumoral

### 1.5.1 Produção de citocinas na Aspergilose Broncopulmonar Alérgica

Wark et al. (1999) caracterizaram o padrão de citocinas desse processo inflamatório em secreção broncoalveolar. Descreveram o encontro de altos níveis de IL-8 e de proteína catiônica eosinofílica, que são substâncias que caracterizam a degranulação de eosinófilos na fase ativa da ABPA em concentrações mais altas do que as que haviam sido encontradas em um grupo de pacientes com asma (Walker, 1994). Correlacionaram essas substâncias com os crescentes graus de alteração da árvore brônquica na ABPA registrados pela Tomografia Computadorizada de Alta Resolução, mostrando que a dosagem de citocinas no escarro pode ser um índice útil na avaliação da gravidade e no estadiamento da doença.

Grunig et al. (1997) verificaram que murinos "knock-out" para IL-10 apresentaram alto índice de mortalidade quando foram inoculados com o *Aspergillus fumigatus* na árvore respiratória,

sugerindo que a presença desta citocina pode conferir proteção. Além disso, a ação antiinflamatória dessa citocina foi bem estabelecida e é conhecido o seu efeito de inibir o aparecimento e o desenvolvimento de eosinófilos na asma. Sugerem outros autores que asmáticos que desenvolvem ABPA podem apresentar uma deficiência de IL-10 ainda que temporária, o que facilitaria a colonização do fungo (Del Prete et al., 1993).

O papel das citocinas na cascata alérgica tem sido definido em estudos em camundongos nos quais o padrão de proteção à doença está associado à presença de CD4<sup>+</sup> produtoras de INF- $\gamma$  e macrófagos produtores de IL-12. A administração de anticorpos anti-IL-4, anti-TNF- $\alpha$  e anti-receptor solúvel de IL-4 recuperou animais com a forma invasiva da doença, demonstrando de forma clara o efeito protetor dessas substâncias (Hogaboam et al., 2003).

## 1.6 DIAGNÓSTICO E ESTADIAMENTO DA ABPA

O padrão ouro para o diagnóstico da aspergilose broncopulmonar alérgica é um conjunto de critérios laboratoriais e radiológicos descritos por Patterson et al. em 1982, sistematizados por Rosenberg em 1997 e revistos por Greenberger em 2002. Segundo esses autores, pode-se estabelecer o diagnóstico definitivo de ABPA na presença dos seguintes critérios: asma, reação cutânea imediata positiva a extrato antigênico de *Aspergillus fumigatus*, IgE >1000ng/mL, eosinofilia, presença de IgE específica e IgG específica e bronquiectasias proximais nos lobos superiores dos pulmões. Outros marcadores menores que podem estar presentes são: infiltrados pulmonares, anticorpos precipitantes e eliminação de rolhas de muco marrom com hifas do fungo.

Safirstein seguiu um grupo de pacientes por cinco anos e confirmou a importância dos critérios diagnósticos da classificação entre maiores e menores propostas por Rosenberg e

verificou a indicação dos corticoides sistêmicos nas formas mais graves da doença para diminuir a inflamação alérgica, sem contudo reverter as alterações anatômicas.

A Tomografia Computadorizada de Alta Resolução tem grande valor diagnóstico e mostra alterações dos brônquios que nem sempre são visíveis ao RX simples dos pulmões (Neeld et al., 1990). Segundo trabalhos recentes, foi possível estabelecer correlações entre as mudanças radiológicas, o número de eosinófilos circulantes e os níveis de imunoglobulinas (Tomee et al., 1997).

Os métodos sorológicos para o diagnóstico da ABPA evoluíram muito nas duas últimas décadas, mas a doença permanece pouco diagnosticada, pois esses critérios dependem de antígenos bem caracterizados e purificados que se tem revelado pouco sensíveis em testes com antígenos de fungo em trabalhos realizados em nosso meio. Acredita-se que outras espécies como o *A. niger*, *A. giganteus*, *A. amstelodami*, podem estar causando a doença e por essa razão não são detectados antígenos circulantes

para o *Aspergillus fumigatus*. Outra explicação é que se tratam de penicilioses, cladosporioses, curvularioses e outras doenças causadas por diferentes fungos (Mc Aller et al., 1981; Halwig et al., 1985; Miller et al., 1993). Alguns autores mostraram que os antígenos comerciais são preparados com cepas de *Aspergillus fumigatus* que fornecem extratos com diferentes composições antigênicas (Wallenbeck et al., 1984). Outros autores registraram variação antigênica relacionada aos meios em que os fungos são cultivados e ressaltam a importância de meios definidos para a obtenção de extratos com conteúdo antigênico constante (Latgé, 1995).

Autores brasileiros contribuíram de forma significativa para o conhecimento dos antígenos de *Aspergillus fumigatus*. A identificação dos antígenos Asp f 16, 18 e 45 que são reconhecidos por anticorpos IgG e IgE humanos de *Aspergillus fumigatus* foi realizada por Arruda et al. em 1992a.

O grupo de Crameri publicou em 2002 os resultados dos estudos sobre a aplicação de antígenos recombinantes no

diagnóstico diferencial de pacientes com asma sensibilizados e portadores de ABPA e registrou que os pacientes com asma reagem às frações Asp f 1 e Asp f 3 e aqueles com diagnóstico de ABPA reagem com Asp f 2, Asp f 4 e Asp f 6, sugerindo que a reação sorológica empregando as frações recombinantes podem ser aplicadas ao diagnóstico da doença.

As lesões de grandes vias aéreas que podem ser encontradas na Aspergilose Broncopulmonar Alérgica são: bronquiectasias císticas e varicosas, espessamento brônquico, impactação mucóide, áreas de enfisema, nódulos, atelectasias e opacidade em vidro fosco. As lesões de pequenas vias que podem ser encontradas na ABPA são: mosaico, nódulos de consolidação, aprisionamento de ar e proeminência brônquica (Angus et al., 1994).

A tomografia computadorizada de alta resolução permite diagnosticar lesões, como: áreas de aprisionamento de ar, impactação mucóide, espessamento de brônquios e nódulos, que são alterações que antecedem as lesões mais graves, nas fases

mais avançadas da doença, caracterizada por bronquiectasias centrais varicosas ou císticas e fibrose (Eaton et al., 2000).

As bronquiectasias são alterações pulmonares graves, progressivas e irreversíveis que vêm ganhando muita importância porque hoje se reconhece sua associação a um número crescente de doenças como as doenças pulmonares obstrutivas crônicas, a imunodeficiência comum variável, a síndrome de Jögren, a deficiência de  $\alpha$ -1 antitripsina, AIDS e outras (Tino, 2006). A associação de bronquiectasia com a aspergilose broncopulmonar alérgica diagnosticada é de 98% (Mitchell et al., 2000).

Segundo Patterson et al. (1986) a doença apresenta cinco estágios distintos, quanto à clínica e quanto aos exames radiológicos e sorológicos.

O primeiro estágio é agudo, com sintomas de dispnéia, tosse produtiva, febre e ausculta de sibilância, acompanhada de eosinofilia e presença de anticorpos circulantes contra as proteínas antigênicas do *Aspergillus fumigatus* (Greenberger, 1988). Segundo trabalhos experimentais, nesse período haveria



invasão da árvore brônquica pelo fungo. Foi amplamente documentada a resposta a uma grande variedade de antígenos através de anticorpos do tipo IgG, IgA e IgE, sendo que o nível de IgE total nessa fase pode superar 1000 ng/ml ou 417 kUI/l (Tomee et al., 1997). Podem ser observados infiltrados pulmonares transitórios através da radiografia de tórax e da Tomografia Computadorizada. Os testes cutâneos são positivos nessa etapa da doença, demonstrando a presença de IgE específica (Grunig et al., 1997). O tratamento nessa fase é feito com prednisona, o medicamento mais empregado para o tratamento da doença que produz diminuição do nível de IgE total e de eosinófilos, com conseqüente diminuição da inflamação.

O segundo estágio também chamado de período pós-prednisona, caracteriza-se pela remissão dos sintomas. A concentração de IgE sérica declina e fica estabilizada em um nível acima do normal. Esse período pode se tornar permanente ou pode terminar, após muitos anos, com uma exacerbação. O teste cutâneo imediato mantém-se positivo e se encontram precipitinas no soro.

O terceiro estágio pode ser reconhecido pelo encontro de novos infiltrados pulmonares, associados a um aumento de IgE, cuja concentração inicial varia de duas a dez vezes, o que se observa nos pacientes acompanhados por medidas seriadas. Podem ser registrados grandes infiltrados pulmonares com escassez de sintomas, mas estes também podem ser acompanhados de sibilância, tosse produtiva, mialgia e febre alta. Nesse período, os pacientes são tratados com prednisona por tempo limitado e evoluem com queda dos níveis de IgE e desaparecimento dos sinais radiológicos podendo remitir e não apresentar novos infiltrados ou progredir para um estágio mais grave.

No quarto estágio os pacientes apresentam sintomatologia muito intensa e dependência de corticóides. A dosagem de IgE total pode estar normal nessa fase e a IgE e IgG específicas estão elevadas.

No quinto estágio ou estágio final, o paciente apresenta fibrose pulmonar, bronquiectasias centrais e doença obstrutiva irreversível. A maioria dos pacientes é reconhecida nesta fase

por alterações visíveis à Tomografia Computadorizada dos pulmões. (Greenberger et al., 1993). O seguimento de 17 casos de ABPA em estágio de fibrose com bronquiectasias e FEV1 igual ou menor do que 0,8 litro demonstrou prognóstico fechado apesar do tratamento prolongado com corticosteróides (Lee et al., 2001).

É importante ressaltar que os cinco estágios não representam obrigatoriamente fases evolutivas da doença e é quase impossível determinar pelo histórico, o tempo entre a sensibilização do indivíduo e a instalação de um padrão funcional mais grave (Greenberger, 2002).

Os métodos disponíveis comercialmente para o diagnóstico de ABPA são os extratos totais de *Aspergillus sp* para teste epicutâneo ou "prick-test" e para testes intradérmicos. Os testes epicutâneos são os mais usados para triagem dos casos suspeitos por serem pouco invasivos e por seu baixo custo (Dreborg et al., 1989). Alguns autores têm proposto testes cutâneos com proteínas bioquimicamente definidas como a mitogilina (Moser et al., 1993) para refinar o diagnóstico identificando grupos de

pacientes que apresentam formas mais brandas da ABPA que são mais difíceis de diagnosticar. Os testes de leitura imediata são positivos em pacientes em todas as fases da doença, sugerindo que todos apresentam asma alérgica ativa. Esse fato limita o uso do teste cutâneo de leitura imediata à triagem diagnóstica para ABPA.

Como ficou demonstrado em modelos experimentais, a exposição a alérgenos de fungos por via inalatória em animais com altos títulos de imunocomplexos circulantes induz a deposição desse material com desencadeamento da cascata inflamatória da qual participam substâncias vasoativas e complemento, reação classicamente descrita como fenômeno de Arthus (Geha, 1977; Steengaard, Johansen, 1980). Essa doença corresponde a uma vasculite leucocitoclástica com infiltrado inflamatório predominante de neutrófilos, aumento dos espaços intercelulares, edema e deposição de imunocomplexos no endotélio dos vasos com conseqüente obliteração de arteríolas pulmonares levando a necrose e formação de bronquiectasias (Cockrill, Hales, 1999).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a sensibilidade dos testes cutâneos de leitura semi-tardia empregando 3 frações antigênicas:  $\alpha$ -sarcina, restrictocina e mitogilina de *Aspergillus sp* no diagnóstico e no estadiamento da Aspergilose Broncopulmonar Alérgica.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

I. Determinar por testes cutâneos a sensibilidade aos análogos de

Asp f 1: mitogilina,  $\alpha$ -sarcina e restrictocina em:

Pacientes com diagnóstico de ABPA, pacientes com critérios sorológicos incompletos para ABPA que chamamos ABPA possível

e pacientes com asma sensibilizados ao *Aspergillus fumigatus* (estadiamento).

Um grupo-controle de indivíduos não atópicos, com diagnóstico de asma afastado e testes cutâneos e sorológicos para *Aspergillus fumigatus* negativos.

II. Investigar a presença de imunocomplexos na parede dos vasos de fragmentos de pele no local do infiltrado do teste intradérmico por imunofluorescência para caracterizar vasculite produzida por esses antígenos.

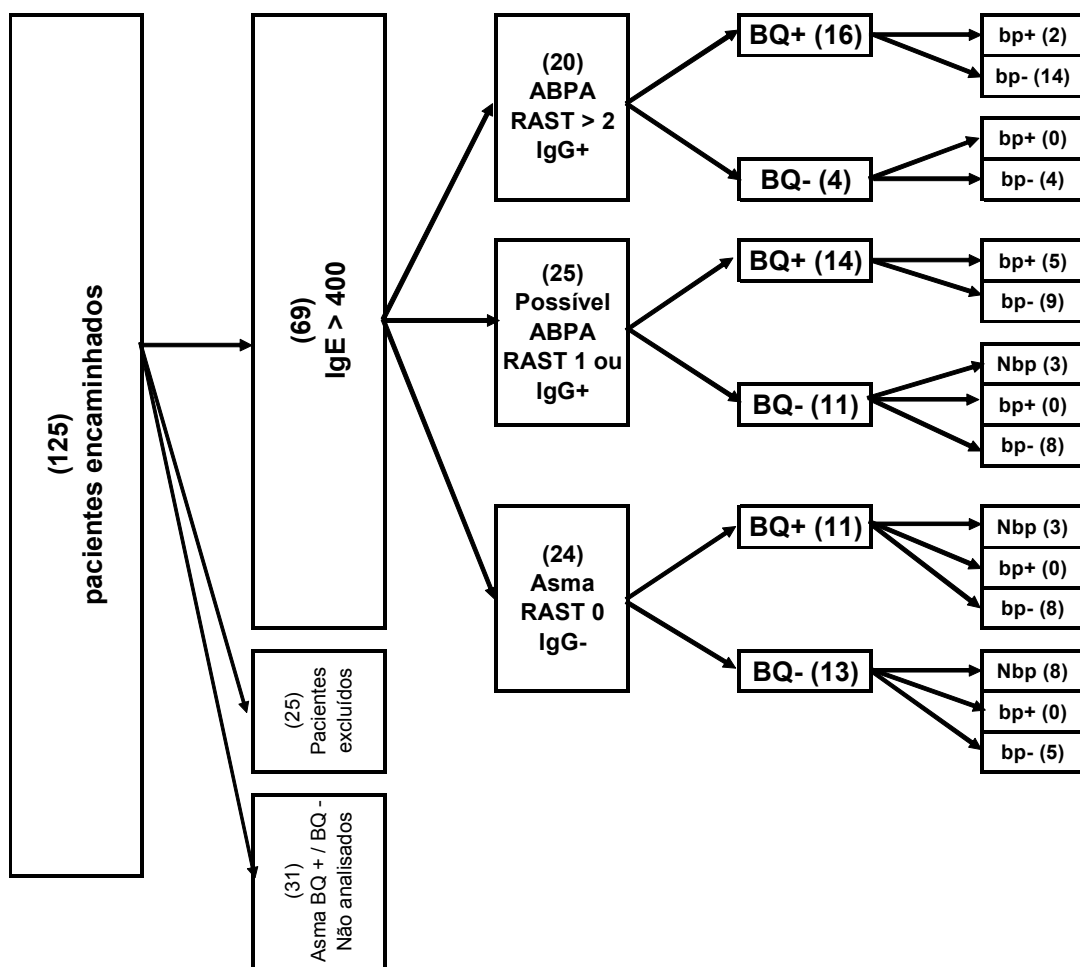
III. Verificar possível associação entre a presença de bronquiectasias pulmonares e vasculite cutânea induzida por depósito de imunocomplexos.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Análise prospectiva dos resultados dos testes cutâneos com leitura após 20 min (imediate) e 8 horas (tardia) da aplicação intradérmica dos antígenos ( $\alpha$ -sarcina, restrictocina e mitogilina) e das biópsias realizadas logo após a última leitura, quando houve reação cutânea tardia.

## FLUXOGRAMA DO EXPERIMENTO



**Legenda:** IgE - Imunoglobulina E, IgG+ - Imunoglobulina G positiva, IgG- - Imunoglobulina G negativa, BQ+ - bronquiectasia presente, ABPA - Aspergilose Broncopulmonar Alérgica, BQ- - bronquiectasia ausente, bp - biópsia, Nbp - não fez biópsia

Figura 4 - Fluxograma do experimento



### 3.2 DINÂMICA DO ESTUDO

Foram encaminhados para avaliação pacientes com asma provenientes dos Ambulatórios do Hospital das Clínicas das Disciplinas de Imunologia Clínica e Alergia e de Pneumologia da FMUSP. Para esses pacientes foram solicitados os seguintes exames complementares: protoparasitológico, hemograma e dosagem de imunoglobulinas.

Critérios de inclusão: pacientes deveriam ter confirmado o diagnóstico de asma e deveriam apresentar asma e IgE aumentada ou asma e bronquiectasias centrais. Ou seja foram selecionados pacientes com idade superior a 12 anos e asma de qualquer gravidade com suspeita de aspergilose broncopulmonar alérgica por apresentarem bronquiectasias ou IgE aumentada.

Critérios de exclusão: impossibilidade de suspender o uso antihistamínicos do tipo anti-receptor H1, cetotifeno e corticóides sistêmicos por quatro semanas, bloqueadores de mastócitos, antidepressivos tricíclicos, cimetidina, durante dez dias. Outras condições consideradas foram: gestação e dermatite

atópica. Nesse período, o contrôles das crises foi feito apenas com broncodilatadores e corticóides por via inalatória.

Na segunda consulta foram realizados testes percutâneos ou prick-tests para inalantes em duplicata, com a bateria do Ambulatório de Imunologia Clínica e Alergia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo.

Os pacientes que apresentaram prick negativo para o *Aspergillus fumigatus* foram submetidos a testes intradérmicos com os antígenos do laboratório Bayer e do laboratório Greer. Aqueles que apresentaram teste positivo a um dos antígenos descritos, fizeram tomografia e sorologia para *Aspergillus fumigatus*.

As espirometrias foram realizadas com provas farmacodinâmicas para confirmar o diagnóstico e caracterizar o grau de obstrução e a presença de reversibilidade. De acordo com a porcentagem de obstrução brônquica em relação ao predito, os pacientes foram classificados como portadores de obstrução leve, moderada ou grave.

Os pacientes que apresentaram diminuição da capacidade vital foram submetidos a prova funcional completa. Em alguns casos constatou-se distúrbio ventilatório misto.

### 3.3 CARACTERIZAÇÃO GERAL DA POPULAÇÃO ENCAMINHADA PARA INVESTIGAÇÃO DO DIAGNÓSTICO DE ASPERGILOSE BRONCOPULMONAR ALÉRGICA

Indivíduos acima de 12 anos de idade, de ambos os sexos, com diagnóstico de asma confirmado pelos critérios clínicos e espirométricos (Global Initiative for Asthma-Gina, 2006) e nível aumentado de IgE ou alterações à tomografia sugestivas de bronquiectasias foram submetidos à bateria padrão de testes epicutâneos. Os indivíduos com teste epicutâneo negativo foram submetidos a testes intradérmicos foram incluídos no estudo desde que um desses testes resultasse positivo.

Dos cento e vinte e cinco pacientes inicialmente encaminhados, sessenta e nove, com asma sensibilizados ao

*Aspergillus fumigatus* foram selecionados e classificados com base nos critérios internacionalmente aceites para ABPA.

### 3.4 CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS POR DIAGNÓSTICO QUE FORAM SUBMETIDOS AOS TESTES INTRADÉRMICOS COM OS ANTÍGENOS $\alpha$ -sarcina, mitogilina e restrictocina À BIÓPSIA

Os pacientes foram divididos em tres grupos, de acordo com os resultados das dosagens de IgE e IgG específicas para *Aspergillus fumigatus*.

Grupo 1 - ABPA: 20 Pacientes com asma e com os critérios para diagnóstico de ABPA: teste epicutaneo ou intradérmico positivo, com bronquiectasias centrais, todos com IgE total superior a 400ng/l e IgE específica positiva pelo teste fluoroenzimático CAP-System e IgG específica positiva (CAP- System) ou precipitinas. Destes pacientes, dezesseis apresentavam bronquiectasias centrais.

Grupo 2 - ABPA provável - 25 Pacientes com asma, com um ou mais testes sorológicos positivos para *Aspergillus fumigatus*, isto é, IgE específica ou IgG específica positiva para *Aspergillus fumigatus* pelo teste imunoenzimático ou pelos testes em precipitação em gel (contraimuno eletroforese e imunodifusão radial). Destes pacientes, 14 tinham bronquiectasias e 11 não apresentavam as lesões.

Grupo 3 - 24 Pacientes com asma, testes epicutâneos positivos para *aspergillus fumigatus* sendo 11 pacientes com bronquiectasias. 13 pacientes sem bronquiectasias.

O estudo ainda incluiu um quarto grupo que foi formado por dez indivíduos que não apresentavam asma, com IgE normal, testes cutâneos negativos, sem quadro clínico de bronquiectasias e radiografia de tórax normal.

Os pacientes dos 4 grupos foram submetidos aos testes intradérmicos com as três proteínas : mitogilina,  $\alpha$ -sarcina e restrictocina e aos controles positivo: histamina e negativo: diluente.

### 3.5 TESTES CUTÂNEOS PARA TRIAGEM

#### 3.5.1 Antígenos para testes epicutâneos utilizados na rotina de atendimento do Serviço de Imunologia Clínica e Alergia do Hospital das Clínicas

Bateria padrão: Fungos mix (*Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus amstelodami*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus terreus*); Gramíneas (Pólens III mix: Avena, Hordeum, Secale, Triticum e Polens IV mix: Dactylis, Festuca, Lolium, Phleum, Poá); Ácaros (*Dermatophagoides pteronissimus*, *Blomia tropicalis*); Epitélios (cão, gato); Insetos (*Blatella germânica* e *Periplaneta americana*); os controles: positivo: (dicloridrato de histamina 0,01 mg /mL para o teste epicutâneo e 0,001 mg/mL para o teste intradérmico); controle negativo (solvente dos extratos). ALK Allergenic Ltd.,USA. Os testes foram feitos em duplicata.

### 3.5.1.1 Critério de positividade para os testes de triagem

Testes epicutâneos positivos-o critério empregado estabeleceu a média do maior diâmetro e do diâmetro perpendicular a este maior ou igual a 3,0 x 3,0 mm.

### 3.5.1.2 Testes epicutâneos tempo de leitura

As leituras foram realizadas após 20 minutos e as pápulas foram demarcadas e transferidas para folha de papel branco, com fita transparente.

## 3.4.2 Antígenos para testes intradérmicos para triagem

### 3.4.2.1 Antígenos totais

Utilizamos antígenos comerciais dos laboratórios Bayer®\* e Greer®\*\* nas diluições 1:1000 e 1:2000 conforme padronização

anteriormente estabelecida. e com a finalidade de ampliar a sensibilidade aos testes cutâneos em pacientes eventualmente negativos ao antígeno da bateria padrão do Ambulatório de testes cutaneos do Serviço de Imunologia Clínica e Alergia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

\* Bayer AG51368,LEVERKUSEN, GE.

\*\* Greer Laboratories,INC. LENOIR,NC 28645 USA e

#### 3.4.2.2 Critério de positividade

O critério adotado para estabelecer a concentração ideal do antígeno a ser aplicada nos testes intradérmicos baseou-se no proposto por Norman em 1983 que estabelece que deve ser empregada a concentração capaz de produzir uma pápula de 7mm, baseada numa curva de concentração dos antígenos e diâmetro da pápula produzida (ponto médio).



### **3.5 TESTES INTRADÉRMICOS COM OS ANÁLOGOS DEASP F1: A-SARCINA, MITOGILINA E RESTRICTOCINA**

#### **3.5.1 Análise da concentração de endotoxinas nos extratos**

A análise da concentração de endotoxinas foi realizado pelo kit do limulus amebocyte laboratories,usa.

#### **3.5.2 Eletroforese em gel de ágar para caracterização da a-sarcina, mitogilina e restrictocina por Peso Molecular**

Os três antígenos e as proteínas utilizadas nos testes cutâneos foram submetidas a uma corrida eletroforética com em gel de ágar a 15%-pelo Sistema Promega. No Lab de Bioquímica do INCOR.

### **3.5.3 Titulação:determinação da concentração ideal de $\alpha$ -sarcina, mitogilina e restrictocina para testes intradérmicos**

Os antígenos:  $\alpha$ -sarcina, restrictocina e mitogilina foram diluídos nas seguintes concentrações:  $10^{-6}$  ,  $10^{-5}$  ,  $10^{-4}$  ,  $10^{-3}$  ,  $10^{-2}$  ,  $10^{-1}$  , 10 e  $100\mu\text{g/ mL}$ .

### **3.5.4 Testes intradérmicos - metodologia e tempo de leitura da reação imediata e da reação tardia dos antígenos $\alpha$ -sarcina, restrictocina e mitogilina**

Os antígenos foram aplicados na face ventral do braço após antissepsia com algodão embebido em álcool e foi injetado 0,05 ml na região intradérmica da pele com agulha de 0,3 mm de diâmetro por 13 mm de comprimento fazendo um ângulo de  $45^\circ$  .

As leituras foram feitas após 20 minutos e após 8 horas da aplicação intradérmica dos antígenos, as pápulas foram demarcadas e transferidas para o papel com fita transparente e

adesiva. As medidas das pápulas resultantes foram posteriormente analisadas.

### 3.6 ESPIROMETRIA

As espirometrias simples foram realizadas no laboratório de provas de função pulmonar do ambulatório de alergia do hospital das clínicas com aparelho koko 4.3 usb spirometer®\*.

Todos os pacientes foram submetidos a provas farmacodinâmicas com Salbutamol 400µg/dose, para determinar o grau de reversibilidade da obstrução.

Reversibilidade de 12% ou mais, foi considerada positiva (Global Initiative for Asthma-Gina, 2006).

As provas completas foram realizadas no Serviço de Pneumologia do Instituto do Coração com um Aparelho Collins GS e com o programa Collins II -USA.

A classificação da obstrução baseou-se nos critérios estabelecidos pelo National Institutes of Health, 2006 (APÊNDICES A, B e C).

Analisamos a presença de restrição considerando a Capacidade Vital (CV) e a Capacidade Vital Forçada (CVF), o Volume expiratório no 1º segundo (VEF1) e a razão: VEF1/CVF (índice de Tiffeneau). O VEF1 representou o volume expirado no primeiro segundo e foi observado na curva fluxo-volume. Os valores de VEF1 permitiram classificar a asma em : leve, moderada ou grave. \*pds FERRARIS- Louisville, USA.

Nos casos em que se registrou diminuição na Capacidade Vital Forçada, o paciente foi submetido a Prova de Função Pulmonar completa para que, determinada a Capacidade Pulmonar Total, fosse estabelecida ou não, investigando a presença de Distúrbio Ventilatório Restritivo ou Misto. (Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisologia, 1996).

### 3.7 TOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA DE ALTA RESOLUÇÃO

As tomografias computadorizadas de tórax de alta resolução (TCAR) foram feitas com cortes axiais de 2mm de espessura, reconstrução com algoritmo de alta resolução espacial e matriz 512 X 512.

As seguintes alterações foram consideradas importantes para para o diagnóstico da ABPA:

Alterações de Grandes Vias Aéreas e parênquima pulmonar:

Espessamento de paredes brônquicas, bronquiectasias e impactação mucóide, enfisema, atelectasia, áreas de consolidação e nódulos.

Alterações de Pequenas Vias Aéreas e parênquima pulmonar:

Perfusão em mosaico, aprisionamento de ar, dilatação bronquiolar e nódulos centro-lobulares.

### 3.8 TESTES SOROLÓGICOS:

#### 3.8.1 Teste imunofluorescência : Fluoroenzymeimmunoassay UNICAP® IgE - m3

##### 3.8.1.1 Materiais empregados

- Kit Uni CAP Total IgE Fluoroenzymeimmunoassay (Unicap 100) Phadia
- Uni CAP development Kit
- Cilindros com o antígeno de *Aspergillus fumigatus* (m3) dividido em 16 amostras.
- Anti IgE total - 2 frascos utilizados para a curva de calibração; cada frasco contem 0,2 ml

- Anti IgE conjugada a galactosidase distribuida em frascos de 5,1 ml.
- Solução de lavagem á base de KATHON CG também foi utilizada.
- Solução de fluorocromo.
- Solução de inibição : solução de bicarbonato de sódio a 4%.  
Frascos de 62 ml
- Alíquotas de 40  $\mu$ l de soro dos pacientes, pipetadas automaticamente a partir de amostras acondicionadas em frascos de silicone.

### 3.8.1.2 Princípio geral do teste

O teste consiste no emprego de anti-IgE monoclonal de coelho, conjugando-a a  $\alpha$ - galactosidase acoplada a uma base sólida, nesse caso uma base sólida tridimensional denominada

imunocap que, ao entrar em contato com soro humano, liga-se a IgE circulante através de uma ligação covalente de alta afinidade.

O complexo formado pela IgE humana e a anti-IgE é medida pela fluorescência desenvolvida no complexo durante a incubação e é proporcional à quantidade de IgE aderida. Após um período de incubação o excedente de IgE não ligada é lavada.

Os resultados variam de 0,35 a 100 kUA/L e o limite inferior é de 0,02 kUA/L.

### **3.8.2 Teste imunofluorescência: Fluoroenzymimmunoassay UNICAP® IgG - Gm3**

#### **3.8.2.1 Materiais para a medida de IgG específica para *Aspergillus fumigatus***

Kit Uni CAP Total IgE Fluoroenzymimmunoassay (Unicap 100) Phadia & Upjohn



- Cilindros com o antígeno de *Aspergillus fumigatus* (Gm3) dividido em 16 amostras.
- Calibrador com 16 imunocaps IgG
- Anti IgG total - 2 frascos utilizados para a curva de calibração; cada frasco contem 0,2 ml
- Anti IgG conjugada a galactosidase distribuida em frascos de 2,8 ml
- Solução diluente com KATHON CG a 0,15% 10 ml
- Solução de fluorocromo
- Antígeno Immunocap - séries de 16
- Kit de desenvolvimento com Solução de desenvolvimento (4-metilumbeliferil  $\beta$ -D-galactosidase 0,01%) Kathon CG 0,055-6,0 ml
- Solução de inibição : solução de bicarbonato de sódio a 4%.  
Frascos de 65 ml.

- Alíquotas de 40  $\mu$ l de soro dos pacientes, pipetadas automaticamente a partir de amostras acondicionadas em frascos de silicone.

### 3.8.2.2 Metodologia

O antígeno de interesse acoplado covalentemente ao imunocap, reage com a IgG específica presente no soro do paciente. Após a lavagem da IgG não ligada, adicionam-se anticorpos contra a IgG marcados enzimaticamente para a formação de complexos. Após um período de incubação, a anti-IgG marcada com enzima não ligada é lavada, procedendo-se à incubação do complexo ligado com o substrato.

Terminada a reação, mede-se a fluorescência do eluído. Quanto maior o valor da medição, maior a quantidade de IgG específica na amostra. Os resultados são dados em  $MGA/L$ , onde  $A$  representa os anticorpos antígeno-específicos. A dosagem varia

de 2 a 200 MGA/L. São considerados níveis normais valores de 10 a 50 MGA/L.

### 3.8.3 Reações de precipitação

A pesquisa de IgG específica foi realizada por 3 métodos ; contraimunoeletroforese e imunodifusão radial no Instituto de Medicina Tropical e no laboratório do Prof. Dr. Alfeu Tavares de França - Universidade Federal do Rio de Janeiro. A técnica utilizada foi a de difusão em gel de agar (Ouchterlony, 1958) modificada por Longbottom e Pepys.

O princípio do teste consiste na relação entre a quantidade de antígeno, isto é da imunoglobulina a ser dosada e o anticorpo que é a antiimunoglobulina a ser quantificada incorporado a uma placa de gel de ágar.

As diferenças consistiram em variações dos antígenos empregados e na concentração do soro humano. Consideramos positivo o paciente que apresentou pelo menos um teste positivo.

### 3.9 BIÓPSIA DE PELE PARA PESQUISA DE IMUNOCOMPLEXOS

As biópsias de pele foram realizadas no local da endureção produzida pela injeção intradérmica da Mitogilina.

O procedimento realizado obedeceu as normas do Ambulatório de Imunopatologia Clínica e Alergia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo.

Após antissepsia da face anterior do antebraço esquerdo o local foi infiltrado com lidocaina para anestesia e foi realizada a biópsia da pápula com "punch" de 4mm de diâmetro 8 horas após a aplicação do antígeno. Os fragmentos de pele foram encaminhados em solução de transporte para imunofluorescência e em solução de formol a 3% para o Laboratório de imunofluorescência do Serviço de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo onde foi realizada pesquisa de imunocomplexos e histopatologia.

A pesquisa de imunocomplexos foi realizada com Anticorpos monoclonais: ant-IgG, anti-IgA, anti-IgM e anti-C3 Sigma®.

### 3.9.1 Técnica de Imunofluorescência direta

A amostra obtida do paciente foi armazenada com crioprotetor ("Tissue Tec" a base de: tampão citrato 1 Molar; sulfato de magnésio 0,1 Molar; N-ethylmaleimida 0,1%; H<sub>2</sub>O destilada; sulfato de amônia e hidróxido de potássio ) em freezer -20°C.

Em criostato a -20°C o fragmento de pele foi cortado a 4µ e colocado em lâmina siliconizada (3 cortes por lâmina). Para a reação, os cortes receberam o conjugado (anti-imunoglobulina humana que foi produzida em animal imunizado e foi associada a um fluorocromo) diluído em Azul de Evans. Os conjugados utilizados foram: anti-IgG , anti-IgA, anti-IgM e anti-C3c adquiridos comercialmente (Sigma Aldrich®).

Os cortes permaneceram com o conjugado por 30 minutos, em câmara úmida sob temperatura ambiente para ligação ao imunocomplexo.

A seguir as lâminas foram lavadas em TBS por 2 períodos de 10 minutos cada. Para a montagem das lâminas, utilizou-se glicerina tamponada (pH 8,5) e lamínula de vidro.

A leitura foi realizada em microscópio de fluorescência HBO 50w (filtro CB12) marca Carl Zeiss, com oculares de 10x e objetivas de 16x e 40x.

O resultado foi dado em padrão e localização da fluorescência.

### 3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis classificatórias foram descritivamente apresentadas em tabelas de contingência contendo frequências absolutas (n) e relativas (%). As associações entre elas foram avaliadas com o teste da razão de verossimilhança ou teste exato de Fisher.

As variáveis quantitativas foram apresentadas descritivamente em tabelas contendo média, desvio padrão,

mediana, valores mínimos e máximos. As distribuições das variáveis foram avaliadas com o teste de Kruskal-Wallis e complementadas com o teste de Dunn.

Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes (Rosner, 1994).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO ESTUDADA PELA ANÁLISE DOS RESULTADOS DOS EXAMES REALIZADOS

Pacientes com diagnóstico presumido de asma e suspeitos de apresentarem ABPA pela presença de IgE sérica aumentada ou asma e presença de bronquiectasias à Tomografia Computadorizada convencional foram encaminhados ao Serviço de Imunologia Clínica e Alergia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Dos pacientes encaminhados, cento e vinte e cinco pacientes foram submetidos a testes cutâneos e tiveram resultado positivo para *Aspergillus fumigatus* pela bateria de testes do Serviço de Imunologia Clínica e Alergia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo ou aos antígenos Bayer e Greer por testes intradérmicos positivos.



Para atender os objetivos do estudo 69 pacientes foram classificados em 4 grupos, obedecendo os critérios para diagnóstico de ABPA.

Grupo 1 ou Grupo ABPA: Teste epicutâneo ou intradérmico positivo para pelo menos um dos antígenos ALK, Bayer ou Greer de *Aspergillus fumigatus*, a dosagem de IgE total acima de 400 ng/L, IgE específica por método imunoenzimático Classe 2 ou maior (APÊNDICES) e IgG positiva por "RAST", por pelo menos um teste de imunodifusão radial em gel ou contraímunoeletroforese. Nesse grupo encontramos bronquiectasias centrais em 16 pacientes e ausência de bronquiectasias em 4 pacientes.

Grupo 2 ou Grupo ABPA-possível com os critérios essenciais considerando IgE Classe 1 ou pelo menos uma sorologia para IgG positiva: 14 com bronquiectasias e 11 sem as alterações pulmonares.

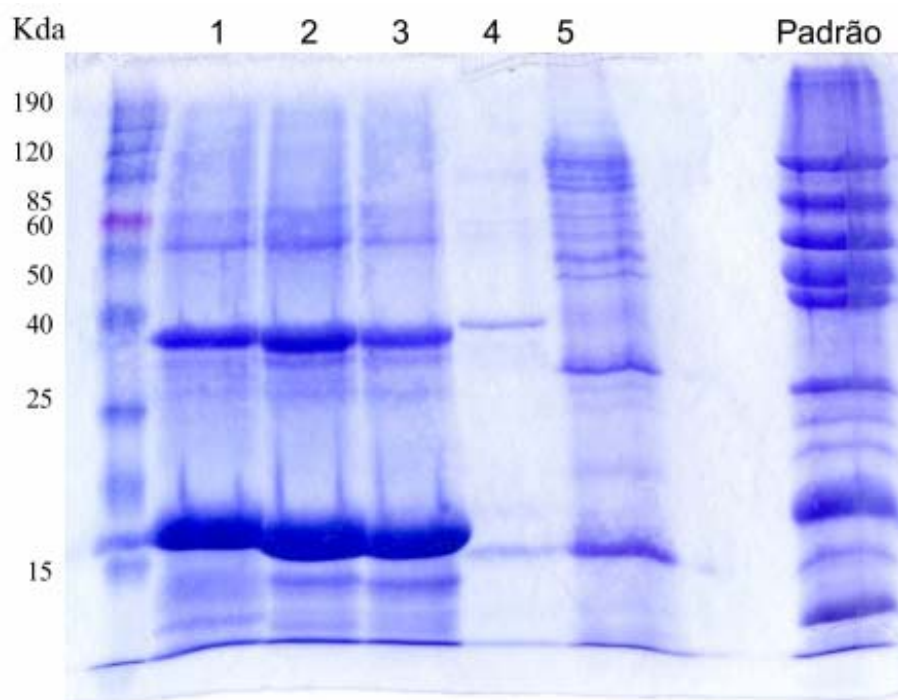
Grupo 3 ou Grupo ASMA :24 pessoas com diagnóstico de ABPA excluído, isto é com sorologia negativa para a doença. Nesse

grupo estão 11 pacientes com bronquiectasias e 13 sem bronquiectasias.

Grupo 4:10 pessoas sem asma, sem atopia, IgE normal e teste cutâneo negativo.

#### 4.2 DOSAGEM DE ENDOTOXINAS NOS EXTRATOS UTILIZADOS

A concentração de endotoxinas encontrada nos antígenos  $\alpha$ -sarcina, mitogilina e restrictocina estava dentro dos limites de tolerância e os extratos foram liberados para testes clínicos e laboratoriais.



Raia : 1-100mcg  $\alpha$ -sarcina; 2-100mcg mitogilina; 3-100mcg restrictocina;

4-Extrato de massa miceliana; 5- Extrato de caldo de cultura 7- Padrão de Pmolecular

Figura - Determinação dos Pesos moleculares das proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 15%

A análise dos antígenos, gentilmente cedidos pela Prof Dra Luiza Karla Arruda (FMRP-USP), permitiu confirmar a presença das proteínas com peso molecular aproximado de 18 kDa.

#### 4.4 TESTES CUTÂNEOS COM OS ANTÍGENOS A-SARCINA, MITOGILINA E RESTRICTOCINA

##### 4.4.1 Titulação dos antígenos $\alpha$ -sarcina, mitogilina e restrictocina: para testes cutâneos intradérmicos

Os resultados considerados correspondem à média das medidas obtidas do maior diâmetro e o diâmetro perpendicular ao mesmo, levando em conta as pápulas produzidas pelos antígenos na concentração de 10 $\mu$ g/ mL segundo o critério de Norman para determinação do ponto de corte como sendo a concentração que produz uma pápula de 5 a 10mm quando injetada na região intradérmica.

Determinação da concentração ideal para o teste intradérmico com os antígenos.

Os testes cutâneos realizados com as concentrações:10<sup>-6</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-1</sup>, 1, 10 e 100  $\mu$ g/ml dos antígenos permitiram estabelecer que: as concentrações  $\leq$ 1 $\mu$ g/ml produziram pápulas menores que 3mm após 20 minutos e 7 mm após 8 horas em todos os grupos estudados.

#### **4.4.2 Reações imediatas**

As reações imediatas produziram reações positivas em pacientes de todos os grupos e em nenhum paciente do grupo controle.

A análise das médias das medidas indica diferença significativa entre os grupos 1 (ABPA) e 2 (ABPA possível) e entre 1 e 3 (Asma sem ABPA), mas não significativa entre os grupos 2 e 3.

As medidas obtidas com a titulação podem ser observadas nas tabelas anexadas.

#### **4.4.3 Reações tardias**

De um modo geral a leitura das reações tardias forneceu medidas que variaram conforme o análogo de Asp f 1 empregado e as concentrações utilizadas.

As reações produzidas pela concentração de 100 mcg/ml foram muito intensas e algumas vezes confluentes.

A reação imediata ou de 20 minutos produzida pelo antígeno passou por um período de remissão e após 6 a 8 horas houve aparecimento de uma reação com reação inflamatória intensa.

A análise estatística das medidas das reações produzidas teve como finalidade avaliar as variações e estabelecer qual das proteínas teria maior utilidade para testes cutâneos.

As medidas das reações produzidas pelas proteínas  $\alpha$ -sarcina, mitogilina e restrictocina na concentração de 10 mcg/ml estiveram dentro dos padrões preconizados e ficou determinado que essa seria a concentração ideal para testes intradérmicos. Os resultados considerados correspondem às médias obtidas pela medida do maior diâmetro e do diâmetro perpendicular ao mesmo, levando em conta as pápulas produzidas pelos antígenos na concentração de 10 $\mu$ g/mL segundo o critério de Norman. Segundo o autor, o ponto de corte é a concentração do antígeno que produz uma pápula de 5 a 10mm quando injetada na região intradérmica.

#### 4.4.3.1 Leitura semi-tardia da reação tardia produzida pela $\alpha$ -sarcina

Da análise comparativa das respostas ao teste tardio da  $\alpha$ -sarcina nas concentrações de 100 mcg/ml, 10 mcg/ml e 1 mcg/ml é possível concluir que o antígeno diluído a 10 MCG/ML Não estabeleceu diferença significativa entre o grupo 1 e o grupo 2, nem entre os grupos 2 e 3 mas diferenciou os grupos 1 e 3.

	Alfasarcina 8h (100mcg/ml)			Alfasarcina 8h (10mcg/ml)			Alfasarcina 8h (1mcg/ml)		
	GRUPO			GRUPO			GRUPO		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
n	20	25	24	20	25	24	20	25	24
Média	19,48	14,54	12,81	12,43	10,06	7,79	5,45	6,76	4,19
Desvio padrão	7,07	3,15	4,20	3,66	3,37	1,93	2,16	4,50	1,45
Mediana	16	15	13	13	12	8	6	6	4
Mínimo	11	9	3	7	5	5	0	1	2
Máximo	31	21	29	18	16	14	8	25	7
p (Kruskal-Wallis)	<0,001			<0,001			0,005		
Teste de Dunn									
1x2	>0,05			>0,05			>0,05		
1x3	<0,05			<0,05			<0,05		
2x3	>0,05			>0,05			<0,05		

Tabela Análise das medidas das reações produzidas pela  $\alpha$ -sarcina

No gráfico de barras estão representadas as medidas das púpulas obtidas pelo antígeno nas três concentrações e sua distribuição nos três grupos estudados. A concentração de 100

mcg/ mL produziu uma variação mais ampla de medidas com a maior média de medidas (19,48 mm) registrada para o grupo 1.

As concentrações de 100 e de 10 mcg/mL apresentaram médias decrescentes em todos os grupos. Foram encontradas menores variações de medidas com a aplicação do antígeno na concentração de 1 mg/mL.

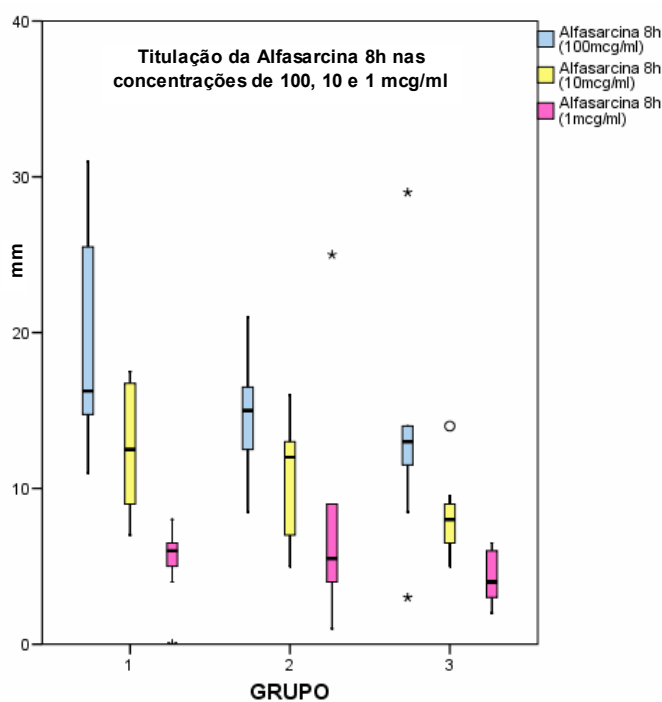


Figura . Titulação da  $\alpha$ -sarcina - leitura da reação tardia (8h)



#### 4.4.3.2 Leitura semi-tardia da reação tardia produzida pela mitogilina

A análise das medidas das reações tardias produzidas pela mitogilina mostrou que o antígeno aplicado nas concentrações de 100, 10 e 1mcg/ml produziram reações cujas medidas diferenciaram o grupo 1 do grupo 3, mas não estabeleceram diferença entre os grupos 1 e 2 e entre os grupos 2 e 3 pelo teste de dunn (Tabela ).

	Mitogilina 8h (100mcg/ml)			Mitogilina 8h (10mcg/ml)			Mitogilina 8h (1mcg/ml)		
	GRUPO			GRUPO			GRUPO		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
n	20	25	24	20	25	24	20	25	24
Média	14,51	15,62	12,42	13,13	10,86	7,19	7,52	7,02	4,31
Desvio padrão	5,16	4,03	3,72	3,04	3,51	2,07	3,50	2,98	1,37
Mediana	15	16	13	13	12	7	7	8	4
Mínimo	7	9	3	9	5	4	3	1	2
Máximo	22	28	27	17	19	11	14	11	7
p (Kruskal-Wallis)	0,003			<0,001			0,005		
Teste de Dunn									
1x2	>0,05			>0,05			>0,05		
1x3	<0,05			<0,05			<0,05		
2x3	<0,05			>0,05			<0,05		

Tabela Análise das medidas das reações produzidas pela mitogilina

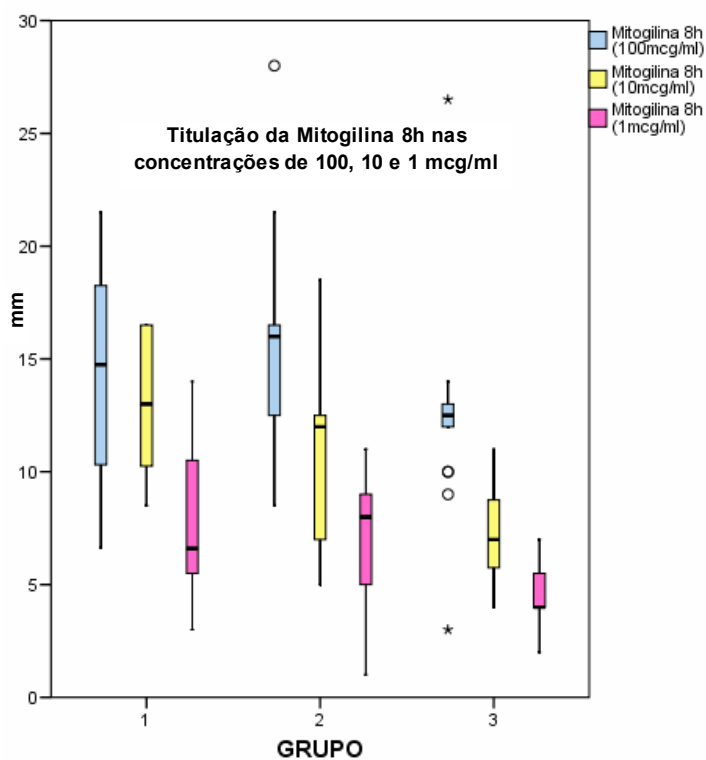


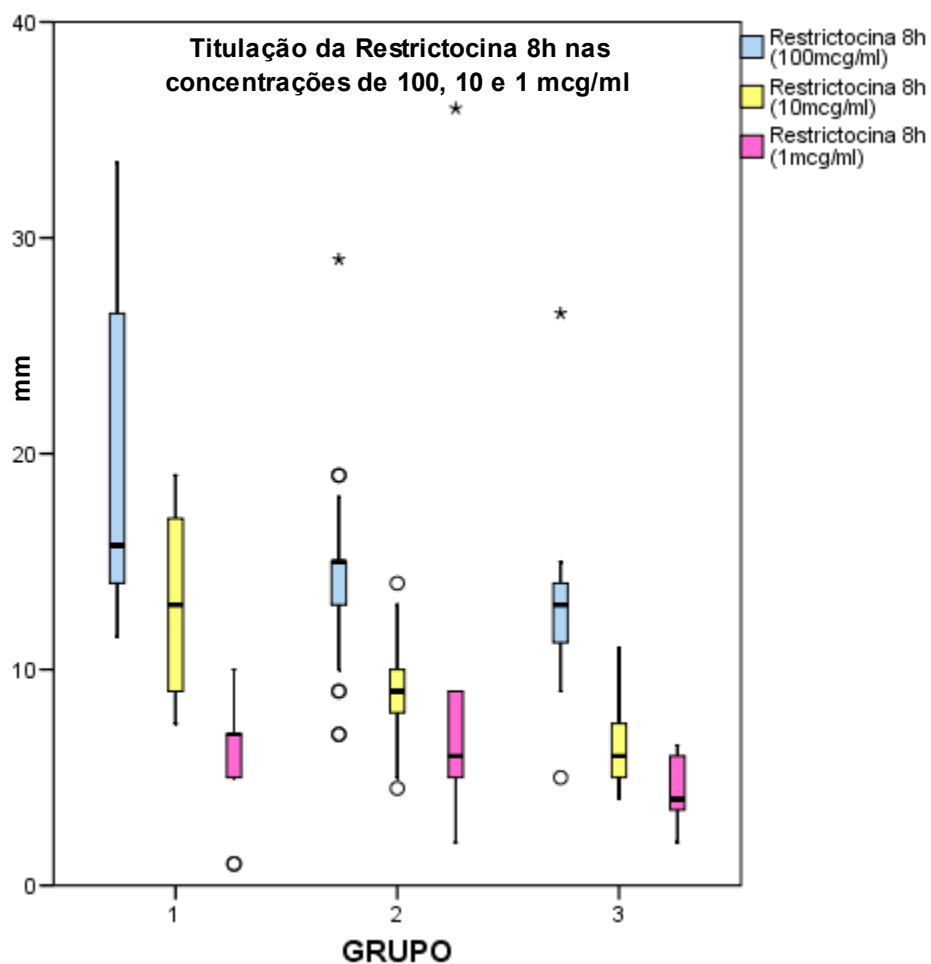
Figura . Titulação da mitogilina – leitura da reação tardia (8h)

#### 4.4.3.3 Leitura semi-tardia da reação tardia produzida pela restrictocina

A análise das medidas das reações tardias produzidas pela mitogilina indica que o antígeno aplicado nas concentrações de 100, 10 e 1mcg/ml produziram reações cujas medidas diferenciaram o grupo 1 do grupo 3, mas não estabeleceram

diferença entre os grupos 1 e 2 e entre os grupos 2 e 3 pelo teste de Dunn (Tabela 2 ).

Tabela Análise das medidas das reações produzidas pela restrictocina



#### 4.4.3.4 Determinação da sensibilidade da mitogilina na concentração de 10mcg/mL

As medidas das reações cutâneas produzidas pela mitogilina permitiu encontrar 20 testes positivos no grupo 1(100%) 22 no grupo 2(88%) e 13 (54%), sendo que nenhum indivíduo do grupo controle, de indivíduos sem asma apresentaram reação positiva.

Entre os pacientes do grupo controle, isto é, 10 indivíduos testados, não houve reações tardias.

Mitogilina 8h (10mcg/m)	GRUPO						Total	p	
	1	2	3	4	5	6			
<7	0	0,00%	3	12,00%	11	45,83%	15	21,74%	0,001 Teste qui-quadrado
≥7	20	100,00%	22	88,00%	13	54,17%	55	79,71%	
Total	20	100,00%	25	100,00%	24	100,00%	69	100,00%	

Tabela. Determinação da sensibilidade da mitogilina na concentração de 10mcg/mL nos grupos estudados

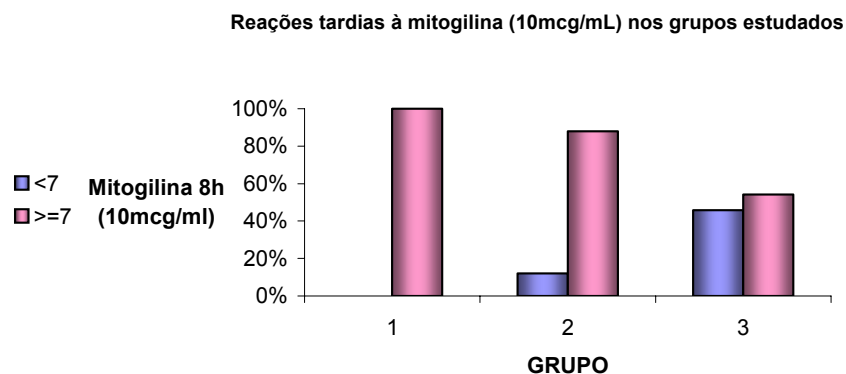


Figura - Análise das reações tardias à mitogilina nos grupos estudados

#### 4.4.4 Resultados da análise do material obtido por biópsias de pele

As biópsias foram realizadas no local da endureção produzida pela mitogilina oito horas após a aplicação do antígeno.

As biópsias resultaram positivas em 2 pacientes do grupo 1 e em 5 pacientes do grupo 2. Todos os indivíduos que apresentaram reação tardia foram biopsiados totalizando 55 biópsias.

No grupo 4, os 10 pacientes testados não apresentaram reação tardia positiva, portanto não foram submetidos ao procedimento.

#### 4.5 ANÁLISE DAS MEDIDAS DE IgE TOTAL

Analisando as médias das medidas de IgE total nos tres grupos analisados houve tendencia para medidas maiores nos pacientes do primeiro grupo e os valores foram decrescentes considerando as medidas do segundo e terceiro grupos, mas essa diferença não foi estatisticamente significativa ( $p=0,68$ ).

Tabela 2 - Distribuição de valores da IgE total nos grupos  
Grupo 1 - ABPA, Grupo 2 - ABPA possível, Grupo  
3 - Asma não ABPA

IgE t	GRUPO		
	1	2	3
n	20	25	24
Média	3678	2510	1705
Desvio padrão	3167	2391	1351
Mediana	2215	1270	1335
Mínimo	531	416	506
Máximo	11352	8688	6450

$p= 0,068$  (Kruskal-Wallis)

Legenda : IgE t – IgE total, Grupo 1 – ABPA, Grupo 2 – ABPA possível,  
Grupo 3 – Asma não ABPA

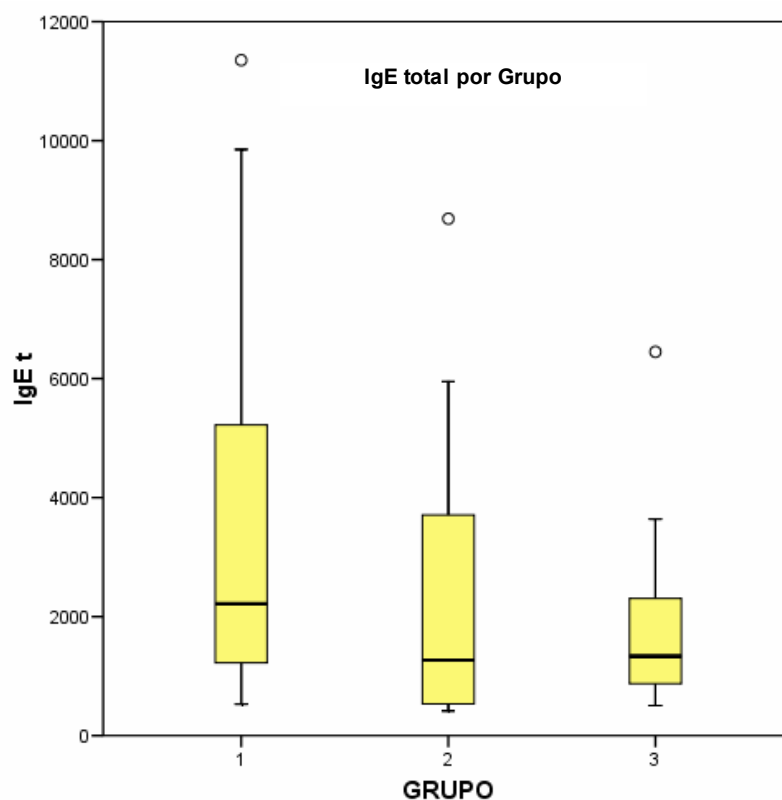


Figura - Medidas de IgE total (ng/L) por grupo avaliado

#### 4.6 ANÁLISE DO VOLUME EXPIRADO NO 1º SEGUNDO (FEV1%) NOS GRUPOS ESTUDADOS

FEV1 %	GRUPO		
	1	2	3
n	20	25	24
Média	56,65	62,40	56,08
Desvio padrão	19,62	21,08	26,78
Mediana	54,00	66,00	54,50
Mínimo	30,00	25,00	13,00
Máximo	97,00	101,00	133,00

$p=$  0,378 (Kruskal-Wallis)

Tabela - Análise estatística das variáveis para medidas de FEV1 nos grupos estudados

O teste de verossimilhança, aplicado aos 3 grupos de pacientes levando em conta as variáveis FEV1(%) - volume de ar expirado no primeiro segundo durante a manobra de expiração forçada permitiu verificar que não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p=0,378$ ).

Embora a média dos valores do grupo 1 tenha sido mais baixa comparativamente ao grupo 2, essa diferença não foi significativa. O grupo 3 apresentou média de medidas mais baixa que a do grupo 1 e que a do grupo 2.



## 5 DISCUSSÃO

A grande dificuldade para diagnosticar a Aspergilose Broncopulmonar Alérgica tem várias justificativas.

Em primeiro lugar a apresentação da doença é muito variada e apesar de terem-se estabelecido critérios aceitos internacionalmente, encontram-se poucos pacientes que os apresentam de forma completa no momento da observação clínica. Uma das explicações é o grande leque de manifestações da doença traduzidas por períodos de remissão e de exacerbação.

Os critérios internacionais baseiam-se no aumento de eosinófilos circulantes mas em nosso estudo não encontramos essa alteração. Talvez a pesquisa de eosinófilos no escarro que segundo alguns autores foi capaz de diferenciar pacientes com e sem bronquiectasias (Wark et al., 1991) venha contribuir para o diagnóstico da doença em nossa população.

O uso de drogas que inibem a produção de IgE pelos linfócitos e de eosinófilos como os corticóides de uso sistêmico, amplamente empregados para o controle da asma e principal ferramenta no tratamento da ABPA podem diminuir ou normalizar essas medidas; o mesmo se aplica aos anti-histamínicos usados no tratamento das outras alergias presentes e aos antihistamínicos bloqueadores de receptores H2 como é o caso da cimetidina e da ranitidina freqüentemente empregadas no controle da gastrite e do refluxo gastroesofágico condições comumente associadas à asma nos pacientes estudados. Esses últimos medicamentos interferem nos testes cutâneos.

Outro fator importante é a dependência de testes sorológicos para o diagnóstico da doença, pouco disponíveis e de alto custo. No Brasil dispomos de poucos testes padronizados para pesquisa de IgE e IgG específicas contra o *Aspergillus fumigatus*.

Um deles, o teste fluoroenzimático Unicap é derivado do "radio alergosorbent test" ou "RAST" e foi desenvolvido por Wide

em 1967. Além de ser um teste prático, pois requer pequena quantidade de soro e poder ser realizado em poucas horas, emprega materiais que não expõe quem os realiza a riscos.

Neste trabalho, confirmamos que pacientes selecionados por níveis mais altos de IgE específica pelo "RAST" selecionaram indivíduos com lesões pulmonares mais freqüentes. Entretanto esse critério não foi tão sensível quanto o teste cutâneo de leitura semi-tardia para os antígenos empregados.

A pesquisa de precipitinas em gel de ágar foi feita utilizando antígenos comerciais e domésticos e teste fluoroenzimático ou Unicap para pesquisa de IgG para *Aspergillus fumigatus*. Todos os testes apresentaram sensibilidade muito baixa, embora o grupo mais grave tenha apresentado pelo menos um dos critérios positivo.

Os testes cutâneos apresentaram sensibilidade mais alta que os testes sorológicos, talvez pela diferença entre os extratos de fungos alergênicos empregados, obtidos de cepas diferentes e

cultivo em meios de diversos. Como sabemos, com a obtenção de frações alergênicas em concentrações diferentes o que justifica a importância da padronização dos meios de obtenção de extratos alergênicos (Latgé, 1995).

A presença de reações cruzadas entre diferentes gêneros de fungos que compartilham as frações alergênicas resultando em testes cutâneos falso positivos é um fato a ser considerado.

Excluir o diagnóstico de ABPA em pacientes com asma persistente e IgE aumentada, sensibilizados ao *Aspergillus fumigatus* também foi muito difícil, pois encontramos pacientes que não preencheram todos os critérios, mas que não apresentavam outra explicação para apresentarem altos níveis de IgE como verminoses e dermatite atópica com alterações pulmonares sem antecedentes de infecções respiratórias virais como o sarampo e micobacterioses ou doenças reumáticas.

Para esses pacientes não houve um diagnóstico estabelecido, o que confirma os achados de outros autores

(Phelan, Kerr, 1984). A grave consequência disso é descartar definitivamente a possibilidade de tratamento específico, caso sejam interpretados como ABPA - negativos.

Neste estudo foram encontrados quatro pacientes denominados ABPA-soropositivos ou ABPA-SP (Patterson et al., 2000), isto é, com critérios sorológicos positivos para *Aspergillus fumigatus*, no nosso caso com "RAST"Unicap IgE<sub>2</sub>, mas sem bronquiectasias.

O Unicap para IgE foi superior a 3,5 kUA/L em apenas 30% dos indivíduos submetidos ao teste acima, o que revela uma sensibilidade baixa considerando uma população de sensibilizados ao fungo.

Dados da literatura confirmam a discrepância encontrada no trabalho atual entre a sensibilidade dos testes cutâneos e do teste fluoroenzimático. Essa diferença foi registrada para outros antígenos domésticos com grande variabilidade (Chinoy et al., 2005).

A média das dosagens de IgG específica pelo teste fluoroenzimático esteve abaixo de 22% sendo que se considera teste positivo quando o resultado atinge níveis de 50kUA/L. Apenas 4 pacientes da população estudada apresentaram valores acima de 40kUA/L.

Alguns pacientes podem ser portadores de penicilioses e as curvularioses (Halwig et al., 1985) ou podem ser alérgicos a cepas de *Aspergillus fumigatus* diferentes das usadas para os testes.

Extratos de mesmas cepas cultivadas em meios diferentes ou ainda, mesmas cepas, meios bioquimicamente definidos mas com fenótipos diversos podem produzir diferentes padrões de antígenos (Thurston et al., 1973; Wallenbeck et al., 1984).

Os pacientes submetidos aos testes cutâneos com os análogos de Asp f 1 apresentaram resultados positivos tanto na leitura imediata como na tardia.

Nas respostas de leitura imediata não foi possível estabelecer diferença significativa entre os grupos. Quanto às medidas das respostas tardias, o cálculo das médias para cada grupo indicou diferença entre os grupos quando testados com cada uma das proteínas e foi possível verificar respostas mais intensas produzidas pelo teste à mitogilina do que à  $\alpha$ -sarcina e à restrictocina, embora as diferenças não tenham sido estatisticamente significativas.

Pacientes com ABPA diagnosticada apresentaram média de resultados mais elevada. Alguns pacientes contribuíram muito para essa diferença, o que ficou demonstrado pela grande variabilidade representada pelo desvio padrão o que confirma o perfil de variabilidade da ABPA.

Testes cutâneos com extratos de fungos em geral, são úteis no diagnóstico pacientes com asma sensibilizados a esses antígenos (Bousquet, Michel, 1993). Nossos achados mostraram que os antígenos análogos produziram reações imediatas e tardias e que estas puderam diferenciar o grupo ABPA do grupo provável

do grupo asma sensibilizado. Segundo dados da literatura a precisão do diagnóstico aumenta quando são aplicadas outras frações antigênicas de *Aspegillus fumigatus* como Asp f 2, Asp f 4, Asp f 6 e com o uso de extratos de outros fungos, pois como pudemos verificar o termo Aspergilose Broncopulmonar Alérgica representa um painel de doenças pulmonares de hipersensibilidade a várias frações antigênicas de *Aspergillus sp* cuja caracterização não foi atingida com este trabalho.

A biópsia de pele foi positiva, com depósito de imunocomplexos na parede dos vasos da derme em dois pacientes do grupo 1, foi positiva em cinco pacientes do grupo 2 e negativa em todos os pacientes do grupo 3. A ausência de reações nos pacientes no grupo ABPA e presença no grupo de prováveis doentes nos faz admitir a hipótese de uma forma ativa e outra estável da doença em relação à reação tipo III, considerando as limitações do tamanho das amostras.

Considerando o grupo ABPA-possível como um estágio evolutivo anterior ao do grupo ABPA, seria esperado o encontro



de um número maior de casos de biópsias positivas por deposição de imunocomplexos no grupo mais grave. Não foi o que encontramos, talvez porque nesse grupo um número maior de pacientes estivesse usando corticóides que deprimiriam a resposta inflamatória.

Pacientes de todos os grupos apresentaram reações tardias. Entretanto, essas reações foram mais freqüentes em pacientes com bronquiectasias.

Existe a possibilidade de que essas reações tardias representem uma fase tardia da reação imediata, mediada por IgE e que ocorre em resposta a estímulos antigênicos específicos (Dolovich et al., 1973). A fase tardia da reação imediata caracteriza-se por uma reação inflamatória mais branda, com infiltrado de eosinófilos e neutrófilos e de resolução completa (Demoly et al., 1998).

Em nossa casuística, a exemplo do que relataram outros autores, a tomografia computadorizada de alta resolução foi útil

na caracterização de lesões em grandes e pequenas vias aéreas e confirmou ser um bom método para o diagnóstico da Aspergilose Broncopulmonar Alérgica nas formas mais graves.

O achado de outras lesões como impactação mucóide e imagens nodulares que precedem as bronquiectasias são importantes para diagnosticar as fases mais precoces da doença. No nosso estudo essas lesões estiveram presentes em torno de 20% em se tratando da impactação mucóide e em 20% com referência a nódulos. Não houve diferenças significantes entre os grupos em relação a essas lesões.

O conhecimento mais aprofundado da fisiopatogenia da asma tem indicado fatores distintos determinantes da inflamação e do remodelamento e embora muitos registros indiquem que a resposta inflamatória a fungos em geral seja discreta se comparada à de outros antígenos, o *Aspergillus fumigatus* em particular, provoca reação inflamatória intensa, danifica os tecidos do hospedeiro e é responsável pelo processo

de remodelamento com formação de bronquiectasias (Kauffmann, 2003).

Na Aspergilose Broncopulmonar Alérgica é possível que anticorpos presentes na superfície dos mastócitos da pele se liguem ao antígeno introduzido na pele formando imunocomplexos aos quais se liga complemento e outras substâncias vasoativas e moléculas de adesão que aderem ao endotélio vascular (Leung et al., 1991; Kyan-Aung et al., 1991) provocando uma vasculite intensa com infiltrado de neutrófilos e grande extravasamento de líquido para o interstício, podendo ocorrer trombose e até necrose do tecido. Existe a possibilidade de que o mesmo fenômeno ocorra nos pulmões frequentemente expostos aos antígenos.

A continuação da pesquisa atual permitirá que se estude a reação em tempo mais prolongado de 10 ou 12 horas, pois como sabemos a vasculite leucocitoclástica ocorre de 8 a 12 horas após o estímulo antigênico.

## 6 CONCLUSÕES

1. Os testes cutâneos intradérmicos com análogos de Asp f 1  $\alpha$  - sarcina, mitogilina e restrictocina produziram respostas imediatas e tardias (8 horas) positivas em pacientes com diagnóstico confirmado e sugestivo de Aspergilose Broncopulmonar Alérgica, podendo ser aplicados na prática clínica. As reações foram dose-relacionadas e a concentração ideal encontrada para os três antígenos foi de 10 $\mu$ g/mL que produziu pápulas de 5 a 10mm conforme padronização.
2. As substâncias produziram reações tardias o que reforça a existência de propriedades antigênicas comuns a essas toxinas.
3. As respostas à  $\alpha$ -sarcina, mitogilina e restrictocina não apresentaram diferença estatística entre as medidas das pápulas produzidas o que permite supor que os peptídeos alergênicos sejam comuns aos três antígenos estudados e que qualquer uma pode se adequar aos testes cutâneos.

4. As biópsias de pele do local da endureção produzida pela reação à mitogilina mostraram depósito de imunocomplexos na parede dos vasos da derme em 7 dos 55 pacientes biopsiados e ocorreu nos pacientes com suspeita de ABPA e em nenhum dos pacientes com diagnóstico de asma apenas sensibilizados ao *Aspergillus fumigatus*, o que demonstra uma tendência para seleção dos pacientes mais graves.

5. Os critérios vigentes baseados na pesquisa de IgE específica, não selecionaram pacientes com bronquiectasias produzidas por antígenos de *Aspergillus fumigatus* por mecanismo Tipo II e III.

6. Os testes intradérmicos com os antígenos seguido de biópsia não produziram complicações graves, isto é, reações sistêmicas, embora tenham provocado desconforto bem controlado com analgésicos.

7. Indivíduos sem asma ou outras doenças diagnosticadas e não sensibilizados ao *Aspergillus fumigatus*, não apresentaram

reações imediatas ao antígeno, afastando possível irritabilidade local produzida por essas substâncias.

8. O desdobramento desta pesquisa permitirá que se estude a reação ao teste intradérmico com tempo mais prolongado

9. O teste intradérmico desencadeou uma vasculite local à semelhança do que ocorre nos pulmões que estão constantemente expostos a esses antígenos.

## APÊNDICE A:

### 1. Níveis de IgE total normais por grupo etário:

Neonatos: até 1,5 UI/mL

0-1 ano: até 60 UI/mL

1-5 anos: até 60 UI/mL

6-9 anos: até 90 UI/mL

10-15 anos: até 200 UI/mL

Adultos: até 100 UI/mL

### 2. Extratos para testes cutâneos

#### 2.1. Bateria ALK testes epicutâneos - triagem

Fungos mix (*Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus amstelodami*,  
*Aspergillus niger* e *Aspergillus terreus*); Gramíneas (Pólens III mix:  
Avena, Hordeum, Secale, Triticum e Polens IV mix: Dactylis,

Festuca, Lolium, Phleum, Poá); Ácaros (*Dermatophagoides pteronissimus*, *Blomia tropicalis*); Epitélios (cão, gato); Insetos (*Blatella germânica* e *Periplaneta americana*) e os controles: positivo: (dicloridrato de histamina 0,01 mg /mL - teste epicutâneo e 0,001 mg/mL - teste intradérmico) negativo (solvente dos extratos). ALK Allergenics Ltda.,USA.

## 2.2. Extratos para testes cutâneos intradérmicos -triagem

Greer Laboratories,Inc. lot number-XPM3-F15-11. Concentração 1:20000

Bayer Laboratories Ltda lot number . Concentração 1:10000



3) Protocolo aplicado a pacientes e voluntários aprovado  
pela Comissão de Ética do Hospital das Clínicas -  
Pesquisa científica

Termo de consentimento pós informado

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO  
PAULO

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA  
OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE : .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : .M  F

DATA NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO:.....

BAIRRO.....CIDADE .....

CEP:..... TELEFONE:DDD(.....) .....

2. RESPONSÁVEL LEGAL .....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M  F

DATA NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....

BAIRRO.....CIDADE: .....

CEP:.....TELEFONE: DDD (.....).....

## II - Dados sobre a pesquisa científica

Título do protocolo de pesquisa : Análogos de Asp f 1:a-sarcina, mitogilina e restrictocina e no estadiamento da Aspergilose Broncopulmonar Alérgica e no diagnóstico da asma de difícil controle.

2.Pesquisador: Juçara Zulli Mohovic

Cargo/função: Médica pós-graduanda-Inscrição no Conselho Regional de Medicina Nº 26797

Unidade do Hospital das Clínicas-USP: Depto de Clínica Médica - Alergia e Imunopatologia

### 3. Avaliação do Risco da Pesquisa:

SEM RISCO  RISCO MÍNIMO x RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO  RISCO MAIOR

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4. Duração da pesquisa : 3 anos

III - Registro das explicações do pesquisador ao paciente ou seu representante legal sobre a pesquisa consignando:

1. Justificativa e objetivos da pesquisa :

Algumas pessoas com asma podem pegar uma doença chamada Aspergilose Broncopulmonar Alérgica, quando um fungo chamado *Aspergillus* vem pelo ar e entra no pulmão, fazendo a pessoa ter crises mais fortes de chiado e falta de ar. No começo é uma alergia, mas com o tempo, se o fungo ficar, podem aparecer alterações nos pulmões sendo que as complicações mais graves são "bolsinhas" chamadas de bronquiectasias onde fica catarro acumulado e com o tempo aparece fibrose, ou seja, endurecimento dos pulmões e dificuldade para respirar levando a uma má resposta à medicação que normalmente se utiliza para o tratamento da asma.

2.Procedimentos que serão utilizados e propostos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais:

Os exames que os pacientes com Asma, suspeitos de Aspergilose deverão fazer são:

Testes na pele: serão feitos dois tipos de teste: testes chamados testes percutaneos ou prick-tests e testes intradérmicos. O prick é um teste onde se colocam gotinhas de água misturada com

um pouquinho do fungo já morto na pele e se pica a pele com uma pequena lanceta de plástico. O teste intradérmico é um pouco mais profundo, e é usada uma agulha pequena e fina, com a qual se injeta uma porção bem pequena dessa água com o fungo dentro da pele. Se, depois de 20 minutos, a pele apresentar uma pápula que é como uma picada de mosquito, vamos medir para saber se o teste foi positivo, isto é, se você é ou não alérgico a esse fungo. Se não crescer nada, ou se a pápula for bem pequena, o teste é negativo. Se for maior, é positivo. Esse material foi fabricado em um laboratório americano e já foi usado nos Estados Unidos para testes, pois demonstrou ser seguro. Serão feitos 4 prick testes: 2 com os extratos de *Aspergillus* e 2 controles: 1 positivo com Histamina e 1 negativo com o dissolvente do extrato em cada braço e mais 12 intradérmicos com os testes das proteínas em concentrações diferentes.

Biópsia da pele: No caso de aparecer uma pápula 8 horas depois do teste intradérmico, será feita uma biópsia da pele, isto é será

retirado um pedacinho dessa pele do lugar do teste com um aparelhinho chamado "punch". Esse pedacinho de pele será examinado no laboratório para ver o tipo de reação que foi causada na pele pelo extrato do fungo. O motivo de fazer esse teste é que, quando aparece essa pápula depois de 6 a 8 horas, a chance da pessoa ter alterações nos pulmões é maior, mesmo que tenha RX normal. Assim, vamos ver se pelo exame da biópsia da pele podemos saber o que está acontecendo nos pulmões.

Testes com sangue: Será tirada uma amostra de seu sangue para testes no laboratório. Com esses testes, vamos tentar confirmar o teste feito na pele, isto é, se você tem alergia ao *Aspergillus* ou se o fungo está causando alterações nos seus pulmões. Uma parte desses exames não são exames feitos normalmente, mas o extrato do fungo já foi usado nos Estados Unidos, no Japão etc... do mesmo modo que queremos fazer aqui no Brasil. Aqui, será utilizado pela primeira vez para ver se é um bom teste para os pacientes daqui, isto é, se ajuda a confirmar se a pessoa tem

alergia por esse fungo e se por isso apresenta pouca resposta ao tratamento normal da asma.

### 3. Desconfortos e riscos esperados :

Você poderá sentir uma leve dor no local das picadas do teste na pele e no local picado para tirar sangue da veia. O teste de pele pode dar reação, por exemplo, uma crise de falta de ar e chiado, o que não é comum. Estamos preparados para medicar você se isso acontecer.

O teste mais desconfortável que você poderá fazer será a biópsia de pele. No caso de você fazer a biópsia, você receberá anestesia local e analgésicos, pois esse exame pode doer um pouco, depois que passar o efeito da anestesia; a dor pode ser semelhante àquela de se extrair um dente, ou até menor.

### 4. Benefícios que poderão ser obtidos:

Os testes que estamos propondo são para saber se você tem ou não a alergia e se está ou não com a doença. Se você estiver com a doença, queremos saber se queremos saber se essa doença está no começo ou se já está mais adiantada. Em qualquer um dos casos, poderemos tratá-lo, pois já existe tratamento. Essa pesquisa ajudará outras pessoas que podem estar com a doença, mas que ainda não tem diagnóstico por falta de testes simples e baratos.

5. Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo:

Sabemos que esse fungo vive no solo, nas folhas caídas das plantas, na grama, etc... Se descobirmos que a pessoa tem alergia por esse fungo, vamos poder orientá-la a evitar os lugares em que o fungo está, para evitar que fique tendo crises.



IV - Esclarecimentos dados pelo pesquisador sobre as garantias do sujeito da pesquisa:

1. Você será avisado de todos os riscos pelos quais poderá estar passando e ter todas as informações que quiser em qualquer momento, sobre exames. Poderá conversar comigo para tirar dúvidas.

2. Caso você desista de participar do projeto, terá liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento, e mesmo assim vai continuar sendo atendido e vai continuar a receber os medicamentos.

3. Os resultados dos exames que vou fazer serão um segredo e não serão contados para outras pessoas, sem a sua permissão.

4. Você será atendido por mim e por outros médicos do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP caso apresente danos decorrentes da pesquisa.

5. Não dispomos de meios para indenizar pessoas por danos decorrentes da pesquisa. Mas como o risco é muito baixo, não há motivo para preocupação.

V. Informações de nomes, endereços e telefones dos responsáveis pelo acompanhamento da pesquisa para contato em caso de intercorrências clínicas e reações adversas.

Dra. Juçara Zulli Mohovic- Rua Dr. Luis Pinto Serva,82- Vila São Francisco, São Paulo

Fones (011)37194354 ou (011) 91549616.

VI. Observações complementares:

VII - Consentimento pós informado:

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, de \_\_\_\_\_ de 200...

\_\_\_\_\_  
assinatura do sujeito da pesquisa  
pesquisador

\_\_\_\_\_  
assinatura do

ou responsável legal

4. Classificação da gravidade da asma de acordo com as normas estabelecidas pela estratégia global para manejo e prevenção publicada pelo Instituto Nacional de Saúde, Instituto do Coração, Pulmão e Sangue (2006)

Classificação considerando as manifestações clínicas antes do tratamento

Intermitente:

- Presença de sintomas menos que uma vez na semana;
- Exacerbações curtas;
- Presença de sintomas noturnos não mais que duas vezes ao mês;
- FEV1  $\geq$  80% do predito.

Leve Persistente:

- Presença dos sintomas mais que uma vez na semana mas menos que uma vez ao dia;
- Exacerbações podem afetar atividade e sono;
- Sintomas noturnos mais que duas vezes ao mês;
- FEV1  $\geq$  80% do predito.

Moderada Persistente:

- Sintomas diários;
- Exacerbações podem afetar atividade e sono;

- Sintomas noturnos mais que uma vez na semana;
- Uso diário de  $\beta$ 2-agonista de ação curta;
- FEV1 entre 60-80% do predito.

*Grave Persistente:*

- Sintomas diários;
- Exacerbações freqüentes;
- Sintomas noturnos freqüentes;
- Limitação das atividades físicas;
- FEV1  $\leq$  60% do predito.

5. Escala de Norman para leitura de teste intradérmico

Graduação	Eritema	Pápula
0	<5mm	<5mm
+/-	5-10mm	5-10mm
1+	11-20mm	5-10mm
2+	21-30mm	5-10mm
3+	31-40mm	10-15mm ou pseudópodes
4+	>40mm	>15mm ou pseudópodes

Adaptado: NORMAN PS. In vivo methods of study of allergy: Skin and mucosal tests, techniques, and interpretation. In: Middleton E, Reed CE, Ellis EF, editors. Allergy: principles and practice. 2nd ed. St Louis, Toronto: Mosby; 1983. Vol II. P.295-302.

6. Classificação dos resultados dos pacientes pelas concentrações de IgE específica pelo Teste Imunoenzimático( kUA/L )

CLASSE 1 ( 0,35-0,69 )	Ausente ou indetectável
CLASSE 2 ( 0,7-3,49 )	Baixo
CLASSE 3 ( 3,5-17,49 )	Moderado
CLASSE 4 ( 17,5-49 )	Elevado
CLASSE 5 ( 50-99 )	Muito elevado
CLASSE 6 ( 100 OU SUPERIOR)	Muito elevado

## REFERÊNCIAS

Aas K, Leegaard J, Aukrust, G. O Immediate type hyper sensitivity to common moulds. *Allergy* 1980;35:443-51.

Adde FV. Fibrose cística no adulto; uma realidade nos dias de hoje. *Boletim Paulista de Pneumologia*. 2004;26:7-10.

Alam R. Chemokines in allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 1997;99:273-7.

American Thoracic Society. Lung function testing: Selection of reference values and interpretative strategies. *Am Rev Respir Dis*. 1991;144:1202-18.

Angus RM, Davies ML, Cowan MD, McSharry C, Thomson NC. Computed tomographic scanning of the lung in patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis and in asthmatic patient with a positive skin test to *Aspergillus fumigatus*. *Thorax*. 1994;49:586-9.

Annaix V, Bouchara JP, Larcher G, Chabasse D, Tronchin G. Specific binding of human fibrinogen fragment D to *Aspergillus fumigatus* conidia. *Infect Immun*. 1992;60:1747-55.

Arruda LK, Mann BJ, Chapman MD. Selective expression of a major allergen and cytotoxin Asp f 1 in *Aspergillus fumigatus*. Implications for the immunopathogenesis of *Aspergillus*-related diseases. *J Immunol*. 1992b;149:3354-9.

Arruda LK, Platts-Mill TAE, Fox JW, Chapman MD. *Aspergillus fumigatus* allergen I, a major IgE-binding protein, is a member of the mitogillin family of cytotoxins. *J Exp Med*. 1990;172:1529-32.

Arruda LK, Platts-Mills TAE, Longbottom JL, EL-Dahr JM, Chapman MD. *Aspergillus fumigatus*: identification of 16, 18 and 45 kd



antigens recognized by human IgG and IgE antibodies and murine monoclonal antibodies. *J Allergy Clin Immunol*. 1992a;89:1166-76.

Banerjee B, Kurup VP. Molecular biology of aspergillus allergens. *Front Biosci*. 2003;8:s128-39.

Banerjee B, Kurup VP, Greenberger PA, Hoffman DR, Nair DS, Fink JN. Purification of a major allergen, Asp f 2 binding to IgE in allergic bronchopulmonary aspergillosis, from culture filtrate of *Aspergillus fumigatus*. *J Allergy Clin Immunol*. 1996;99(6):821-7.

Bardana EJ. The clinical spectrum of aspergillosis Part 1: Epidemiology, pathogenicity, infection in animals and immunology of *Aspergillus*. *CRC Crit Rev Clin Lab Sci*. 1980;13:21-83.

Basich JE, Graves TS, Baz MN, Scalon G, Hoffmann RG, Patterson R, Fink JN. Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis in corticosteroid-dependent asthmatics. *J Allergy Clin Immunol*. 1981;68:98-102.

Becker JW, Burke W, Mc Donald G, Greenberger PA, Henderson

WR, Aitken ML. Prevalence of allergic bronchopulmonary aspergillosis and atopy in adult patients with cystic fibrosis. *Chest*. 1995;108:1283-7.

Bhattacharya P. Allergic bronchopulmonary aspergillosis or bronchopulmonary aspergillosis with asthma? *Chest*. 1999;116:1844-5.

Birch M, Robson G, Law D, Denning DW. Evidence of multiple extracellular phospholipase activities of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immunol*. 1996;64:751-5.

Blease K, Jakubzick C, Westwick J, Nicholas L, Steven LK, Hogaboamm CM. Therapeutic effect of IL-13 immunoneutralization during chronic experimental fungal asthma. *J Immunol*. 2001;166:5219-224.

Borger P, Koeter GH, Timmerman JAB, Vellenga E, Tomee JFC, Kauffman HF. Proteases from *Aspergillus fumigatus* induce interleukin IL-6 and IL-8 production in airway epithelial cell lines by

transcriptional mechanisms. *J Infect Dis Society of America*. 1999;180:1267-74.

Bousquet J, Michel F. In vivo methods for study of allergy. Skin tests, techniques and interpretation. In: Middleton E, Reed CE, Ellis EF, editors. *Allergy: principles and practice*. 4<sup>th</sup> ed. St Louis: Mosby; 1993. p. 573-594.

Brummund W, Resnick A, Fink JN. *Aspergillus fumigatus*- specific antibodies in allergic bronchopulmonary aspergillosis and aspergilloma. Evidence for a polyclonal antibody response. *J Clin Microbiol*. 1991;29:2099-106.

Chauhan B, Knutsen AP, Hutcheson PS, Slavin RG, Bellone CF. T cell subsets, epitope mapping and HLA restriction in patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J Clin. Invest*. 1996;97:2324-31.

Chauhan B, Santiago L, Kirschmann D A, Hauptfeld V, Knutsen AP, Hutcheson PS, Woulfe SL, Slavin RG, Schwartzt HL, Bellone CJ. The

association of HLA-DR alleles and Tcell activation with allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J Immunol.* 1997;159:4072-6.

Chinoy B, Yee E, Bahna SL. Skin testing versus radioallergosorbent testing for indoor allergens. *Clin Mol Allergy.* 2005;3(4):1-7.

Cockrill BA, Hales CA. Allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Ann Rev Med.* 1999;50:303-16.

Cooper, JA, Weinbaum DL, Aldrich TK, Mandell GL. Invasive aspergilosis of the lung and pericardium in a non-immunocompromised 33 year old man. *Am J Med* 1981,71:903-7.

Coulot P, Bouchara JP, Reiner G, Annaix V, Planchenault C, Tronchin G, Chabasse D. Specific interaction of *Aspergillus fumigatus* with fibrinogen and its role in cell adhesion. *Infect Immunol.* 1994;62:2169-77.

Cramer R. Molecular cloning of *Aspergillus fumigatus* allergens and their role in Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis. *Chem Immunol.*

2002;81:73-93.

Cramer R. Recombinant *Aspergillus fumigatus* allergens: from the nucleotide sequences to clinical applications. *Int Arch Allergy Immunol.* 1998;115:99-114a.

Cramer R, Hemman S, Ismail C, Menz G, Blazer K Disease-specific recombinant allergens for the diagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Int Immunol.* 1998;10:1211-6b.

Del Prete G, De Carli M, Almerigogna F, Giudizi MG, Biagiotti R, Romagnani S. Human IL-10 is produced by both type1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. *J Immunol.* 1993;150:353.

Demoly P, Michel François-Bernard M, Bousquet J In vivo methods for study of allergy skin-tests, techniques and interpretation . In: Middleton E, Reed CE, Ellis EF, Adkinson NF, Yunginger JW, Busse

WW, editors. Allergy: principles and practice. 5<sup>nd</sup> ed. St Louis: Mosby; 1998. v.II, p.430-9.

Denning DW. Chronic forms of pulmonary aspergillosis. Clin Microbiol Infect. 2001;7(Suppl 2):25-31.

Dreborg S, Bachman A, Basomba A, Bousquet J, Dieges P, Malling HJ. Skin tests used in type 1 allergy; skin test reaction in 656 asthmatic patients. Allergy. 1989;44(Suppl 10):1-59.

Eaton T, Garret J, Milne D, Frankel A, Wells AU. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in the asthma clinic: A prospective evaluation of CT in the diagnostic algorithm. Chest. 2000;118:66-72.

França, AT. Asma brônquica. Importância do *Aspergillus fumigatus* [tese livre-docência]. Rio de Janeiro, 1974.

Galvão PT. Revisão sobre a colonização fúngica crônica pelo *Aspergillus fumigatus* e sua correlação com a evolução clínica, radiológica e imunológica em crianças portadoras de fibrose cística

[dissertação). São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1993.

Gambale W, Purchio A, Croce J. Flora fúngica anemófila da grande São Paulo. *Rev Microbiol.* 1977;8:75-9.

Geha RS. Circulating immune complexes and activation of the complement sequence in acute allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J Allergy Clin Immunol.* 1977;60(6):357-9.

Graziutti ML, Rex JH, Cowart ER, Anaissie EJ, Ford A, Savary CA. *Aspergillus fumigatus* conidia induce a Th1-type cytokine response. *J Infect Dis.* 1998;176:179.

Greenberger PA. Allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J Allergy Clin Immunol.* 1988;74:645-50.

Greenberger PA. Allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Current Reviews of Allergy and Immunology.* *J Allergy Clin Immunol.* 2002;5:685-92.

Greenberger PA, Miller T, Roberts M, SMITH L. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with or without evidence of bronchiectasis. *Ann Allergy*. 1993;70:333-8.

Grunig G, Corry DB, Leach MW, Seymour BW, Kurup VP, Rennik DM. Interleucin-10 is a natural suppressor of cytokine production and inflammation in a murine model of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J Exp Med*. 1997;185:916-8.

Halwig JM, Brueske DA, Greenberger PA, Dreisin RB, Sommers HM. Allergic bronchopulmonary curvulariosis. *Am Rev Respir Dis*. 1985;132(1):186-8.

Hemmann S, Ismail C, Blaser K, Menz G, Cramer R. Skin-test reactivity and isotype-specific immune responses to recombinant Asp f 3, a major allergen of *Aspergillus fumigatus*. *Clin Exp Allergy*. 1998;28:860-7.

Henderson AH. Allergic aspergillosis: Review of 32 cases. *Thorax*. 1968;23:501.



Hendrick DJ, Davies RJ, D´Souza MF, Pepys J. An analysis of skin prick-test reaction in 656 asthmatic patients. *Thorax*. 1975;30:2-8.

Hogaboam CM, Blease K, Schuh JM. Cytokines and chemokines in allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA) and experimental aspergillus-induced allergic airway or asthmatic disease. *Front Biosci*. 2003;8:147-56.

Hogaboam CM, Gallinat CS, TAUB DD, Strieter RM, Kunkel SL, Lukacs NW. Immunomodulatory role of C10 Chemokine in a murine model of Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis. *J Immunol*. 1999;162:6071-9.

Huang SK, Xiao HQ, Kleine-Tebbe J, Paciotti G, Marsh DG, Lichtenstein LM, Liu MC. IL-13 Expression at the sites of allergen challenge in patients with asthma. *J Immunol*. 1995;155:2688-94.

Huffnagle GB, Deepe GS. Innate and adaptive determinants of host susceptibility to medically important fungi. *Curr Opin Microbiol*. 2003;6(4):344-50.

Husebye KO Serial studies in a case of pulmonary aspergillosis. *Dis Chest*. 1967;51:327.

Imbeau SA, CHEN M, Reed CE. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in infants. *Am J Dis Child*. 1977;131:1127.

Irwin RS, Curley FJ, French CL. Difficult-to-control asthma. Contributing factors and outcome of a systematic management protocol. *Chest*. 1993;103:1662-9.

Jaton-Ogay K, Suter M, Crameri R, Facheto R, Faith A, Monod M. Nucleotide sequence of a genomic and a cDNA clone encoding an extracellular alkaline protease of *Aspergillus fumigatus*. *FEMS Microbiol Lett*. 1992;92:163-8.

Kauffmann HF. Inflammatory cells and airway defense against *Aspergillus fumigatus*. *Immunol Allergy Clin North Amer*. 1998;18(3):619-40.

Kauffmann HF, Tomee JFC. Defense mechanisms of the airways

against *Aspergillus fumigatus*: role in invasive aspergillosis. *Chem Immunol.* 2002 81:94-113.

Kauffmann HF. Immunopathogenesis of allergic bronchopulmonary aspergillosis and airway remodeling. *Front Biosci.* 2003;8:190-6.

Knutsen AP. Lymphocytes in allergic bronchopulmonary aspergillosis *Front Biosci.* 2003;8:589-602.

Kurup VP, Kumar AS, Kenealy R, Greenberger PA. *Aspergillus* ribotoxins react with IgE and IgG antibodies of patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J.Lab Clin Med.* 1994;123:749-56.

Kurup VP, Murali PS, Guo J, Choi H, Banerjee B, Fink JN, Coffman RL. Anti-interleukin IL-4 and IL-5 antibodies down regulate IgE and eosinophilia in mice exposed to *Aspergillus* antigens. *Allergy.* 1997;52:1215-21.

Kwon-Chung KJ, Bennett JE, editors. *Medical mycology.* Philadelphia,

Pa: Lea et Febiger; 1992.

Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, Melo NT.  
Tratado de micologia médica. 9ª ed. São Paulo: Sarvier; 2002.

Langfelder K, Streibel M, Jahn B, Haase G, Brakhage AA  
Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human  
pathogenic fungi. *Fungal Genetics and Biology*. 2003;143-158.

Lamy B, Moutaouakil M, Latge JP, Davies J. Secretion of a potential  
virulence factor, a fungal ribonucleotoxin, during human aspergillosis  
infections. *Mol. Microbiol*. 1991;5:1811.

Latgé JP. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. *Clin. Microbiol.*  
*Rev*. 1999;12:310-50.

Latgé JP. Tools and trends in the detection of *Aspergillus*  
*fumigatus*. *CurrTop Med Mycol*. 1995;6:245-81.

Lee CG, Hommer RJ, Zhu Z, Lanone S, Wang X, Koteleansky V,  
Shiplely JM, Gotwals P, Noble P, Chen Q, Senior RM, Elias JA.

Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating TGF- $\beta$ 1. *J. Exp. Med.* 2001;194:809-21.

Llamas R, Hart DR, Schneider NS. Allergic bronchopulmonary aspergillosis associated with smoking moldy marijuana. *Chest.* 1978;73:871-2.

Madan T, Eggleton P, Kishore U, Strong P, Agarwal S, Sarma PU, Reid PM. Binding of pulmonary surfactant proteins A e D to *Aspergillus fumigatus* conidia enhances phagocytosis and killing by human neutrophils and alveolar macrophages. *Infect. Immun.* 1997;65:3171-9.

Marchand E, Dumoulin CV, Mairesse M, Delaunois L, Brancaleone P, Rahier JF, Vandenplas O. Frequency of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations and 5T allele in patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Chest.* 2001;119:762-7.

Marr KA, Koudadoust M, Black M, Balajee SA. Early events in macrophage killing of *Aspergillus fumigatus* conidia: new flow cytometric viability assay. *Clin Diag Lab Immunol.*, 2001;8:1240-7.

Mayer C, Appenzeller U, Seelbach H, Achartz G, Oberkofer H, Breitenbach M, Blaser K, Cramer R. Humoral and cell-mediated autoimmune reactions to human acidic ribosomal P2 protein in Individuals sensitized to *Aspergillus fumigatus* P2 protein. *J Exp Med.* 1999;189:1507-12.

McAller R, Kroenert DB, Elder JL. Allergic bronchopulmonary disease caused by *Curvularia lunata* and *Drechslera hawaiiensis*. *Thorax.* 1981;36:338.

McCarthy DS, Pepys J. Allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Clin Allergy.* 1971;21:261-86.

McPartland JM. Microbiological contaminants of marijuana. *J Int Hemp Assoc.* 1994;1:41-4.

Mehrad B, Strieter RM, Standiford TJ. Role of TNF- $\alpha$  in pulmonary host defense in murine invasive aspergillosis. *J Immunol.* 1999;162:1633-40.

Miller PW, Hamosh A, mACEJ M Jr. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene mutations in allergic bronchopulmonary asp aspergillosis. *Am J Human Genet.* 1996;59:45-51.

Miller MA, Greenberger PA. American R Allergic bronchopulmonary mycosis caused by *Pseudallescheria boydii*. *Am Rev Resp Dis.* 1993;148:810.

Mitchell TA, Hamilos DL, Lynch DA, Newell JD. Distribution and severity of bronchiectasis in allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA). *J Asthma.* 2000;37:65-72.

Mohovic J Z, Gambale W, Croce J. Cutaneous positivity in patients with respiratory allergies to 42 allergenic extracts of airborne fungi isolated in São Paulo, Brazil. *Allergol Immunopathol.* 1988;16(6):397-402.

Moser M, Cramer R, Brust E, Suter M, Menz G. Clinical aspects of allergic disease: Diagnostic value of recombinant *Aspergillus fumigatus* allergen I/a for skin testing and serology. *J Allergy Clin Immunol.* 1993;93:1-11.

Moser M, Cramer R, Menz G, Schneider T, Dudler T, Virchow C, Gmachl M, Blaser K, Suter M. Cloning and expression of recombinant *Aspergillus fumigatus* allergen I/a (rAsp f 1 a) with IgE binding and type I skin test activity. *J Immunol.* 1992;149:454-60.

Moser M, Menz G, Blaser K, Cramer R. Recombinant expression and antigenic properties of a 32-kilodalton extracellular alkaline protease, representing a possible virulence factor from *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immunol.* 1994;62:936-42.

Murali PS, Greenberger PA, Kurup VP. Cytokines in allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Immunol Allergy Clin North America.* 1998;18:681-94.

National Institutes of Health, National Heart, Lung and Blood



Institute. "Workshop Report": Global strategy for asthma management and prevention. Bethesda, Maryland, USA; 2006.

Neeld DA, Goodman LR, Gurney JW, Greenberger PA, Fink JN. Computerized tomography in the evaluation of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Am Rev Respir Dis.* 1990;142:1200-5.

Nikolaizik WH, Cramer R, Blaser K, Schöni MH. Skin test reactivity to recombinant *Aspergillus fumigatus* allergen I/a in patients with cystic fibrosis. *Int Arch Allergy Immunol.* 1996;111:403-8.

Norman PS. In vivo methods of study of allergy: Skin and mucosal tests, techniques, and interpretation. In: Middleton E, Reed CE, Ellis EF, editors. *Allergy: principles and practice.* 2<sup>nd</sup> ed. St Louis: Mosby; 1983. v.II, p.295-302.

Novey HS. Epidemiology of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Immunol Allergy Clin North Am* 1998;18:641-653.

Oliveira, ER. Valor da pesquisa de IgE sérica específica a alérgenos recombinantes do *Aspergillus fumigatus* r Asp f 1,2,3,4 e 6 no diagnóstico da Aspergilose Broncopulmonar Alérgica. [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2003.

Ouchterlony Ö. Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. *Prog Allergy*. 1958;5:1-78.

Pasteur V-R, Giroud P. Sporomycose des pelleteurs de grains. *Bull Mem Soc Med Hosp Paris*. 1928;52:1632-6.

Patterson R, Greenberger PA, Halwig JM. Allergic bronchopulmonary aspergillosis, natural history and classification of early disease by serological and roentgenographic studies. *Arch Intern Med*. 1986;146:916

Patterson R, Greenberger PA, Harris KE. Allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Chest*. 2000;118:7-8.

Patterson R, Greenberger PA, Radin RC, Roberts M. Allergic bronchopulmonary aspergillosis: staging as an aid to management. *Ann Intern. Med.* 1982;96:286-91.

Phelan MS, Kerr H. Allergic broncho-pulmonary aspergillosis: the radiological appearance during long-term follow-up. *Clin Radiol.* 1984;35:385-92.

Reijula KE, Kurup VP, Fink JN. Ultrastructural demonstration of specific IgG and IgE antibodies binding to *Aspergillus fumigatus* from patients with aspergillosis. *J Allergy Clin Immunol.* 1991;87:683.

Richardson MD, Shankland GS. Pathogenesis of fungal infections in the non-compromised host. In: Warnock DW, Richardson MD, editors. *Fungal infections in the compromised patient.* 2<sup>nd</sup>.ed. Chichester: John Wiley; 1991.

Riley DJ, Mackenzie JW, Uhlman WE. Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis: evidence of limited tissue invasion. *Am Rev Respir Dis.* 1975;111:232.

Rosenberg M, Patterson R, Mintzer R, Cooper J, Roberts M, Harris KE. Clinical and immunologic criteria for the diagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Ann Intern Med.* 1997;86:405-14.

Rosner, B. *Fundamentals of biostatistics.* 4<sup>a</sup> ed New York: Duxbury; 1994.

Safirstein BH. Aspergiloma consequent to allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Amer Rev Resp Dis.* 1973;108:940b.

Safirstein BH, D´Souza M F, Simon G, Tai EHC, Pepys J. Five-year follow-up of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Amer Rev Respir Dis.* 1973;18:450-9a.

Schwartz HJ, Greenberger PA. The prevalence of allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with asthma, determined by serologic and radiologic criteria in patients at risk. *J Lab Clin Med.* 1991;117:138-42.

Serpa SF. Aspergilose broncopulmonar alérgica: prevalência e critérios diagnósticos em pacientes asmáticos sensíveis ao *Aspergillus fumigatus*. [dissertação]. Rio de Janeiro: Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro; 1997.

Shah A, Khan ZU, Chaturvedi S, Ramchandran S, Randhawa HS, Jaggi OP. Allergic bronchopulmonary aspergillosis with coexistent aspergilloma: a long-term followup. *J Asthma*. 1989;26:109-15.

Sharma OP, Chwogule R. Many faces of bronchopulmonary aspergillosis *Eur Respir J*. 1998;12:705-15.

Sistema de informações hospitalares do Sistema Único de Saúde - SIH/SUS. 2004.

Slight J, Nicholson WJ, Mitchel CG, Pouilly N, Beswick PH, Seaton A, Donaldson K. Inhibition of the alveolar macrophage oxidative burst by a diffusible component from the surface of the spores of the fungus *Aspergillus fumigatus*. *Thorax*. 1996;51:389 -96.

Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. II Consenso brasileiro de Espirometria. J Bras Pneumol. 2002.

Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. IV Diretrizes brasileiras para o manejo da asma: definição, epidemiologia e fisiopatologia. J Bras Pneumol. 2006; 32(Supl. 7):S447-74.

Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. I Consenso brasileiro sobre espirometria. J Pneumol. 1996;22(3):105-64.

Steengaard J, Johansen AS. Biochemical aspects of immune complex formation and immune complex diseases. *Allergy*, 1980;35:457-72.

Stevens DA, Kan VL, Judson MA, Morrison VA, Dummer S, Denning DW, Bennet JE, Walsh TJ, Patterson TF, Pankey G. Practice guidelines for diseases caused by *Aspergillus* Clin Infect Dis. 2000;30:696-709.

Stolzenberg ED, Anderson GM, Ackermann MR, Whitlock RH, Zasloff M. Epithelial antibiotic induced in states of disease. Proc

Natl Acad Sci USA. 1997;94:8686-90.

Storm van Leeuwen W. Diagnosis and treatment of allergic diseases.  
Neurotherapie. 1922;6:1-18.

Summerbell RC. Taxonomy and ecology of *Aspergillus* species associated with colonizing infections of the respiratory tract.  
Immunol Allergy Clin North Am. 1998;18(3):549-73.

Svirshchvskaya EV, Kurup VP. Immunotherapy of allergic bronchopulmonary aspergillosis: a clinical and experimental approach.  
Front Biosci. 2003;8:s92-101.

Thurston JR, Richard JL, Mcmillem S. Cultural and serological comparison of ten strains of *Aspergillus fumigatus fresenius*.  
Mycopath Mycol Appl. 1973;51:327-35.

Tino G The spectrum of airways diseases: new insights.  
bronchiectasis a re-emerging disease. Chest, 2006; 7-9.

Tomee JFC, Wierenga ATJ, Hiemstra PS, Kauffman HF. Proteases from *Aspergillus fumigatus* induce release of proinflammatory cytokines and cell detachment in airway epithelial cell lines. *J Infect Dis.* 1997;176:300-3.

Van der Zee JS, Grot H, Swieten Van P, Jansen HM, Aalberse RC. Discrepancies between the skin test and IgE antibody assays: Study of histamine release, complement activation in vitro and occurrence of allergen-specific IgG. *J Allergy Clin Immunol.* 1988;82:270-81.

Varkey B. Allergic bronchopulmonary aspergillosis: Clinical perspectives. *Immunol Allergy Clin North Am.* 1998;18:479-501.

Varkey B. Clinical perspectives of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Immunol Allergy Clin North Am.* 1998;18:479-501.

Wallenbeck I, Aukrust L, Einarsson R. Antigenic variability of different strains of *Aspergillus fumigatus*. *Int. Arch Allergy Appl Immunol.* 1984;73:166-72.



Wahner HW Pulmonary aspergillosis. *Ann Intern Med.* 1963;58:472.

Walker C. Activated T cells and cytokines in bronchoalveolar lavages from patients with various lung diseases associated with eosinophilia. *Am J Respir Crit Care Méd.* 1994;150:1038-48.

Waring P. DNA fragmentation induced in macrophages by gliotoxin does not require protein synthesis and is preceded by raised inositol triphosphate levels. *J Biol Chem.* 1990;265:14476-80.

Wark PAB, Gibson PG. Allergic bronchopulmonary aspergillosis: New concepts of pathogenesis and treatment. *Respirology.* 2001;39:1721-30.

Wark PAB, Saltos N, Simpson J, Slater S, Hensley MJ, Gibson PG. Induced sputum eosinophils and neutrophils and bronchiectasis severity in allergic bronchopulmonary aspergillosis *Eur Resp J.* 1999;14:P3159.

Weig M, Frosch M, Tintelno TK, Haas A, Grob U, Linsmeier B,

Heesemann J. Use of recombinant Mitogillin for improved serodiagnosis of *Aspergillus fumigatus*-associated diseases. J Clin Microbiol. 2001, 39:1721-30.

Zach HS. Lung disease in cystic fibrosis-An update concept. Pediatric Pulmonol. 1990;8:188-202.