

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

PATOGENICIDADE E CARÁTER ACIDOFÍLICO
DO ASPERGILLUS NIGER

Tese apresentada ao curso de Pós Graduação
em Pneumologia, Faculdade de Medicina,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
para a obtenção do grau de Doutor.

Karla Portela Gramacho

Orientador:

Dr. Luiz Carlos Severo

T-1135

Porto Alegre

1995

FACULDADE DE MEDICINA
UFRGS - HOPA

19969

SE
C 450
745P
195

MED
1996/171159-0
1996/09/25

Ficha Catalográfica

Gramacho, Karla Portela

Patogenicidade e caráter acidofílico do **A. niger**.
Porto Alegre, UFRGS, 1995.

xvi, 69p.

Tese (doutorado. Pneumologia) UFRGS. Faculdade de
Medicina.

1. Aspergilose
2. Patogenia
3. **Aspergillus niger**
4. Acidose

Aos meus pais, pelo estímulo.

*A Flavio pela oportunidade de
convivência e engrandecimento
pessoal.*

“Felicidade é ter o que fazer...”

*Aristóteles, em sentença de abertura de
“Ética”.*

AGRADECIMENTOS

Este trabalho não poderia ter sido uma obra isolada, sem o apoio de vários colegas de diversas áreas. O resultado é uma prova do êxito da cooperação deste grupo de pessoas.

Agradeço:

- Ao Dr. CLÓVIS VAMMACHER - Departamento de bioquímica da UFRGS, o meu aprendizado na lida com os animais de laboratório, demonstrações das técnicas de manipulação, analgesia, informações sobre seus hábitos de vida e comportamento.
- Ao Dr. DOMINGOS CLAUSEL - Instituto de Pesquisas Biológicas (IPB) SSMA, RS e UFRS, especialmente a demonstração de técnica de inoculação no saco venoso conjuntival, que viabilizou este projeto.
- À equipe de patologistas da Fundação Faculdade Ciências Médicas de Porto Alegre, especialmente ao Dr. GILBERTO DE NAPOLI, responsável pelo laudo histopatológico das lâminas coradas pelo H&E.
- Ao apoio do Dr. JOÃO CARLOS COELHO, Professor titular de Patologia da Escola Bahiana de Medicina, chefe do serviço de patologia do I.B.I.T., na revisão das lâminas com reação tecidual ao fungo e orientação dos aspectos patológicos dos órgãos envolvidos.
- Ao Dr. ARYON DE ALMEIDA BARBOSA, patologista e pesquisador titular da FIOCRUZ (Salvador, BA), devo a ajuda na documentação da microfotografia de todo o material do estudo.

- Ao Dr. MITERMAYER GALVÃO REIS, diretor desta instituição, pela permissão de utilização dos equipamentos necessários. Ao Prof. ZILTON ANDRADE - pesquisador titular da FIOCRUZ (Salvador, BA), pela avaliação das lesões renais.
- Ao Dr. BALMUKUND NILJAY PATEL, médico veterinário, pesquisador visitante da FIOCRUZ (Salvador, BA), agradeço o auxílio nas fotografias dos camundongos e contribuição com o empréstimo de material didático para casos de infecção aspergilar animal.
- Aos colegas do IPB, SSMA, RS, local onde desenvolvi a colheita dos dados e obtive o auxílio da Dra. MARIA CRISTINA BASSANESI, chefe do Serviço de Micologia e responsável pelo laudo das lâminas coradas pela prata.
- A MARIA CRISTINA CODORNY, estagiária do Serviço de micologia (IPB), pela coloração do terço final das lâminas pela prata.
- À equipe do Biotério (IPB), pelo fornecimento diário de animais enquadrados nos requisitos exigidos pelo estudo, e especialmente à diretora do IPB, Dra. SILVIA BEATRIZ C. CZERMAINSKI pelo estímulo à pesquisa científica através da autorização do intercâmbio com a UFRGS.
- À equipe do Instituto de Pesquisa e Diagnóstico, Santa Casa, RS, sobretudo a FLÁVIO DE MATOS OLIVEIRA, pelo auxílio constante com o manejo dos camundongos e coloração de 70% das lâminas.
- Ao Dr. A. A. PADIHYE - Center for Disease Control and Prevention (CDC) Atlanta, EUA, chefe epidemiologista investigacional pelo fornecimento de cepa de **Aspergillus niger** de alto poder patogênico e interesse na condução do trabalho.
- Ao Dr. CARLOS MAURÍCIO CARDEAL MENDES, médico especialista em estatística aplicada da UFBA (Salvador, BA), devo o processamento dos dados e o trabalho na orientação da análise estatística.

- Aos professores do curso de Pós-Graduação em Pneumologia (UFRGS), pela qualidade do curso e orientação de uma medicina voltada para a busca incessante do diagnóstico. Ao Dr. NELSON DA SILVA PORTO, Pavilhão Pereira Filho, Santa Casa, devo meu crescimento profissional proporcionado por este período de convívio. Ao Dr. JORGE HETZEL, agradeço o apoio, credibilidade e atenção presente nos momentos mais difíceis.
- Ao Dr. ANTÔNIO CARLOS MOREIRA LEMOS, UFBA (Salvador-BA), devo minha formação durante a residência médica e orientação na busca de novos conhecimentos com a equipe deste hospital.
- À Dra. CARMEM LÚCIA KAUER e ao Dr. PAULO MARÓSTICA, colegas do curso de Pós-Graduação, devo a amizade e carinho durante todo o processo em que caminhamos juntos.
- Finalmente, destaco a contribuição do Dr. LUIZ CARLOS SEVERO, meu orientador, com quem aprendi a transformar idéias e a conduzir pesquisas científicas. Seu exemplo de desafio e questionamento aos conceitos estabelecidos sempre estarão presentes em minha vida profissional.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Termotolerância e diâmetro conidial de grupos de <i>Aspergillus</i>	7
Tabela 2:	Tempo médio de sobrevida dos camundongos	23
Tabela 3:	Correlação entre tempo de sobrevida e número de hifas presentes nos tecidos	27
Tabela 4:	Gradação da reação tecidual à concentração de 10^6 conídios fúngicos	27
Tabela 5:	Gradação da reação tecidual à concentração de 10^4 conídios fúngicos.	28

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Pág.
Figura 1: A. niger : Vesícula globosa de até 100 µm de diâmetro, esteregmos cerca de duas vezes o comprimento das fiálides (x 500). (AUSTWICK, 1977).....	2
Figura 2: Espectro clínico da aspergilose, de Pennington (1980), modificado por SEVERO (1993).....	5
Figura 3: Efeito do potencial hidrogenioionte (pH) na germinação do A. niger	7
Figura 4: Camundongos utilizados no projeto.	10
Figura 5: Técnica de inoculação venosa, utilizada nos camundongos	12
Figura 6: Discreta presença dos conídios aspergilares em parênquima hepático (Grocott ; x 500).....	15
Figura 7: Hifa do A. niger em parênquima pulmonar de animal do grupo 1, diabete e acidose (Grocott ; x 400).....	16
Figura 8: Padrão do exsudato inflamatório leve, em parênquima renal (H&E ; x 100)	17
Figura 9: Padrão do exsudato inflamatório moderado em parênquima renal (H&E ; x 100)	17
Figura 10: Intenso infiltrado celular em pelve renal. (H&E ; x100).	18
Figura 11: Parasitismo fúngico na superfície renal de leve intensidade (Grocott ; x 100).....	19

Figura 12:	Moderada concentração de A. niger , em parênquima renal (Grocott ; x 100).....	19
Figura 13:	Intensa concentração de A. niger a nível renal pelos padrões estabelecidos (Grocott ; x 100)	20
Figura 14:	Exsudato inflamatório focal no interstício pulmonar (H&E ; x 100)	21
Figura 15:	Exsudato celular extendendo-se em toda superfície pulmonar (H& E ; x 100)	21
Figura 16:	Função sobrevivência ($p < 0, 01$).....	24
Figura 17:	Taxa de dispersão de sobrevida dos animais	25
Figura 18:	Função risco ($p < 0, 01$)	26
Figura 19 (A):	Intenso parasitismo fúngico, predominante na pelve renal, em camundongo do grupo 3 (controle). Grocott (x100)	29
Figura 19 (B):	Neste mesmo animal observa-se reação inflamatória intensa envolvendo a região pélvica, delimitando a massa aspergilar (H&E ; x 100)	29
Figura 20 (A):	Camundongo com diabete e acidose, apresentando intenso parasitismo pelo A. niger em toda a extensão da medular renal (Grocott ; x 400).....	30
Figura 20(B):	Neste mesmo animal observa-se o infiltrado inflamatório desproporcional, de moderada, para o intenso parasitismo fúngico (H&E ; x 100)	30
Figura 21:	Predomínio celular renal	31
Figura 22:	Cultivo renal	32
Figura 23:	Pneumonia intersticial provocada pelo A. niger (H&E ; x 100)	32

Figura 24:	Conídios de A. niger no alvéolo de camundongo do grupo 2 (hiperglicemia). Grocott (x 400).....	33
Figura 25:	Foco de pneumonia identificado no grupo dos diabéticos sem acidose metabólica (H&E ; x 400).....	33
Figura 26:	Padrão histológico renal predominante nos três grupos do estudo (H&E ;x 100)	34
Figura 27:	Caso 52.2 - Conídios no parênquima hepático (Grocott; x 1000).....	35
Figura 28:	Caso 52.2 - Estudo histológico do fígado no animal em que se detectou a presença dos conídios aspergilaes (H&E; x 100).....	35
Figura 29:	Estruturas histológicas na aspergilose broncopulmonar aguda (OKUDARIA, 1985).....	44

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- ABPA = Aspergilose Broncopulmonar Alérgica
- APIA = Aspergilose Pulmonar Invasiva aguda
- APNC = Aspergilose Pulmonar Necrosante Crônica
- CDC = Centro para Prevenção e Controle de Doenças
- CIPA = Colonização Intracavitária Pulmonar Aspergilar
- Scl = Sabouraud com cloronfenicol
- SIDA = Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE TABELAS	VIII
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	IX
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	XII
RESUMO	XV
ABSTRACT	XVI
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	9
2.1. Objetivo geral	9
2.2. Objetivos específicos	9
3. MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1. Material	10
3.1.1. Os animais	10
3.1.2. O fungo	11
3.1.3. A droga	11
3.1.4. Os meios de cultivo	11
3.1.5. Técnicas de coloração	11
3.2. Métodos	12
3.2.1. Método de inoculação	12
3.2.2. Análise bioquímica	12
3.2.3. Hiperglicemia e distúrbio metabólico	13
3.2.4. Autópsia	13

3.3. Protocolo	13
3.3.1. Modelo experimental	13
3.3.2. Estudo Estatístico	22
4. RESULTADOS	23
5. DISCUSSÃO.....	36
5.1. A aspergilose humana	38
5.2. A aspergilose animal	40
5.2.1. Infecção natural	41
5.2.2. Infecção Experimental	41
5.3. A relação entre o diabete mélico e a infecção por <i>A. niger</i>	45
5.4. O papel da acidose metabólica nos processos infecciosos humanos.....	45
5.4.1. A acidose nas infecções experimentais	46
5.5. A oxalose distrófica adquirida.....	48
6. CONCLUSÕES.....	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

RESUMO

Sessenta camundongos foram inoculados por via venosa com suspensões de 10.000 e 10.000.000 conídios de *Aspergillus niger* por ml e estudados quanto à patogenicidade e caráter acidofílico do fungo. Os animais foram divididos em três grupos: diabéticos e acidóticos; diabéticos exclusivos e controles sadios, através do uso do aloxano, confirmados através da glicemia, glicosúria e cetonúria. Os resultados medidos através do tempo de sobrevivência dos camundongos, concentração do parasitismo fúngico, número de órgãos envolvidos e grau de reação tecidual mostraram dados estatisticamente significativos do *A. niger* com a acidose metabólica, como fator de risco, para aquisição de aspergilose e como fator agravante do prognóstico. O *A. niger* não se mostrou patogênico para os controles sadios nas concentrações referidas.

ABSTRACT

Sixty mice were inoculated by venous way with 10 000 and 10 000 000 conidia suspensions of *Aspergillus niger* per ml, and were studied taking into consideration the pathogenicity and acidophilic character of the fungus. The animals were divided into three groups: diabetics and acidotics, purely diabetics and healthy controls, using aloxane and confirmed by glycemia, glycosuria and ketonuria. The results, measured by the mice survival time, fungi parasitism concentration, number of organs involved and grade of tissue reaction, showed statistically significant results with metabolic acidosis, as a factor of risk, considering the aspergillosis acquisition as a prognostic aggravating factor. *A. niger* has not proved to be pathogenic for the healthy controls in the referred concentrations.

• 1 • INTRODUÇÃO

O termo *Aspergillus* é derivado da semelhança da frutificação vegetativa deste fungo, com o aspersório (do latim *aspergillum*), usado em cerimônias religiosas, para aspergir água benta (* MICHELLI, 1729).

Os fungos do gênero *Aspergillus* estão amplamente distribuídos na natureza, da Antártica ao deserto do Saara, tendo sido encontrados em altas camadas da atmosfera. Com cerca de 600 espécies e variedades (SALFELDER, LISCANO & SUERTEIG, 1990), constituem-se em um dos microrganismos mais comuns do ambiente humano e animal (WAGNER, 1985).

A microformologia dos aspergilos nos cortes histológicos, é de hifas septadas, com ramificação dicotomizada de 45⁰, apresentando ou não vesículas (órgão de frutificação).

Entretanto a identificação das espécies exige o isolamento em meios de cultivo, com a análise de suas peculiaridades morfológicas (RAPER & FENNELL, 1977), destaca-se à seguir a apresentação usual do *A.niger* (Fig. 1)

* MICHELLI, P.A. apud BARDANA, E.J. JR. - The clinical spectrum of aspergilloses. Part I: Epidemiology, pathogenicity, infection in animals and immunology of *Aspergillus*, *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 13: 21-63, 1980.

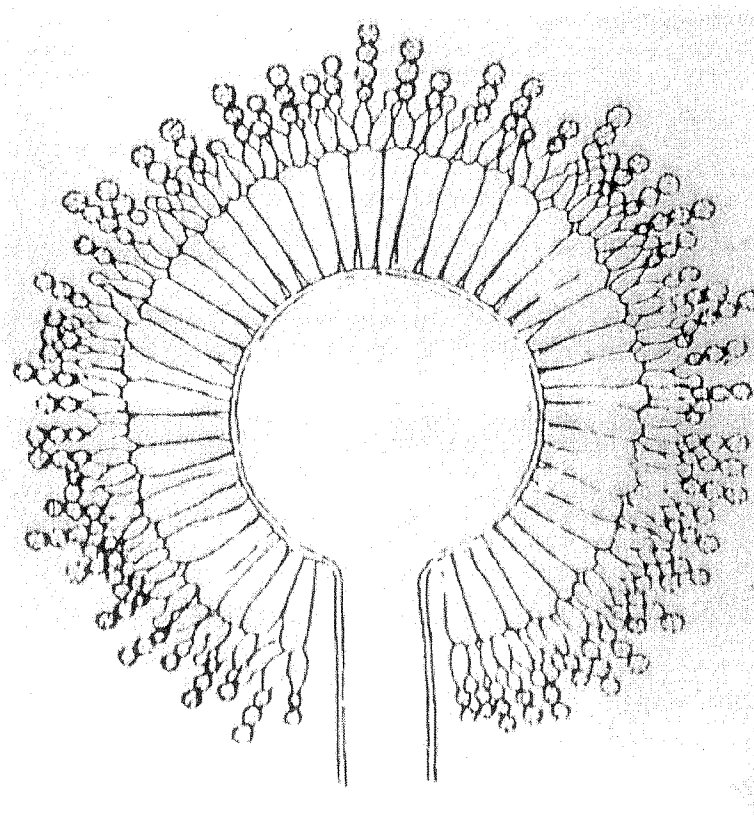


Fig. 1: *A. niger*: Vesícula globosa de até 100 μ m de diâmetro, esteregmos, cerca de duas vezes o comprimento das fiálides (x 500). (AUSTWICK, 1977).

Os conídios aspergiliares encontrados no solo, água e ar atingem concentrações mais elevadas no feno, palha e vegetais em decomposição. Estes fungos são freqüentemente isolados de várias partes do corpo de indivíduos normais e de pacientes sem evidência clínica de aspergilose como: saco conjuntival, garganta e criptas amidalianas, laringe, secreções brônquicas e escarro, fezes, trato vaginal e na superfície cutânea (LANDAU, NEWCOMER & SCHULTZ, 1963). Por outro lado, a aspergilose é referida como infecção nosocomial há duas décadas, como importante causa de morbimortalidade, tendo o centro para controle e prevenção de doenças (C.D.C.) de Atlanta (EUA) verificado aumento de 158% em sua incidência entre 1970 e 1976. A principal fonte de contágio é a dispersão conidial aérea. Surtos epidêmicos têm surgido quando da renovação de unidades hospitalares, ou devido a construções e demolições (ARNOW et al., 1978; OPAL et al., 1986; RAME, 1991).

Um levantamento em 94 países destacou o gênero *Aspergillus*, entre o primeiro e o décimo quinto lugar na incidência de conídio aéreo e frequência de 22% no total das amostras colhidas (BARDANA, 1980, part.1), que quando disseminados pelo ar, permanecem em suspensão resistentes à dissecação sendo facilmente inalados. Outras formas de contágio dependem do crescimento aspergilar em medicações parenterais abertas, circuitos de diálise ou refrigeração, alimentos e em certas drogas como a marijüana (BARDANA, 1980, part. 1).

Após o contágio, os macrófagos constituem a primeira linha de defesa contra os conídios aspergilaes, sejam eles inalados, ingeridos ou inoculados por via venosa. Após a fagocitose, os conídios sofrem lise enzimática no retículo endoplasmático rugoso, impedindo a transformação para a forma miceliana. A exata via bioquímica e o tempo gasto para esta destruição, embora não totalmente esclarecidos, indicam a utilização de mecanismos não oxidativos como peptídeos catiônicos (BETHUNE & MOFFAT, 1933; FORD & FRIEDMAN, 1967; REPENTIGNY et al., 1993). Por outro lado, as hifas têm a capacidade de destruir os macrófagos e invadir as barreiras orgânicas. Nesta fase, a fagocitose é exercida pelos polimorfonucleares e monócitos. A destruição das hifas é feita por mecanismos oxidativos com a liberação da H_2O_2 e pela ação do sistema da mieloperoxidase, utilizando-se ou não vias oxidativas (TURNER et al., 1976; SCHAFFENER et al., 1983; LEMOS & JENSEN, 1985). DE BRACCO, BUDZO & NEGRONI (1976) e STURTEVANT & LATGE (1992) demonstraram que a ligação entre granulócitos e conídios é imediata e dependente da ativação da via alternativa do complemento pela hifa aspergilar.

Raramente os aspergilos podem agir como fungos patogênicos e invadir os tecidos de hospedeiro normal, pois têm capacidade patogênica limitada. Usualmente são fungos oportunistas, capazes de causar infecções muito graves, favorecidos por fatores predisponentes - doenças subjacentes e/ou drogas - ou após serem implantados em tecidos lesados (LONDERO & GUADALUPE-CORTÉS, 1990).

Aspergilose, definida como infecção fúngica causada por espécies de aspergilos, constitui, após a condidose, a mais freqüente micose oportunística

humana (HUTTER & COLLINS, 1962; LONDERO & GUADALUPE-CORTÉS, 1990). O efeito alérgico e tóxico, produzido pelas toxinas dos membros deste gênero, não deve ser considerado como aspergilose (SALFELDER, LISCANO & SAUERTEIG, 1990). A micose pode resultar de colonização, invasão de cavidades pré-formadas ou disseminação sistêmica dos elementos fúngicos (AL-DOORY, 1985). Seu diagnóstico é difícil, devido à falta de especificidade dos sintomas e à necessidade de distinguir entre contaminantes e agentes infectantes nas cepas isoladas em laboratório. O gênero *Aspergillus*, descrito por MICHELLI em 1729, foi caracterizado como agente de aspergilose pulmonar por SLAYTER, em 1947. Contudo, foi VIRCHOW que, em 1856, relatou achados histopatológicos, com tal acuidade, que se tornou possível identificar o primeiro caso da micose ocasionada pelo *Aspergillus fumigatus* (WAGNER, 1985).

Diferentes fatores influem na patogenia da aspergilose (BARDANA, 1980, part. 1): concentração de conídios na atmosfera; tamanho e forma dos conídios; termotolerância; produção de micotoxinas; idade e competência imunológica do hospedeiro; mutabilidade das espécies; grau de alergenicidade e condições atmosféricas, especialmente umidade.

Esquemáticamente, os fatores determinantes do tipo de aspergilose podem ser resumidos em três: tamanho do inóculo fúngico, imunidade do hospedeiro e estrutura anatômica.

Como a aspergilose é fundamentalmente uma doença pulmonar, podemos resumir as formas clínicas em: aspergilose invasiva aguda, aspergilose pulmonar necrosante crônica (APNC), aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA) e colonização intracavitária pulmonar aspergilar (CIPA) e interligá-las em um diagrama de VENN (Fig. 2), conforme o proposto por PENNINGTON (1980) e modificado por SEVERO (1993). Como vimos, a apresentação clínica da aspergilose depende mais do hospedeiro do que do fungo, nos pacientes imunodeprimidos, as hifas atuam como agente infectante, e o grau de invasão dependerá da imunodepressão. Pacientes gravemente imunodeprimidos (neutropênicos) apresentarão aspergilose invasiva

aguda. Se a imunodepressão for leve (corticoterapia), a invasão fúngica será limitada, ocasionando a aspergilose semi-invasiva ou aspergilose pulmonar necrosante crônica (BINDER et al., 1982). Pacientes com hipersensibilidade (asma brônquica) terão crises de dispnéia desencadeadas pela presença de elementos fúngicos na árvore brônquica, caracterizando a aspergilose broncopulmonar alérgica. Nos pacientes com subversão da arquitetura normal dos pulmões, que dificultem a fagocitose, presentes na cavidade de tuberculose saneada, bolha de enfisema, pneumatocele, abscesso pulmonar, bronquiectasia, pneumonia, granuloma eosinofílico, histoplasmosse, sarcoidose, fibrose actínica ou pulmonar idiopática, dentre outras, os conídios germinam e produzirão hifas que em contínuo crescimento e devido às dificuldades de drenagem brônquica ocasionarão a colonização intracavitária pulmonar aspergilar (bola fúngica).

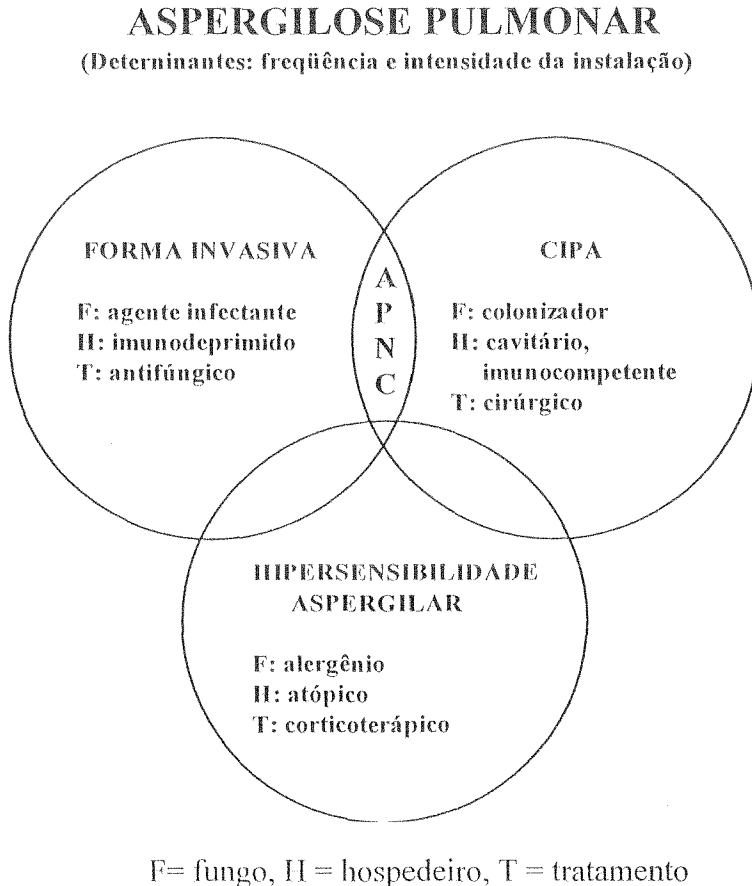


Fig. 2 - Espectro clínico da aspergilose, de PENNINGTON (1980), modificado por SEVERO (1993).

Outras patologias pulmonares relacionadas aos aspergilos referem-se à situações clínicas de menor prevalência como:

- Alveolite alérgica extrínseca (AAE), provocada pela inoculação repetida ou maciça em indivíduos não atópicos (BARDANA, 1980, part.2 ; BODEY & VARTIVARIAN, 1989);
- Aspergilose broncopulmonar saprofítica: dependente da colonização da árvore traqueobrônquica, sem causar lesão tecidual em portadores de fibrose cística, doença pulmonar obstrutiva crônica e asma brônquica (BARDANA, 1980, part. 2;BODEY & VARTIVARIAN, 1989);
- Aspergilose pulmonar primária (APP): pouco freqüente e caracterizada por reação granulomatosa supurativa sem invasão vascular pelo fungo em paciente imunocompetente. Distingue-se da APNC, onde há reação piogênica aguda, necrose e invasão vascular (BINDER, et al., 1982; BROWN, et al., 1988);
- Traqueobronquite necrosante por *Aspergillus* (TNA): com envolvimento da árvore traqueobrônquica sem invasão do parênquima circunjacente em indivíduos imunodeprimidos (LONDERO & GUADALUPE-CORTÉS, 1990);

Os principais agentes etiológicos da aspergilose humana e animal são *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger* (TOIGO, 1959; BATHIA & MOHAPTRA, 1969, part.1 e 2; PEÑA, 1971; SINSKI, 1985).

A termotolerância fúngica guarda estreita relação com patogenicidade, o que poderá explicar o predomínio do *A. fumigatus* em relação ao *A. flavus* e ao *A. niger* (Tabela 1). Da mesma forma, o menor diâmetro conidial facilitaria a propagação e inalação do *A. fumigatus*. Comparativamente, o *A. niger* tem conídio com maior diâmetro e ponte interconidiana mais firme, o que dificulta a dispersão; este fungo, quando nos tecidos dos hospedeiros, é prontamente fagocitado, ocasionando menor dano tecidual do que *A. fumigatus* e *A. flavus* (BHATIA & MOHAPATRA, 1969, part.1 e 2). Estas características tornam o *A. niger* menos patogênico (CHANDLER, 1981; SINSKI, 1985).

Tabela 1 - Termotolerância e diâmetro conidial de grupos de *Aspergillus*

Grupo	Temperatura máxima (°C)	Diâmetro do conídio (µm)
<i>A. fumigatus</i>	50 - 52	3,0
<i>A. niger</i>	44	6-7
<i>A. flavus</i>	42	5-6

(Dados retirados de SCHOLER, 1974)

Com relação às características patológicas desta espécie, SEVERO (1987), em estudo caso-controle, compara variáveis clínicas e laboratoriais entre *A. fumigatus* (controle) e *A. niger* (casos), mostrando associação estatisticamente significativa com o *A. niger* para diabetes mellitus (Razão de chances = 10,67; $p < 0,001$). A hipótese gerada nesta tese foi a de que a relação do *A. niger* com diabetes fosse devido à tendência à acidose que ocorre nestes pacientes, uma vez que o *A. niger* é fungo acidofílico (ABDEL-RAHIM & ARBAB, 1985), conforme mostra a figura três.

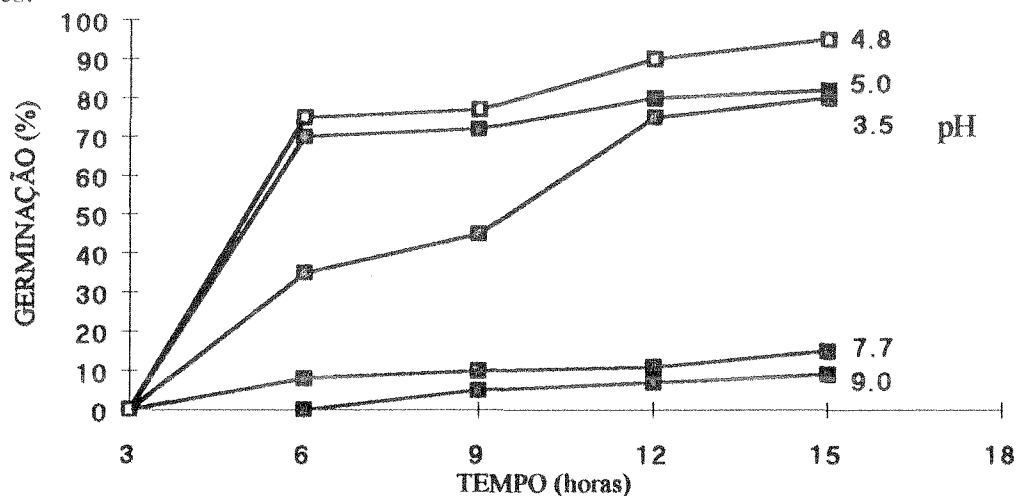


Figura 3 : Efeito do potencial hidrogênio (pH) na germinação do *A. niger*.
Dados retirados de ABDEL-RAHIM e ARBAB (1985).

Comparar a acidose metabólica e a hiperglicemia como fatores de risco para a aspergilose por **A. niger**, através de modelo experimental, utilizando camundongos infectados por via venosa, justifica este trabalho.

• 2 • OBJETIVOS

2.1 - Geral

2.1.1 - Testar a patogenicidade do *A. niger* em camudongos normais, diabéticos e com acidose metabólica, infectados por via venosa.

2.2 - Específicos

2.2.1 - Verificar a importância da acidose metabólica na aquisição e prognóstico da infecção pelo *A. niger*, em comparação com a hiperglicemia;

2.2.2 - Descrever o padrão histopatológico produzido pelo *A. niger*;

2.2.3 - Verificar as células envolvidas na reação tecidual e a produção de cristais de oxalato de cálcio na aspergilose invasiva experimental;

2.2.4 - Verificar a sensibilidade do cultivo no diagnóstico da aspergilose, com relação à coloração pela prata, considerada o padrão áureo;

2.2.5 - Revisar a oxalose distrófica produzida pelo *A. niger*.

MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Material

3.1.1 - Os animais

Utilizaram-se camundongos machos, brancos, de 4 a 6 semanas de vida, com peso entre 15 e 20 gramas, recém-desmamados, pertencentes à linhagem genética CF1 e fornecidos pelo biotério do Instituto de Pesquisas Biológicas, SSMA, RS. Os animais foram alimentados com água e ração padrão *ad libitum*. Eram mantidos quatro por gaiola até o final do experimento, diariamente limpas com troca da ração e da água. (Fig. 4).



Fig. 4: Camundongos utilizados no projeto.

3.1.2 - O fungo

O *A. niger* foi fornecido pelo Dr. A. A. Padhye, (Center for Disease Control and prevention, Atlanta, GA, EUA), cepa sabidamente de alto poder patogênico (CDC B-5202). Inoculado sob a forma de suspensão conidial, produzida através da semeadura do fungo em placa de Petri contendo meio de Sabouraud glicose a 2% ágar e incubado a 35°C por 3 a 7 dias até a completa conidiogênese. Os conídios foram resuspenso em tubos contendo 20 ml de solução salina/tween 80 estéril, homogeneizados em vórtex e filtrados através de lã de vidro estéril. Em seguida, centrifugou-se a solução a 5.000 rpm / 5 minutos, e os conídios resuspenso em 5 ml de salina/tween 80 estéril. As suspensões foram quantificadas em câmara de Neubauer, estabelecendo valores de 10.000 e 100.000 conídios por ml.

3.1.3 - A droga

O monohidrato de aloxano a 3% (Sigma) foi utilizado na dose de 100 mg/kg de peso. A solução preparada imediatamente antes da injeção venosa foi diluída em salina estéril a 0,9%, utilizando 0.1ml da solução. O placebo constituiu -se de 0,1 ml de cloreto de sódio à 0,09.

3.1.4 - Os meios de cultivo

Os fragmentos de tecidos foram cultivados em meios de Sabouraud glicose 2% ágar com cloranfenicol (Scl), e incubados à temperatura de 35°C, até a completa germinação, quando as colônias fúngicas tomaram a cor negra característica.

3.1.5 - Técnicas de coloração

Processou-se o exame microscópico do material de autópsia no setor de patologia da Fundação Faculdade de Ciências Médicas de Porto Alegre (FFCMPA). Os fragmentos de tecido foram embebidos em formol a 10% e incubados em parafina. Fizeram-se cortes de 4 mm de espessura em micrótomo, e corados pela prata (GROCOTT, 1955), para visualização dos elementos fúngicos, e pela hematoxilina e eosina (H&E) para análise da reação tecidual.

3.2 - MÉTODOS

3.2.1 - Método de inoculação

Anestesiaram-se os animais com éter por 60 segundos, sendo em seguida contidos e submetidos à leve pressão craniana. Quando da protusão do globo ocular, foram inoculados no saco venoso conjuntival, conforme técnica de LÉPINE, CADILLON & CHAUMONT (1964), (Fig. 5).

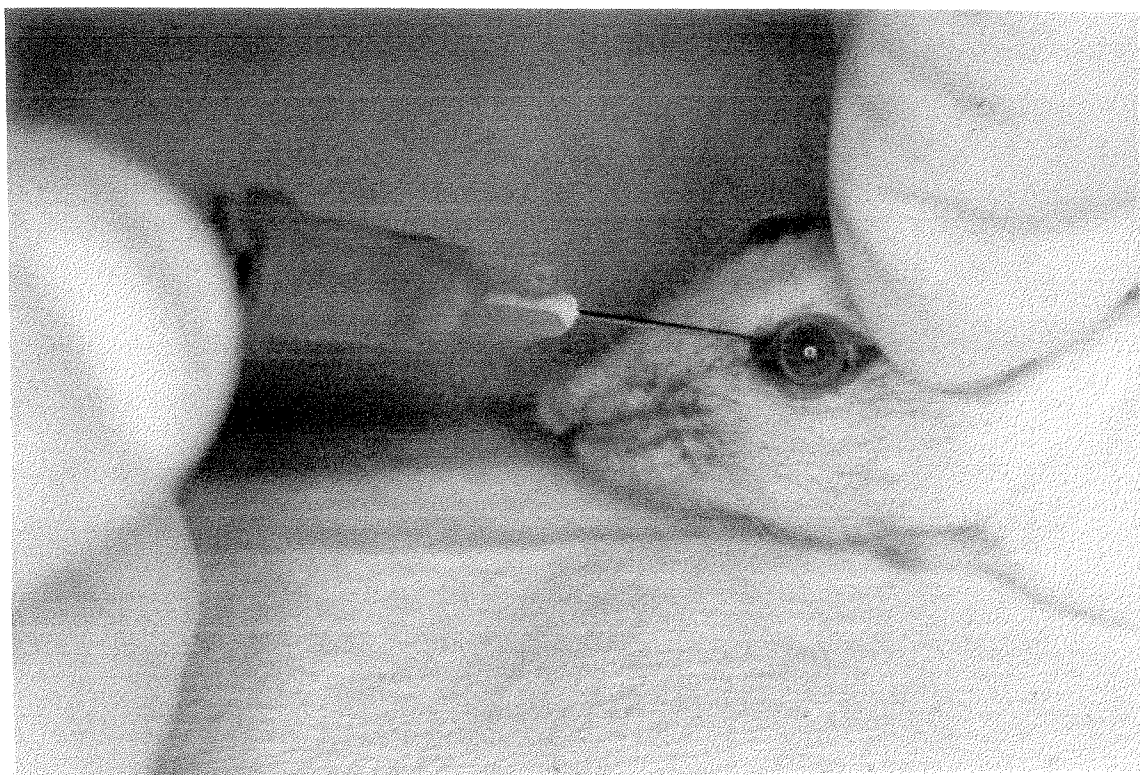


Fig. 5: Técnica de inoculação venosa, utilizada nos camundongos.

3.2.2 - Análise bioquímica

As medidas de glicemia foram feitas através de uma gota de sangue da veia da cauda do camundongo, colhida por puntura com agulha de insulina e lidas diariamente 48 horas após a inoculação do aloxano, em fita de glicemia capilar (Glucostix, Bayer), através de leitura óptica com o Glucometer II, para fitas de Glucostix.

Glicosúria e cetonúria também foram verificadas diariamente por fita reagente em contato com uma gota de urina e analisadas por leitura visual com comparação colorimétrica, conforme instruções do fabricante (Keto-diastix, Bayer).

3.2.3 - Hiperglicemia e distúrbio metabólico

Provocou-se o diabete mérito com o uso de aloxano, conforme método descrito por WAISBREN (1948). Foram considerados diabéticos os animais com glicemia igual ou superior a 300mg % e/ou glicosúria de três ou mais cruces, presentes 48 horas após o uso da droga e que assim se mantivessem até o óbito ou o momento do sacrifício.

Obteve-se a associação de hiperglicemia e acidose metabólica com a utilização do aloxano, conforme descrito por LUKENS (1948).

3.2.4 - Autópsia

A autópsia foi praticada no momento do óbito dos animais. Os que permanecessem vivos até 22 dias após a inoculação da suspensão conidial eram sacrificados, utilizando-se chumaço de algodão embebido em éter dentro de uma campânula.

Realizou-se a autópsia de forma asséptica. Cada camudongo morto era lavado com uma solução de álcool-iodado por toda a carcaça. Após, era fixado, expondo-se sua superfície ventral e submetendo-o à incisão mediana, com a retirada do fígado, pulmões e rins, sempre nesta seqüência.

3.3 - PROTOCOLO

3.3.1 - Modelo experimental

Realizou-se estudo prospectivo, caso-controle, constituído por três grupos de animais:

- Grupo 1: portadores de hiperglicemia associada à acidose metabólica;
- Grupo 2: portadores exclusivamente de hiperglicemia;
- Grupo 3: controles sadios.

Dividiu-se o estudo em duas etapas, testando as concentrações fúngicas de 10.000 e 1.000.000 conídios por mililitro, respectivamente. Nos dois módulos, foram infectados animais dos três grupos.

Inicialmente criou-se o estado de hiperglicemia pura ou associada à acidose metabólica, através da inoculação de 0,1ml da solução de aloxano a 3% no saco venoso conjuntival nos animais dos grupos 1 e 2, e de placebo nos controles. O trabalho foi realizado utilizando-se 2 animais em cada grupo simultaneamente.

Nos camudongos em observação, 48 horas após a injeção do aloxano ou placebo, mediu-se diariamente a glicemia, sendo excluídos os animais que morreram nas primeiras 72 horas após inoculação da droga e os que não atingiram glicemias iguais ou maiores que 300mg%.

A seguir, inoculou-se por via venosa a suspensão conidial do *A.niger*, realizada dois dias após o uso do aloxano nos camudongos do Grupo 1 (hiperglicemia e acidose metabólica) e após 7 dias de utilizado o aloxano, nos animais do Grupo 2, (hiperglicemia), respectivamente. Os controles foram infectados com a suspensão fúngica de forma pareada a cada animal dos Grupos 1 e 2. Inicialmente utilizaram-se suspensões de 10.000 conídios/ml e posteriormente a suspensão de 1000.000 conídios/ml.

Após a inoculação conidial, os animais eram avaliados diariamente. A autópsia foi realizada em até 12 horas após a morte espontânea dos camudongos, sendo retirados o fígado, pulmões e rins. Parte do material era cultivado em Scl e incubado a 35°C, com o restante embebido em formol à 10% para análise histopatológica. Após a inoculação conidial, eram sacrificados os camudongos vivos no vigésimo segundo dia, sendo submetidos à autópsia conforme os parâmetros anteriores. Os meios de cultivo eram desprezados na terceira semana quando negativos para *A. niger*.

O estudo microscópico foi preparado, inicialmente, com a coloração pela prata, utilizando-se três cortes seriados, por órgão estudado, e posteriormente um corte corado pelo H&E, nos casos em que se identificou o *A. niger*, para a análise da reação tecidual. A avaliação das lâminas coradas pela prata foi feita por dois observadores independentes, cegos quanto ao grupo. A descrição histológica foi realizada por um patologista cego quanto ao grupo, e o resultado da concentração fúngica observada na coloração pela prata.

Os resultados finais foram medidos através de quatro parâmetros básicos:

3.3.1.1 - Tempo de sobrevivência dos animais

Contado a partir do dia da inoculação dos conídios aspergiliares até o momento do óbito ou sacrifício.

3.3.1.2 - Órgãos envolvidos

Medidos pela identificação de pelo menos uma hifa e/ou conídio do *A. niger* nas lâminas coradas pela prata (Fig. 6 e 7).

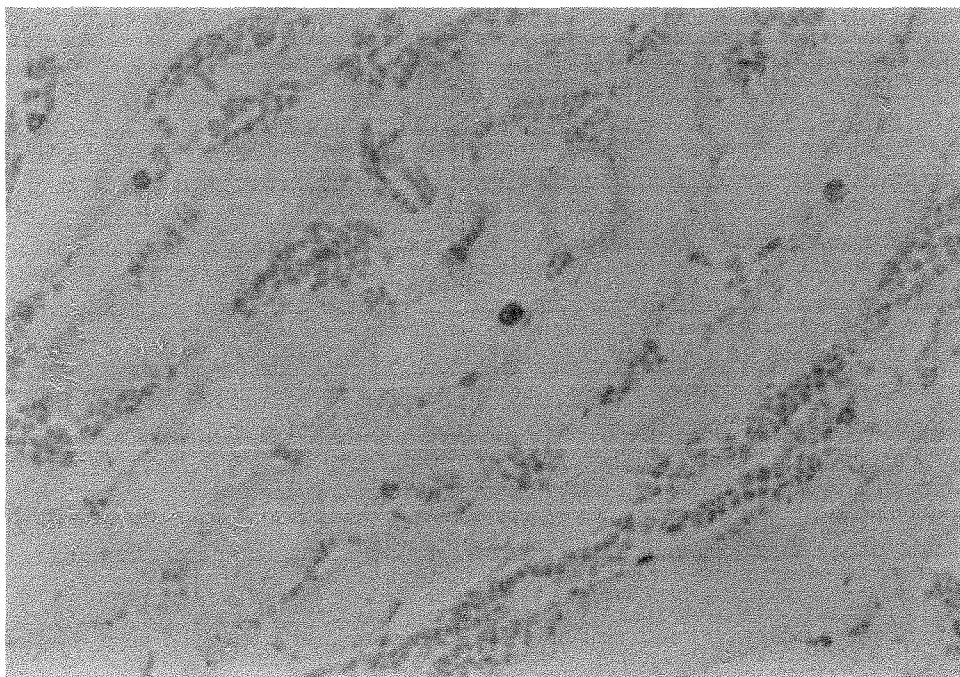


Fig.6 : Discreta presença dos conídios aspergiliares em parênquima hepático (Grocott; x 500).

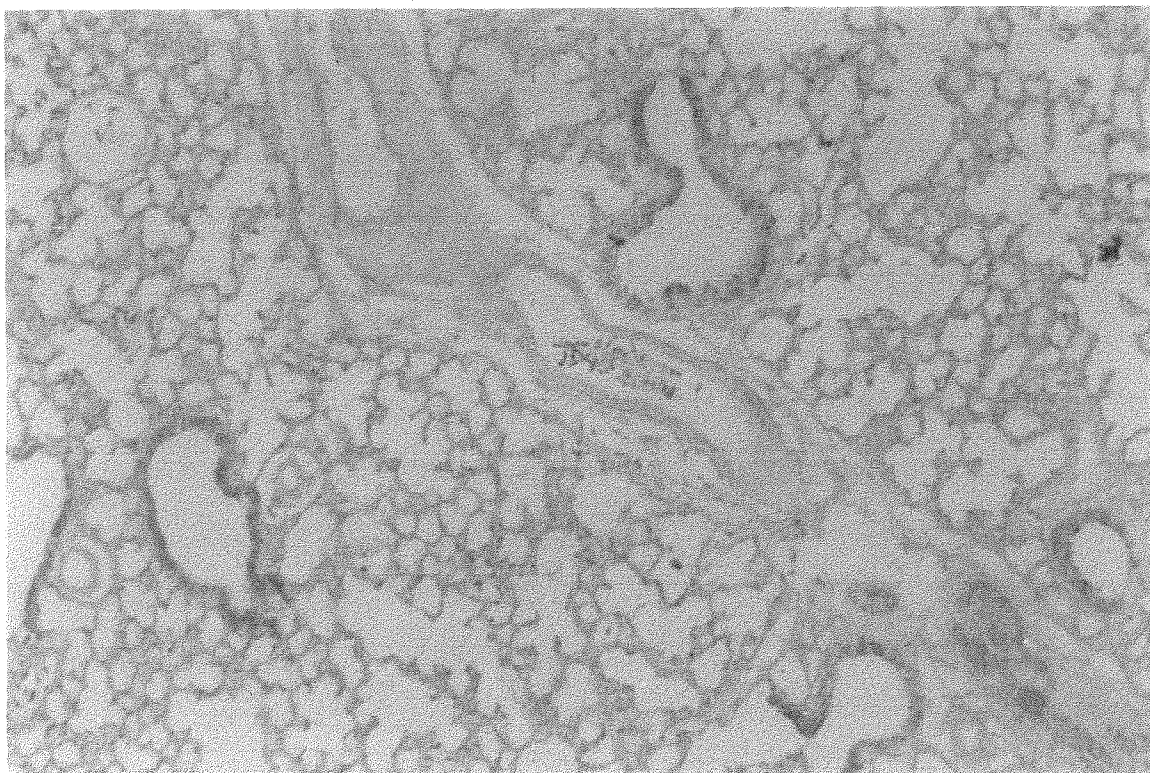


Fig. 7: Hifa do *A. niger* em parênquima pulmonar de animal do grupo 1, diabete e acidose. (Grocott ; x 400).

3.3.1.3 - Reação tecidual

Avaliada quando da microscopia de lâminas coradas pelo H&E, observadas em pequeno aumento (x100), através da seguinte convenção.

3.3.1.3.1 - Ausente:

Quando não foi detectado a presença de infiltrado inflamatório na superfície de corte do órgão, corado pela H&E, avaliado em campo de pequeno aumento (x100).

3.3.1.3.2 - Leve

O infiltrado celular composto por no máximo 30 granulócitos por campo de menor aumento analisado (Fig. 8).

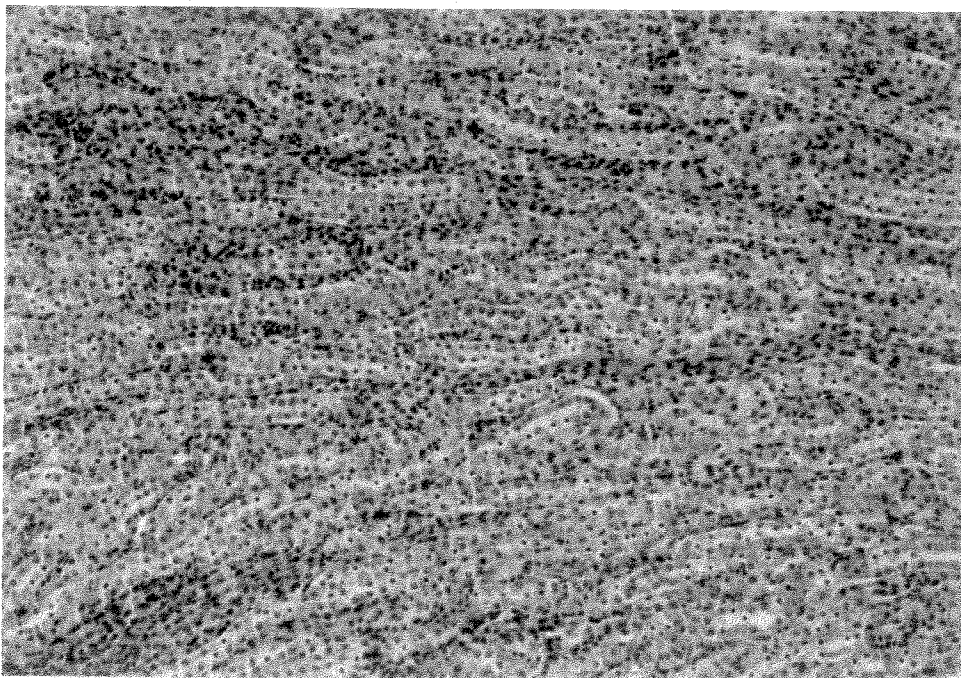


Fig. 8: Padrão do exsudato inflamatório leve, em parênquima renal (H& E ; x 100).

3.3.1.3.3 - Moderada

Infiltrado de 31 a 60 células por campo de menor aumento examinado (Fig. 9).



Fig. 9: Padrão do exsudato inflamatório moderado em parênquima renal (H& E ; x 100).

3.3.1.3.4 - Intensa

Infiltrado celular superior a 60 células por campo de menor aumento estudado (Fig.10).

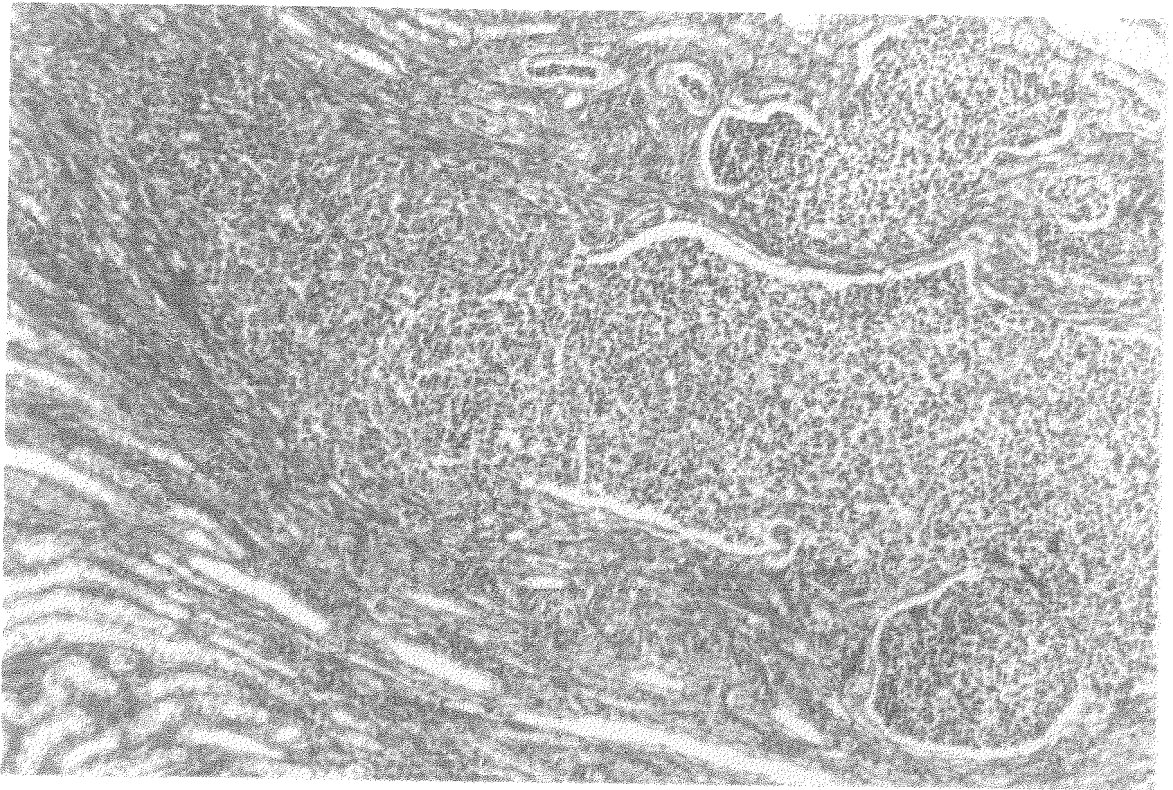


Fig. 10: Intenso infiltrado celular em pelve renal (H&E ; x 100).

3.3.1.4- Parasitismo fúngico

Concentração de hifas e/ou conídios nos tecidos em lâminas coradas pela prata, em pequeno aumento (x 100) foi medida através da seguinte padronização:

3.3.1.4.1 - Ausente

Quando não foi identificada ao menos uma hifa e/ou conídio nos três cortes.

3.3.1.4.2 - Leve

Focos esparsos, isolados, de hifas ou conídios, ocupando menos de 25% da superfície de corte (Fig. 11).

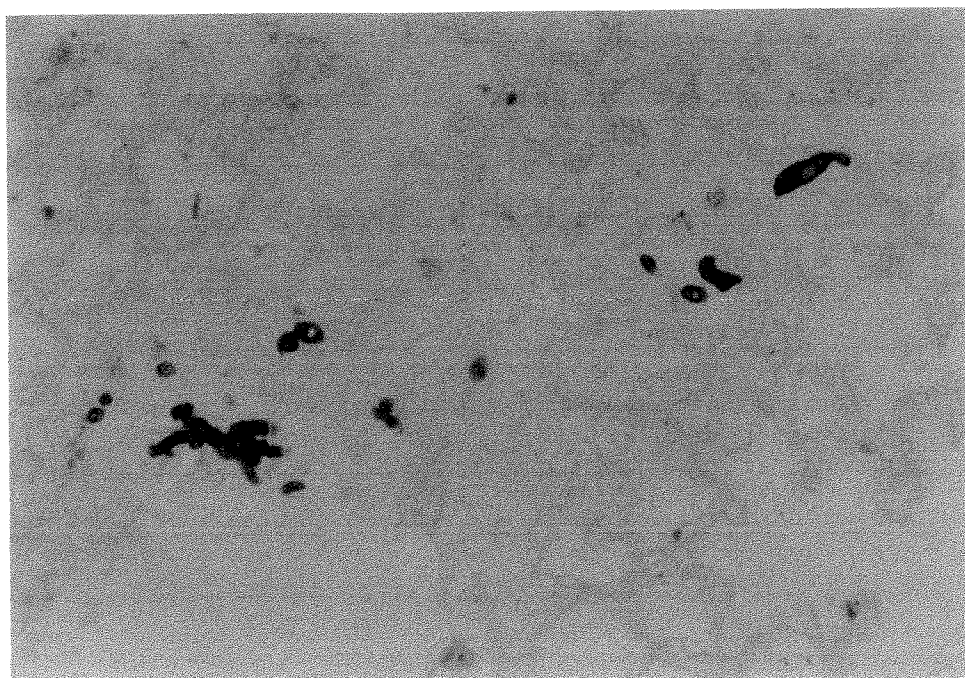


Fig. 11: Parasitismo fúngico na superfície renal de leve intensidade (Grocott ; x 100).

3.3.1.4.3 - Moderada

Distribuição difusa, ocupando pelo menos 25% da superfície de corte (Fig. 12).

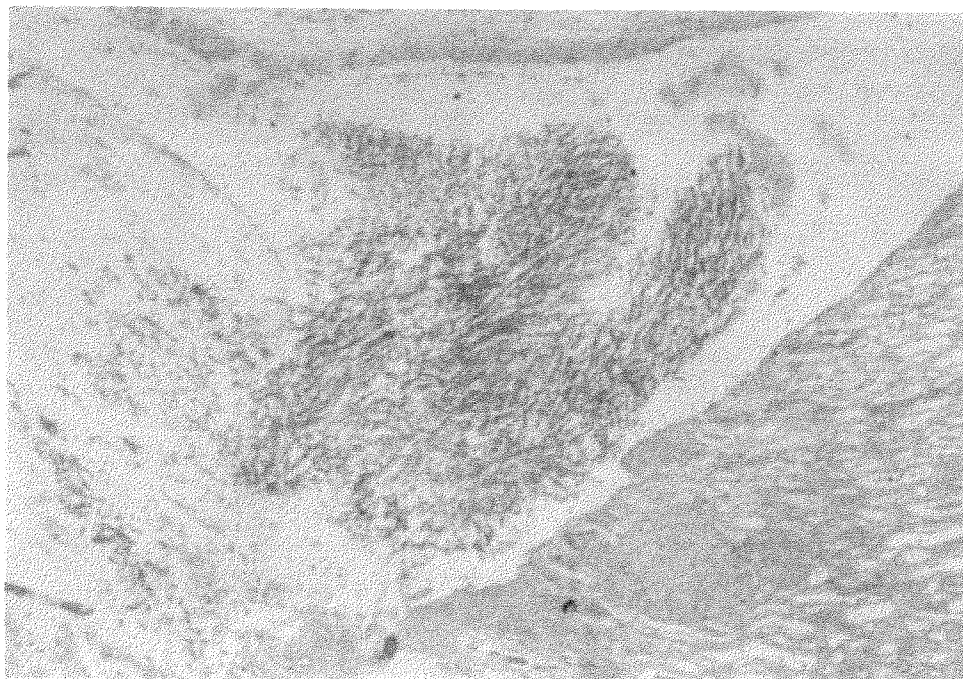


Fig 12: Moderada concentração de *A. niger* em parênquima renal (Grocott ; x 100).

3.3.1.4.4 - Intensa

Hifas, ou conídios, presentes em mais de 25% da superfície de corte (Fig. 13)

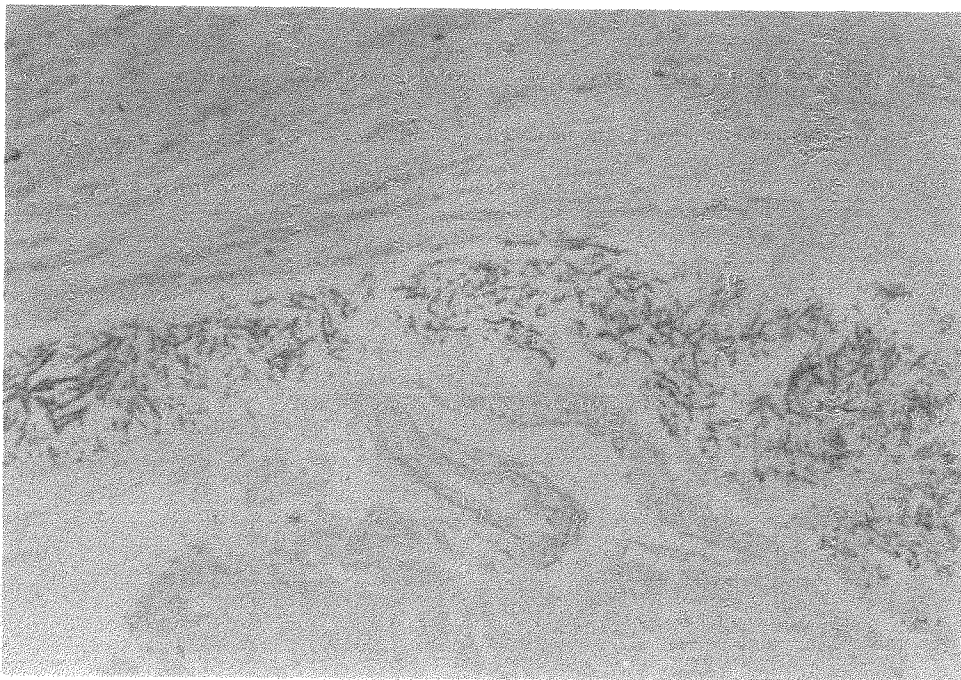


Fig. 13: Intensa concentração de *A. niger* a nível renal pelos padrões estabelecidos (Grocott ; x 100).

3.3.1.5 - Tipo de reação tecidual

Nos casos em que havia infiltrado celular, a reação foi dividida em dois grupos:

3.3.1.5.1 - Focal

Infiltrado celular limitado a uma região do órgão, comumente próximo à presença do *A. niger* (Fig. 14).

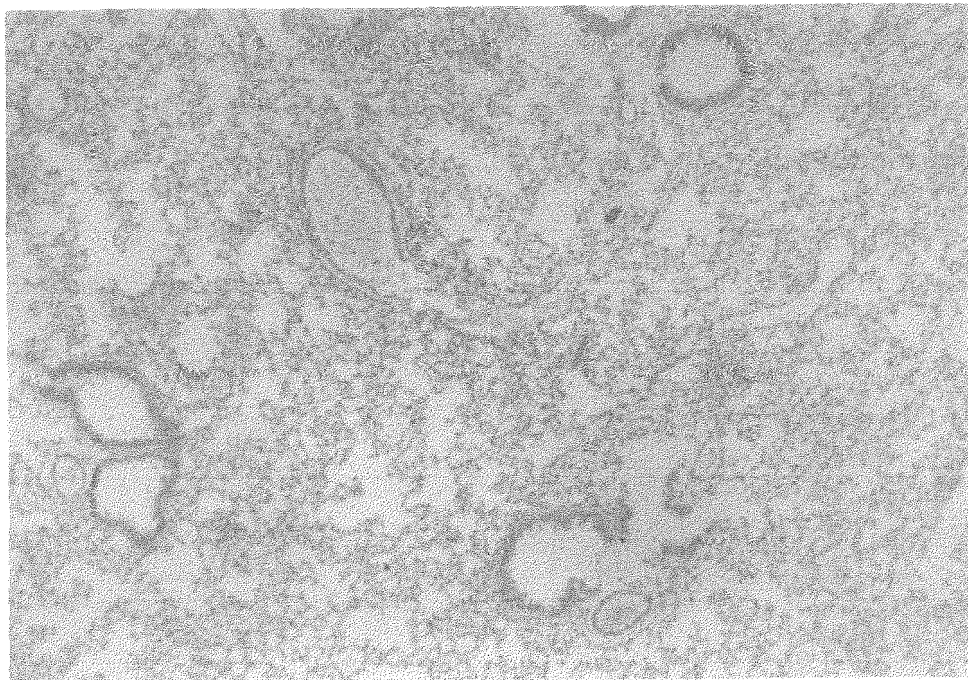


Fig. 14: Exsudato inflamatório focal no interstício pulmonar (H&E ; x 100).

3.3.1.5.2 - Difusa

Infiltrado celular estendendo-se por toda a superfície de corte, independente do local em que se identificava o **A. niger** (Fig. 15).

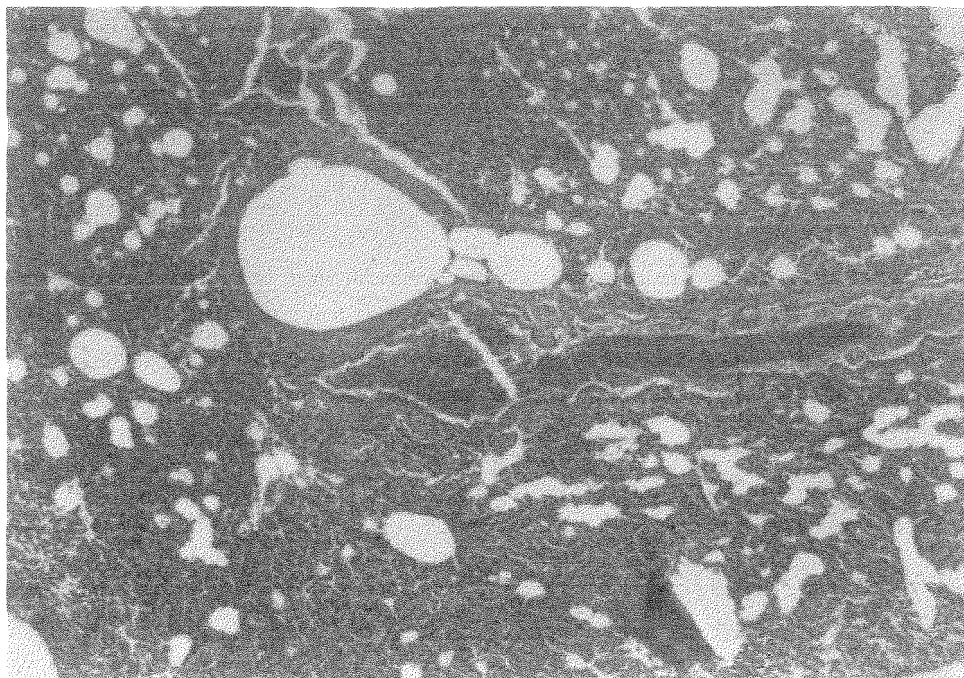


Fig. 15: Exsudato celular estendendo-se em toda a superfície pulmonar (H&E ; x 100).

3.3.2 - Estudo estatístico

Dentre as três lâminas analisadas para cada órgão, as variáveis quantitativas foram transformadas em qualitativas, para fins estatísticos, como se segue: ausente = 0; leve = 1; moderada = 2; intensa = 3.

O erro alfa foi estabelecido em 5%, e para análise estatística utilizou-se o Special Package for Social Sciences (SPSS), com os testes não-paramétricos de Krustal-Wallis na comparação dos 3 grupos em estudo, Mann-Whitney U - Wilcoxon para análise de amostras pareadas, independentes, e o coeficiente de correlação de Spearman (SIEGEL, 1979; LEE, 1980). As variáveis em estudo foram agrupadas em banco de dados do programa Epi Info, Computador Pessoal (PC) - 486.

• 4 •

RESULTADOS

A amostra analisada constou de 60 animais, distribuídos com 19 camundongos no Grupo 1 (Diabete mérito associada à acidose metabólica), 20 no Grupo 2 (Diabete mérito) e 21 controles sadios.

O tempo de sobrevivida foi significativamente diferente entre os três grupos (28, 31 de graus de liberdade e $p = 0,001$) (Tabela 2). A análise pareada dos grupos mostrou diferença significativa entre os grupos de animais com diabete e acidose, em comparação com os diabéticos, e os controles ($p = 0,0002$).

Entretanto não houve diferença no tempo de sobrevivida entre os controles e os camundongos com diabete mérito sem acidose ($p = 0,054$).

Tabela 2: Tempo médio de sobrevivida dos camundongos.

	<u>Grupo1</u>	<u>Grupo2</u>	<u>Grupo 3</u>
Tempo (dias)	Diabete + Acidose	Diabete	Controle
Mínimo	3,00	4,00	4,00
Médio	4,47	12,09	17,19
Máximo	7,00	22,00	22,00

A distribuição da sobrevivida ao longo do tempo é analisada na figura dezesseis, que mostra a maior sobrevivência acumulada para o Grupo 3 (Controle), seguida do Grupo 2 (Hiperglicemia) e finalmente pelo Grupo 1 (Diabete mérito associada à acidose). No quinto dia do experimento, apenas 38% dos camundongos com acidose estavam vivos, ao lado de 90% dos controles e 95% dos diabéticos. Todos os animais da amostra permaneceram vivos até o terceiro dia do experimento.

O platô desta tábua de sobrevivência ocorreu em torno do 15º dia do experimento para os animais com diabetes e os controles, quando não mais se observava queda acentuada nas curvas de sobrevivência, nestes dois grupos.

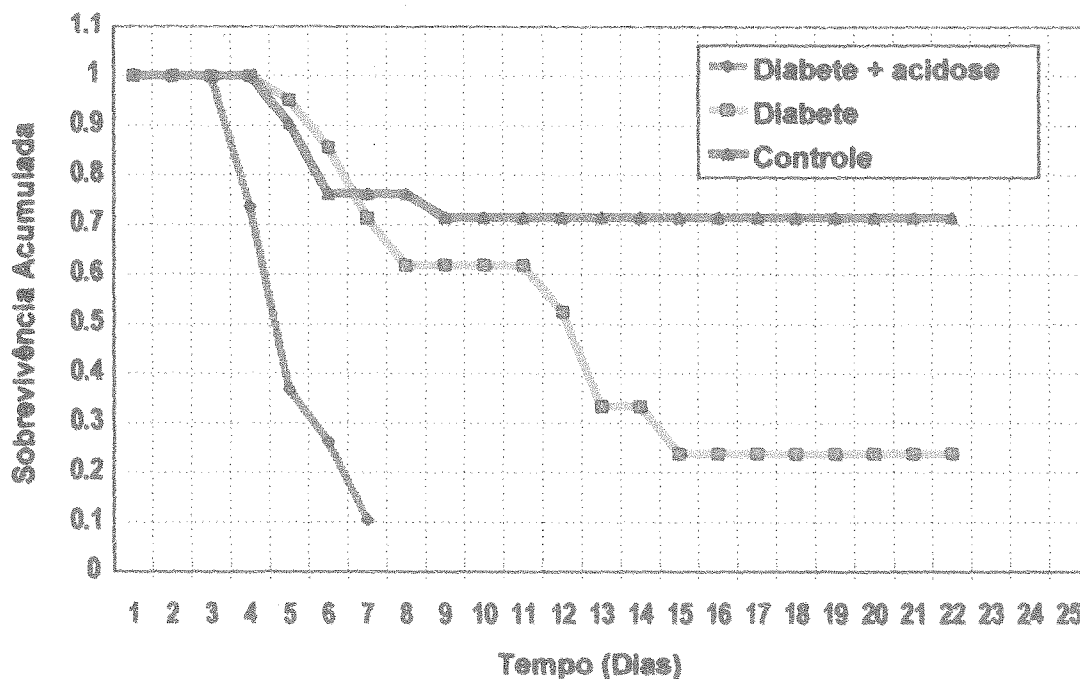


Fig. 16 - Função sobrevivência ($p < 0,01$).

A figura dezessete demonstra a dispersão da sobrevivência dos camundongos no transcorrer do experimento. A maior concentração da sobrevivência em torno da mediana (quarto dia) ocorreu no grupo 1 (diabetes e acidose) o grupo mais homogêneo, onde podemos observar amplitude interquartílica de apenas 3 dias. Seguido pelo grupo dos diabéticos, com mediana concentrada no décimo segundo dia e amplitude entre os quartis 25% e 75% de 12 dias. A maior taxa de dispersão é observada nos controles, cuja diferença do número dos animais vivos entre o início e o final do estudo foi de 15, 5 dias, com mediana de vinte e dois dias.

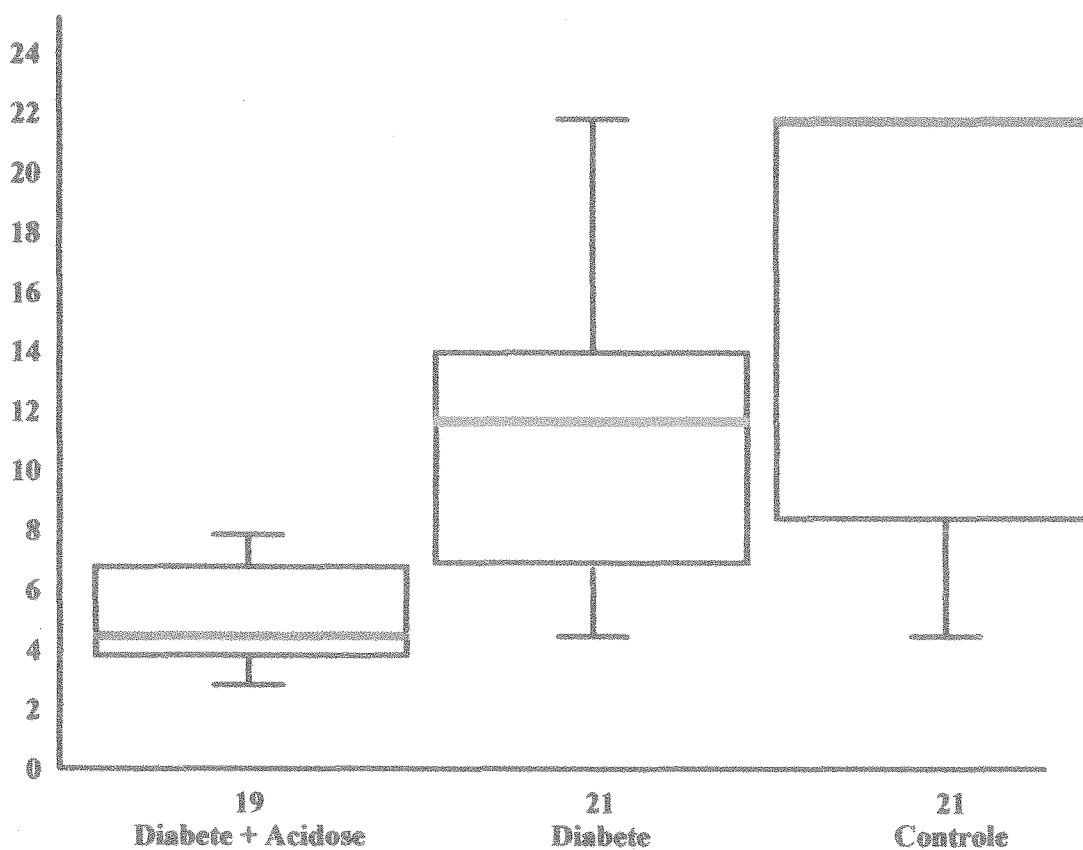


Fig.17: Taxa de dispersão de sobrevivência dos animais.

Na figura dezoito é analisada a função risco em cada grupo, avaliando o risco de um camundongo morrer em determinado dia do experimento, dado que viveu até o dia anterior. A maior curva ascendente é demonstrada nos animais com diabetes e acidose. O risco de morte nesse grupo, no sétimo dia, foi de 90%, dado que viveu até o sexto dia. Analisando o grupo 2 (Diabéticos) neste mesmo período, a chance de morte no sétimo dia foi de 15%, e os controles tiveram risco zero de morte no sétimo dia, uma vez que tinham vivido até o sexto dia.

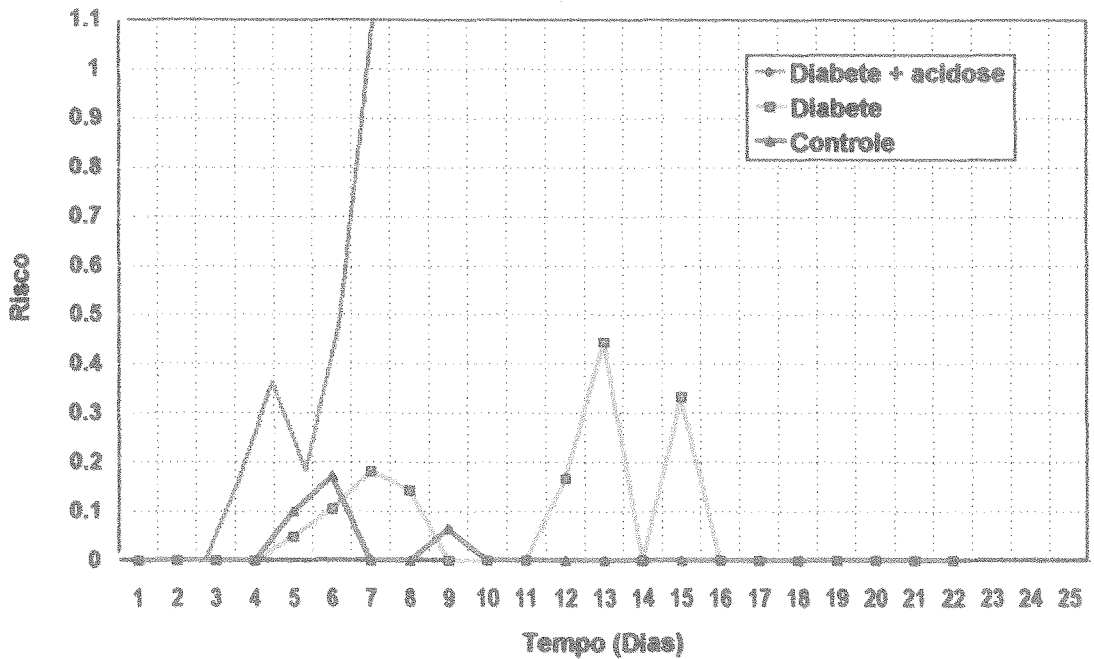


Fig 18: Função Risco ($p < 0,01$).

Quanto ao número de órgãos infectados pelo *A. niger*, não houve diferença estatisticamente significativa entre os portadores de acidose e hiperglicemia (25 órgãos envolvidos), quando comparados aos portadores de hiperglicemia (24 órgãos). Os controles com um total de 3 órgãos infectados tiveram diferença significativa entre os dois grupos anteriores ($p = 0,0002$).

A análise da concentração de hifas mostrou que os animais portadores de acidose e diabete apresentaram maior número de hifas nos tecidos, evidenciando a maior germinação conidial neste grupo, gradação de 22,63 no teste de Wilcoxon. Não houve, entretanto, diferença com relação ao grupo 2 (diabete), $p = 0,203$, apesar da menor quantidade de elementos fúngicos (18,57). Nos controles houve diferença estatística entre os grupos anteriores com um $p = 0,0002$ em relação aos diabéticos e acidóticos e para os diabéticos sem o distúrbio metabólico.

O coeficiente de correlação de Spearman, aplicado na comparação dos resultados obtidos entre os três grupos em estudo, resultou em valores negativos de -56% com relação inversa entre a concentração de hifas nos tecidos e o tempo de

sobrevida alcançado pelos animais, independente da magnitude do inóculo de *A. niger* utilizada ($p=0,0002$), veja tabela três.

Tabela 3: Correlação entre tempo de sobrevida e número de hifas presentes nos tecidos.

Grupos	Coefficiente Spearman	p
Controles	- 2,8%	0,9
Diabete mérito e acidose	- 38%	0,048
Diabete mérito	- 69%	0,0002

Na análise individual de cada grupo, verifica-se que nos controles não existe correlação significativa entre o tempo de sobrevida alcançado pelos animais e a intensidade de elementos fúngicos nos tecidos ($p = 0,9$), refletindo a ausência do potencial patogênico do *A. niger* para camundongos saudáveis. Entretanto, nos outros dois grupos do estudo, o coeficiente de correlação foi estatisticamente significativo ($p=0,048$ e $p=0,002$), demonstrando que a sobrevida é inversamente proporcional ao número de hifas presentes nos tecidos, sugerindo a ausência de correlação entre o distúrbio glicêmico ou metabólico induzido nestes animais e o tempo de sobrevida por eles alcançado.

A intensidade da reação tecidual aos elementos fúngicos aspergiliares é descrita nas tabelas quatro e cinco

Tabela 4: Graduação da reação tecidual à concentração de 10^6 conídios fúngicos.

Reação Tecidual	Grupo 1 (Hiperglicemia + acidose metabólica)	Grupo 2 (Hiperglicemia)	Grupo 3 (Controle)
Ausente	46%	14%	-
Leve	40%	21%	100%
Moderada	6%	28%	-
Intensa	6%	35%	-

Tabela 5: Graduação da reação tecidual à concentração de 10^4 conídios fúngicos.

Reação Tecidual	Grupo 1 (Hiperglicemia + acidose metabólica)	Grupo 2 (Hiperglicemia)	Grupo 3 (Controle)
Ausente	90%	50%	-
Leve	-	20%	-
Moderada	-	20%	-
Intensa	10%	10%	100%

Houve diferença estatisticamente significativa quanto ao grau de reação tecidual aos elementos fúngicos entre os grupos de camundongos diabéticos e acidóticos, quando comparados aos portadores de hiperglicemia ($p = 0,03$); intensidade da reação de 17 para os primeiros e 24 nos últimos (no teste de Wilcoxon). O mesmo ocorreu entre diabéticos sem o distúrbio metabólico e controles, com maior intensidade de reação tecidual para os primeiros, graduação de 27 e 16, respectivamente, na análise pareada ($p = 0,0005$). Por outro lado, não houve diferença na intensidade de reação tecidual quando comparados os diabéticos acidóticos e os controles ($p = 0,2$), embora existisse maior grau de reação no grupo de acidóticos, 22 pontos versus 18 dos controles. A figura dezenove mostra a relação direta entre a concentração de *A. niger* no tecido e a intensidade do exsudato inflamatório presente no grupo dos controles e dos diabéticos sem acidose metabólica.

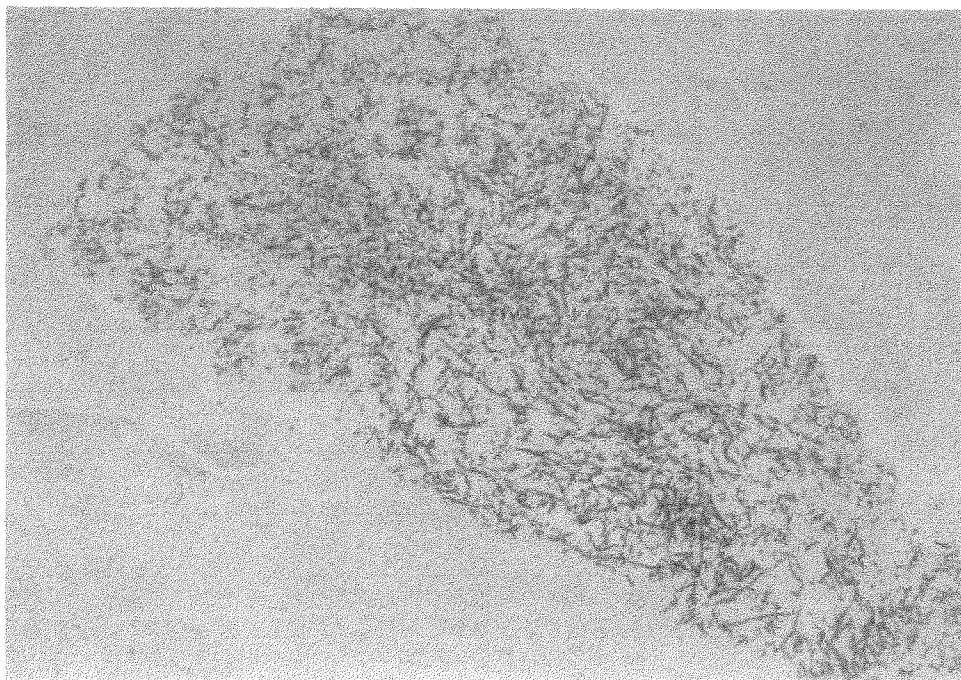


Fig. 19 (A): Intenso parasitismo fúngico, predominante na pelve renal, em camundongo do grupo 3 (controle). Grocott (x100).

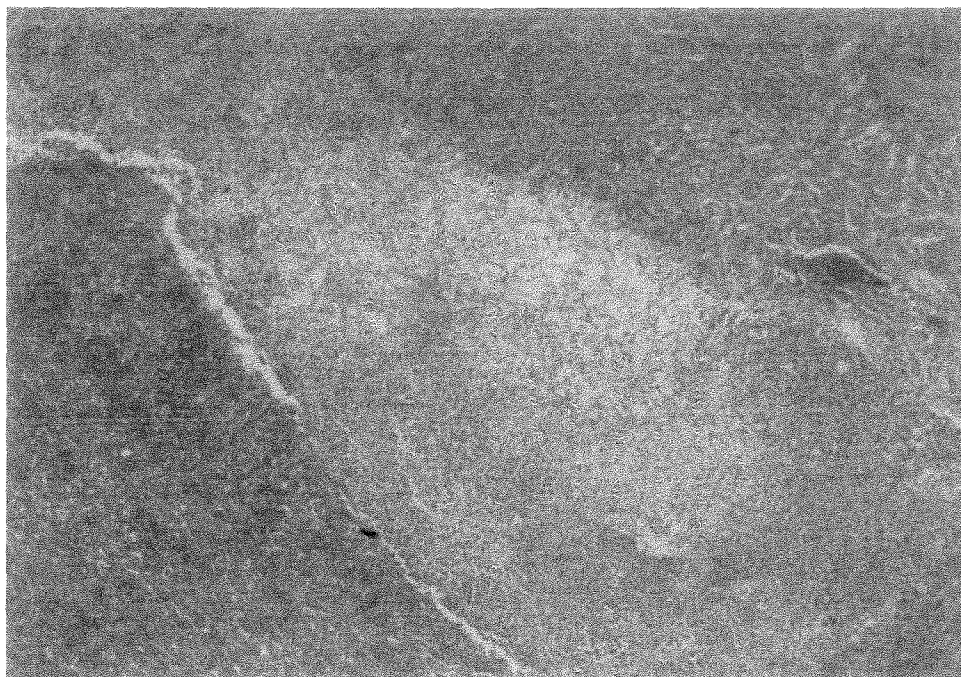


Fig. 19 (B): Neste mesmo animal observa-se reação inflamatória intensa envolvendo a região pélvica, delimitando a massa aspergilar (H&E x 100).

A desproporção entre o maior parasitismo fúngico e o menor grau de infiltrado celular, no grupo I. (diabete e acidose), é visto na figura vinte .

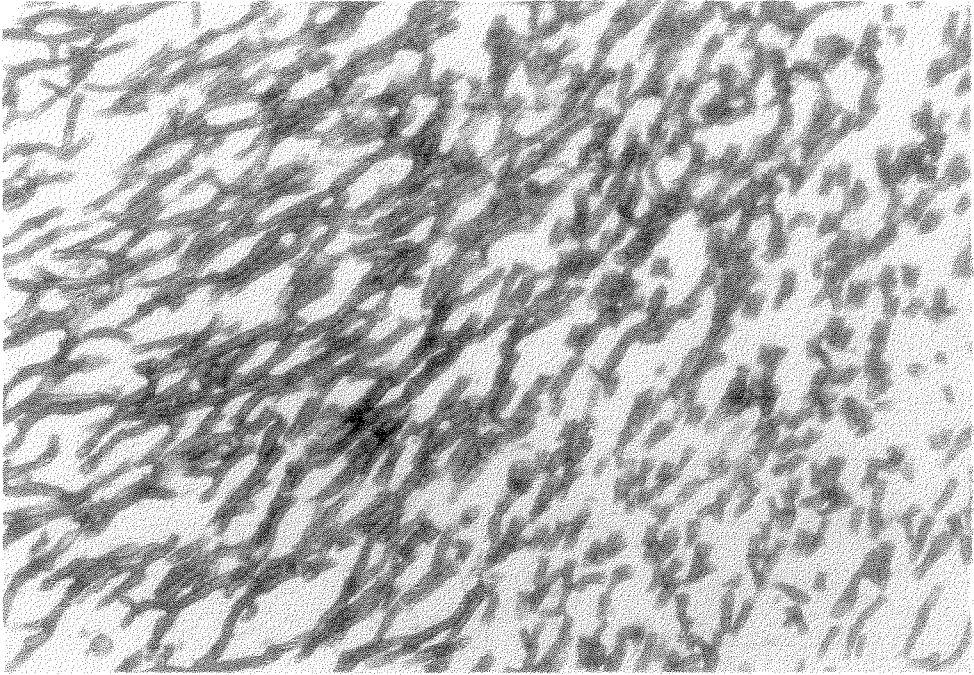


Fig. 20 (A): Camundongo com diabete e acidose, apresentando intenso parasitismo pelo *A. niger* em toda a extensão da pelve renal (Grocott ; x 400).

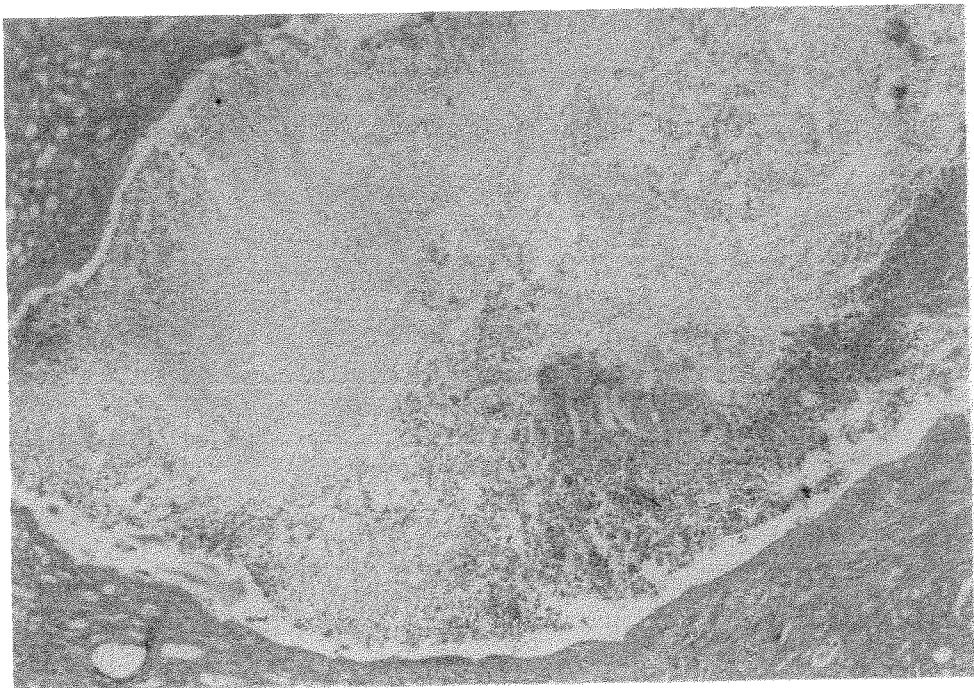


Fig. 20 (B): Neste mesmo animal, observa-se o infiltrado inflamatório desproporcional, de moderada intensidade para o intenso parasitismo fúngico (H&E ; x 100).

A reação tecidual também foi analisada quanto à extensão no envolvimento da superfície do órgão afetado, se focal ou restrita à região que continha o agente agressor ou difusa e presente em regiões que não continham o *A. niger*. A reação no grupo 2 (diabéticos) foi difusa, diferente estatisticamente dos animais com acidose ($p = 0,03$) e controles ($p = 0,0005$). Não houve diferença na extensão da reação inflamatória entre os controles e os acidóticos diabéticos ($p = 0,2$).

A frequência de envolvimento dos órgãos destacou o predomínio renal (66% dos casos), seguido pelos pulmões (25%) e fígado (8%). O maior envolvimento renal esteve associado ao predomínio de polimorfonucleares no grupo de animais com diabetes e acidose, 80% dos casos (axb/a+c), e de mononucleares para o grupo 2 (diabete) 89%. (dxc/b+d).

Esta diferença foi significativa ($p = 0,022$), conforme demonstrado na figura vinte e um. Não foram observadas diferenças no tipo de infiltrado celular no acometimento pulmonar entre os grupos. Dos 60 animais da amostra e 180 órgãos avaliados, em 28% (51/180) evidenciou-se a presença do *A. niger* nos cortes corados pela prata.

Grupo	Células		Total
	PMN	Mononucleares	
Diabete + acidose	4 a	1 b	35,7
Diabete	1 c	8 d	64,3
Total	5	9	14
	35,7	64,3	100

Fig. 21: Predomínio celular renal ($p < 0,022$)

Com referência ao diagnóstico da aspergilose, houve baixa especificidade do cultivo, para *A. niger*, nos espécimes semeados, comparado com a coloração pela prata, considerada o padrão áureo. A análise para o tecido renal mostrou sensibilidade de 94%, especificidade de 39%, valor preditivo positivo de 64% e valor preditivo negativo de 85%, evidenciado na figura vinte e dois. A sensibilidade e especificidade do cultivo como meio diagnóstico não pôde ser determinada em pulmões e fígados, devido à menor frequência de envolvimento destes órgãos pelas hifas e /ou conídios aspergílares.

	Presente	Ausente	
Cultivo Renal	0	1	47
Presente	30	17	47
			78,3
Ausente	2	11	13
			21,7
Total	32	28	60
(%)	53,3	46,7	100,0

Fig. 22: Cultivo renal ($p < 0,001$)

Quanto à histopatologia pulmonar, predominou a pneumonia intersticial difusa com o espessamento dos septos alveolares, infiltrado de polimorfonucleares, mononucleares e macrófagos, congestão vascular intensa, com zonas de hemorragia e necrose fibrinóide, ao lado da invasão vascular pelas hifas do **A. niger** (Fig. 23).

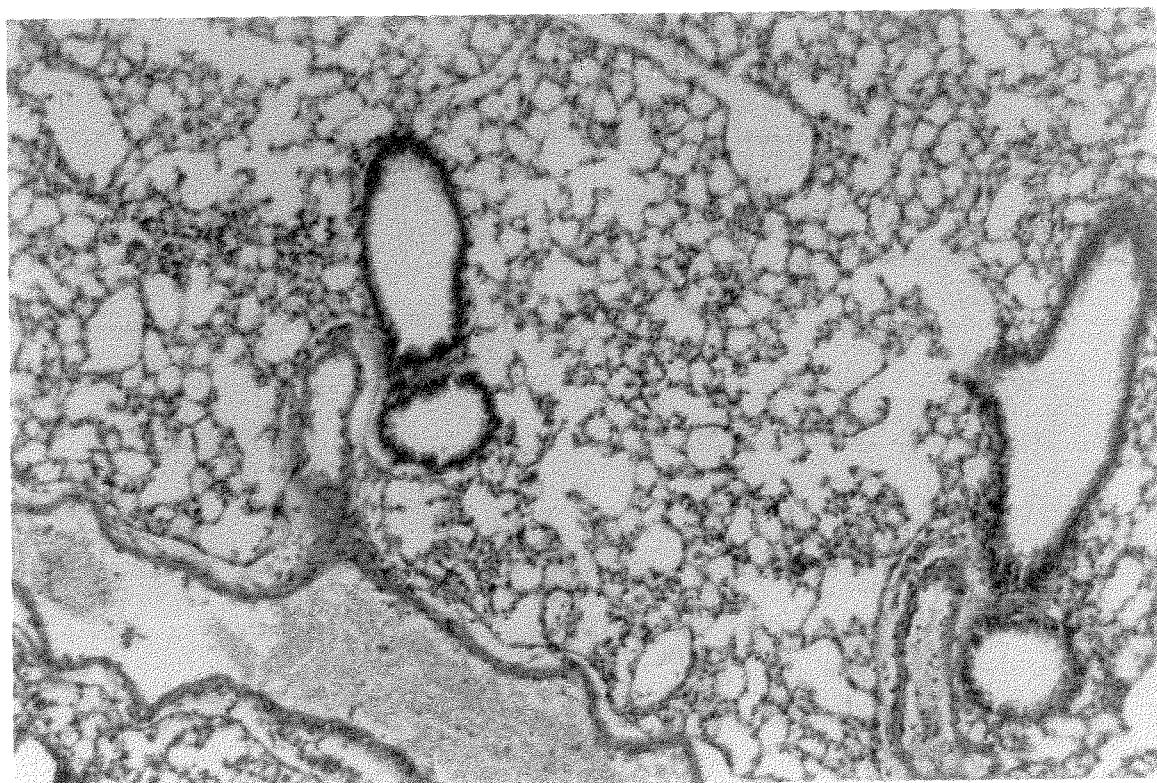


Fig. 23: Pneumonia intersticial provocada pelo **A. niger** (H&E ; x 100).

No grupo portador de diabetes e acidose e nos exclusivamente diabéticos foram identificadas hifas no parênquima pulmonar. sob a forma de conídios foram detectados apenas no grupo 2 (diabete), vistos na figura vinte e quatro . Na avaliação

da reação tecidual observou-se, em alguns casos, a presença de exsudato inflamatório local com focos de preenchimento alveolar e broncopneumonia (Fig. 25) . Nos controles não ocorreu envolvimento do *A. niger* à nível pulmonar.

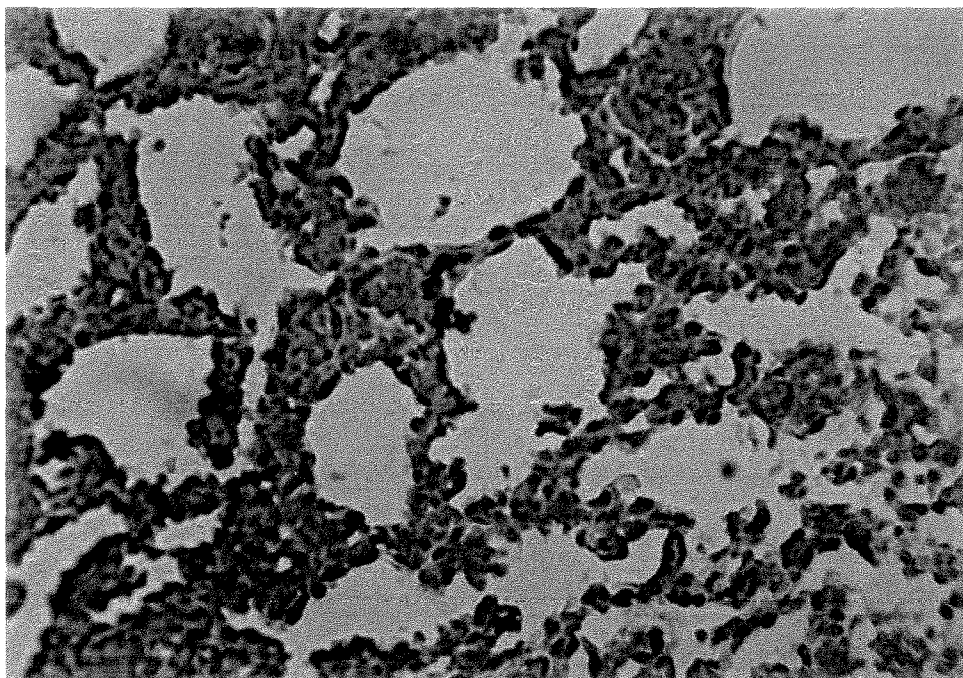


Fig. 24: Conídios de *A. niger* no alveolo de camundongo do grupo 2 (hiperglicemia).
Grocott (x 400).

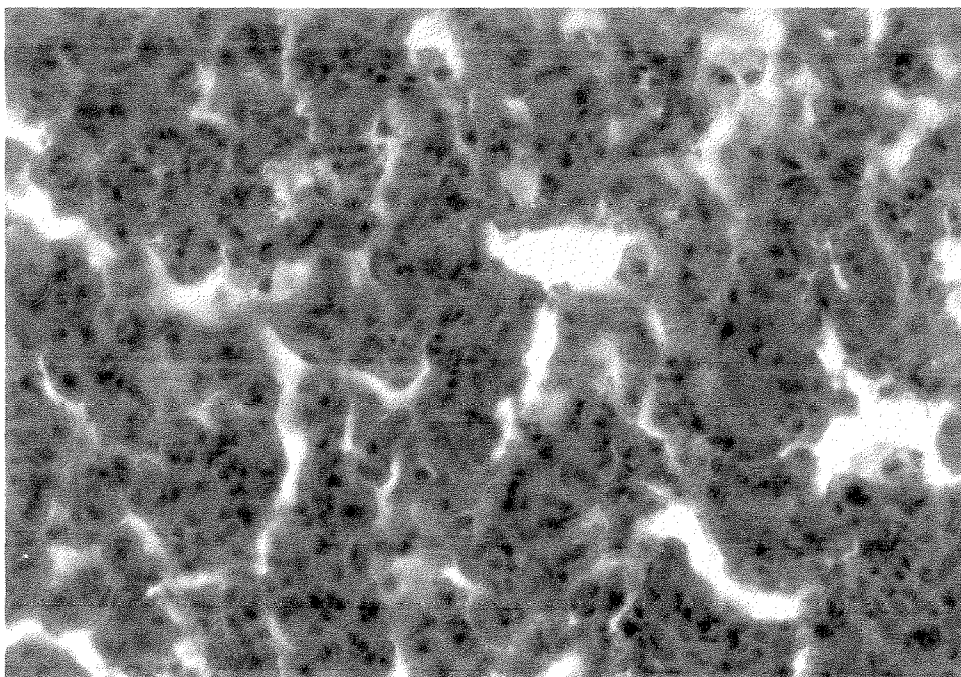


Fig. 25 : Foco de pneumonia identificado no grupo dos diabéticos sem acidose metabólica (H&E ; x 400).

Não foi registrada a formação de granuloma nos cortes histológicos examinados. A pesquisa de cristais de oxalato de cálcio foi negativa, utilizando a microscopia com luz polarizada.

A lesão patológica renal constituiu-se de quadro de pielonefrite aguda, composta por invasão parenquimatosa de hifas e/ou conídios ao lado de exuberante infiltrado inflamatório, composto de polimorfonucleares e mononucleares em toda a extensão do interstício córtico-medular renal. Em alguns cortes, os túbulos exibiam cilindros leucocitários. Houve nítida tendência à formação de conglomerados de elementos fúngicos e células inflamatórias na pelve renal, sugerindo em alguns casos a formação de abscessos pielocaliciais. No caso 21 (Fig.19) a lesão evoluiu para papilite necrosante. No Interior dos glomérulos não foi detectada a presença de hifas e/ou conídios, assim como do exsudato inflamatório (Fig. 26).

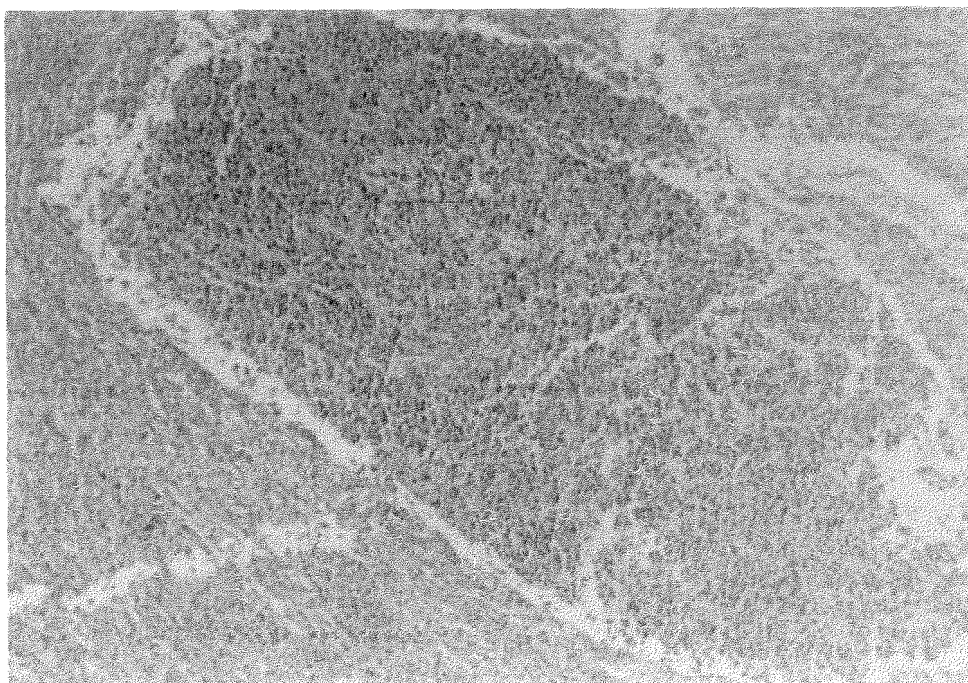


Fig. 26: Padrão histológico renal predominante nos 3 grupos do estudo (H& E ; x 100).

Não foi observada a presença de hifas do *A. niger* ou alterações histológicas hepáticas nos 3 grupos do estudo, inclusive nos casos em que se detectou a presença dos conídios aspergiliares neste órgão (Fig. 27 e 28).

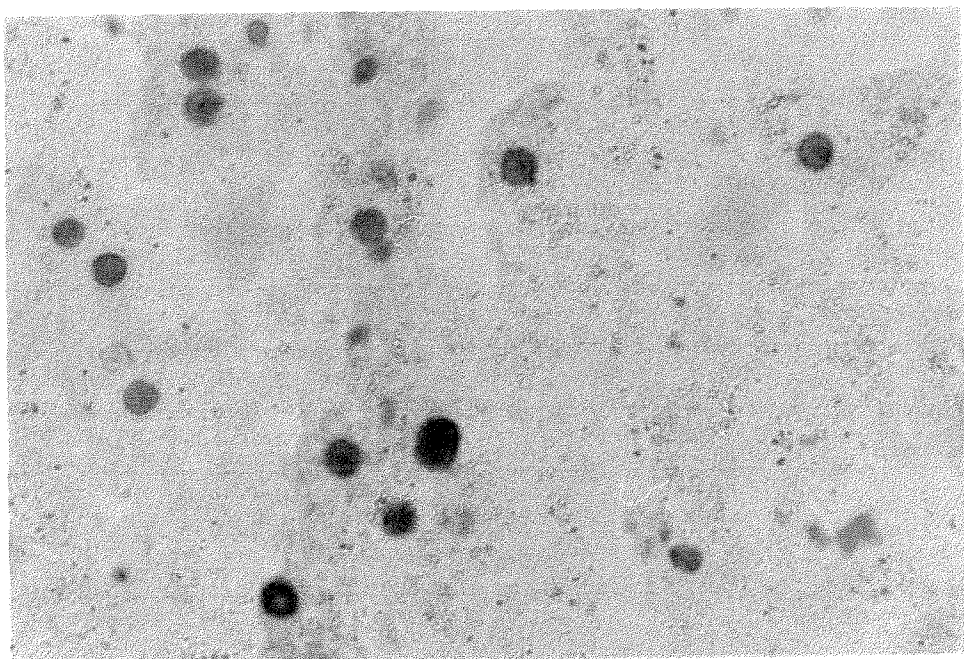


Fig.27: Conídios de *A.niger* no parênquima hepático (Grocott ; x 1000).

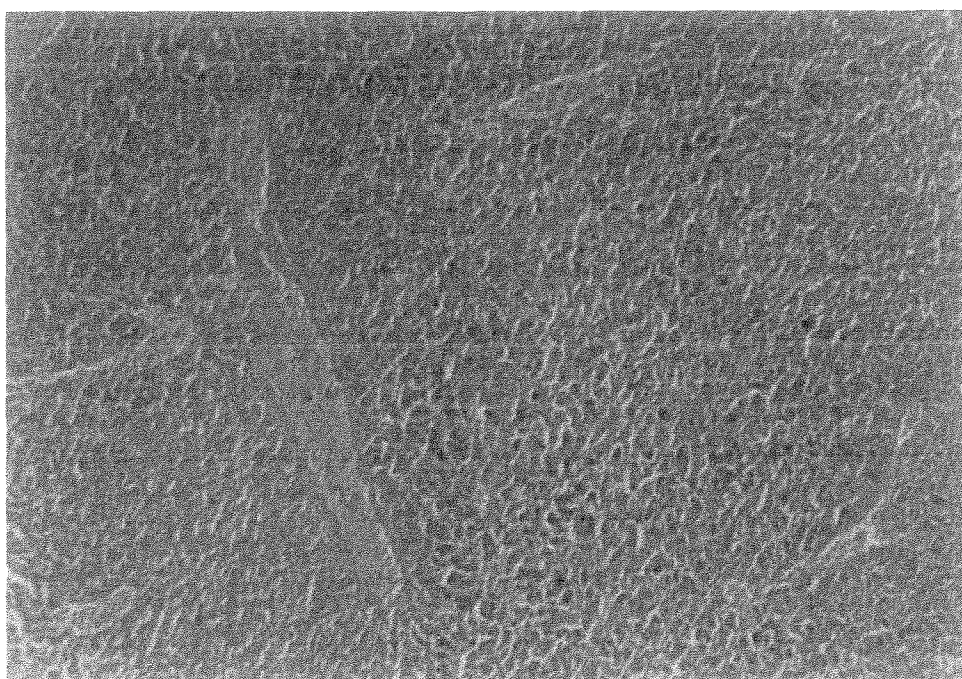


Fig. 28: - Estudo histológico do fígado no animal em que se detectou a presença dos conídios aspergiliares, visto na figura anterior (H& E ; x100).

• 5 • DISCUSSÃO

Aspergillus niger, embora amplamente distribuído na natureza, raramente tem sido descrito como agente de aspergilose (AUSTWICK, 1977). O primeiro relato de caso é de 1890, descrito por *WHEATON, em paciente com tuberculose. HANSEN (1928) encontra em 15% de asmáticos reação cutânea positiva ao *A. niger*.

O exato mecanismo fisiopatológico do *A. niger* na aspergilose não é totalmente conhecido. Acredita-se que alguns dos fatores comumente implicados na aspergilose em geral possam estar envolvidos: a atuação do sistema de complemento, com liberação de enzimas tóxicas aos tecidos (DE BRACCO, BUDZO & NEGRONI, 1976), a produção de substâncias de baixo peso molecular, capazes de inibir fagocitose conidial pelos macrófagos (SEATON & ROBERTSON, 1989), a liberação de radicais livres pelos glanulócitos. Por outro lado, a produção de metabólitos é fator importante na patogenia aspergilar, no caso do *A. niger*, destaca-se a produção de ácido oxálico (CLELAND & JOHNSON, 1956; THIEMAN, 1960; EMILIANE & BEKES, 1964; CHAPLIN, 1977; BLACKMON & ALLEN, 1983).

Entre os fatores de risco para infecção aspergilar, documentados em trabalhos experimentais, destaca-se o efeito do corticóide, capaz de provocar estabilização da membrana lisossômica, retardando a degranulação e interação com o vacúolo vagocítico celular, proporcionando infecções aspergilaes graves (EPSTEIN et al., 1967; MERKOW et al., 1971; SHANDU et al., 1970); a granulocitopenia, inferior a 500 leucócitos/mm³, que além de deprimir a concentração dos leucócitos circulantes, suprime sua liberação da medula óssea, bloqueando desta maneira a principal defesa do hospedeiro na aspergilose, que é a fagocitose (FRANCOME & TOWNSEND,

* WHEATON apud BETHUNE, M. & MOFFATT, W. - Experimental Pulmonary Aspergillosis with *Aspergillus niger*, Superimposition of this Fungus on Primary Pulmonary Tuberculosis. *J. Thorac. Surg.*, 3: 86-98, 1933.

1965; PEÑA, 1971). A importância da fagocitose pode ser avaliada na Doença Crônica Granulomatosa da Infância, cujas infecções aspergiliares são comuns e severas, devido à incapacidade dos neutrófilos destes pacientes em formar radicais oxidantes fungicidas, especialmente a H_2O_2 , durante a fagocitose (JOHNSON & BAEHNER, 1971; GREENBERG et al., 1977; COHEN et al., 1981).

As drogas citostáticas e imunodepressoras, utilizadas na população de transplantados, predispõem à micose devido à indução de leucopenia e ao aumento da porta de entrada aspergilar no trato gastro-intestinal, em consequência da toxicidade local destas drogas (BAKER, 1962; BARDANA, 1980, part.2). Nas leucoses, linfoma e leucemia, também a leucopenia é o fator predisponente (PENNINGTON, 1983; FRASER & PARÉ, 1989). Quanto à ação da antibioticoterapia, os resultados são controversos (YOUNG, BENETT & VOGEL, 1971; BARDANA, 1980; part.2). Alguns autores postulam que drogas de amplo espectro, que são capazes de alterar a flora bacteriana normal, propiciam condições favoráveis para a sobrevivência e multiplicação de microrganismos oportunistas (SIDRANSKY & FRIEDMAN, 1959; SIDRANSKY & PEARL, 1961; FRASER & PARÉ, 1989). Além disso, estados imunológicos pós infecção por vírus influenza, com linfopenia transitória, estimulam a invasão aspergilar (HORN, WOOD, HUGHES, 1983; FRASER & PARÉ, 1989; WIGGINS, CLARK, CORRIN, 1989).

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), por ter alteração primária da imunidade celular, não constitui fator de risco para aspergilose humana, uma vez que na aspergilose a ação imunológica é inespecífica e dependente da fagocitose pelos neutrófilos e macrófagos que se mantêm inalterados nesta síndrome (SCHAFFNER, 1984; TUAZON, WASHBURN, BENNETT, 1985). Os casos descritos na literatura estão relaciondos a pacientes portadores da SIDA, mas que possuem envolvimento de outros fatores já conhecidos como facilitadores da infecção aspergilar, não havendo relação com a deficiência da imunidade mediada pelas células T. Em revisão da literatura sobre aspergilose e SIDA até 1991, SINGH, VICTOR & RIHS revelam que dos 19 casos relatados, 15 (79%) apresentavam fator de risco adicional para aspergilose invasiva, incluindo neutropenia, corticoterapia e uso de drogas venosas.

5.1 - Aspergilose humana

Os casos descritos de infecção humana por *Aspergillus niger* mais freqüentemente têm a característica de uma colonização de uma cavidade natural ou preformada por outra doença. Como colonizador de cavidades naturais tem sido descrito como agente de otite externa (STUART & BLANK, 1955; HERNANDEZ, 1990; ZAROR et al., 1991), sinusite (NIME & HUTCHINS, 1973; KOPP et al., 1985; GUGNANI et al., 1989). Em cavidades preformadas tem colonizado bronquiectasias (CANNON & HILL, 1935; KURREIN, GREEN & ROWLES, 1975), alteração do parênquima pulmonar devido a enfisema (NIME & HUTCHINS, 1973; LEE, BARNES, SCHAEZEL; 1986), doença broncopulmonar obstrutiva crônica (FARLEY et al., 1985), sarcoidose (ISRAEL & OSTROW, 1969; WOLLSCHLAGER & KHON, 1984) e especialmente na seqüela de tuberculose (ADELSON & MALCON, 1968; HARA, MISUGI & SHIMANOUCI, 1976; GEMEINHARDT, ECKERT & FISHER, 1982; BUTZ, ZVETINA & LEININGER, 1985).

Pacientes com cavidades saneadas de tuberculose pulmonar têm colonização fúngica intracavitária com prevalência de 12% (SEVERO, 1978). O grupo etário mais afetado varia de 20 a 50 anos com maior comprometimento masculino (2,3:1), (JAIN, AGRAWL & AGRAWL, 1982). Nos estágios iniciais da colonização não há sinais clínicos ou radiológicos e o diagnóstico só pode ser anatômico. A colonização intracavitária pulmonar aspergilar pode permanecer incipiente por meses ou anos, ou evoluir assintomaticamente e constituir achado radiológico casual, porém quando assintomática a hemoptise recidivante é o principal sintoma, presente em 80% dos casos (BODEY & VARTVARIAN, 1989). Outras apresentações incluem tosse e baqueteamento digital. Expectoração purulenta, febre, mal estar e emagrecimento

ocorrem geralmente devido infecção secundária (LONDERO & GUADALUPE-CORTES, 1990).

O aspecto radiológico é de uma massa arredondada, opaca intra-cavitária, circundada por um halo semi-lunar claro (sinal de Monod). Pode apresentar-se de forma fixa, ligada ao parênquima pulmonar circunjacente ou móvel, mudando de posição de acordo com a postura adotada pelo paciente. A pleura adjacente está freqüentemente espessada. A cavidade colonizada comumente localiza-se em lobos superiores ou no segmento superior do lobo inferior. Geralmente únicas, podem ser múltiplas ou bilaterais. Estas massas podem sofrer lise e desaparecer e raramente calcificam.

O diagnóstico sorológico utilizado é a imunodifusão dupla com positividade de 92 a 100%, IgG-ELISA é quantitativo, mais sensível, porém mais sofisticado. O tratamento cirúrgico está indicado apenas nos casos sintomáticos.

Nos pacientes imunodeprimidos têm sido relatados casos de aspergilose pulmonar necrosante crônica em pacientes em que a diminuição das defesas é leve (UTZ et al., 1959; GEFTER et al., 1981; BINDER et al., 1982; YAMAGUCHI et al., 1992). A aspergilose invasiva aguda no hospedeiro aparentemente normal, embora extremamente rara, tem sido relatada (TOIGO, 1960). Como regra, esta apresentação clínica da aspergilose é secundária a condições predisponentes como: infecção bacteriana (EDGE, STANSFIELD & FLETCHER, 1971), infecção por outros fungos (POLAK & ORTEGA, 1967), pós cirurgia cardiovascular (MAHVI et al., 1968; MOORE et al., 1984) ou em pacientes profundamente imunodeprimidos (GERCOVICH et al., 1975; WEILAND et al., 1983; WALMESLEY et al., 1993). Em paciente com síndrome da imunodeficiência adquirida, foi descrita variante de

forma invasiva, caracterizada pela formação de pseudomembrana, necrosando a mucosa brônquica (PERVEZ, KLEINERMAN, KATTAN, 1985).

Aspergilose cutânea tem sido relatada como infecção primária (CAHILL, MOFTY & KAWAGUCHI, 1967; LOUTHRENOO et al., 1990) ou secundária no paciente queimado (PANKE, McMANUS & SPEBAR, 1979).

Como apresentação rara o *A. niger* pode ser um fator desencadeante de aspergilose broncopulmonar alérgica (SANDHU et al., 1979; CHAPARAS et al., 1980; SHARMA et al., 1985). O mecanismo inicial consiste na colonização da árvore traqueobrônquica de pacientes asmáticos. O fungo cresce e a sensibilização ocorre com a liberação de toxinas e a presença dos antígenos aspergiliares. A reação imune do tipo I resulta em broncoespasmo, eosinofilia e reação cutânea imediata positiva. Infiltrados pulmonares e bronquiectasias centrais são conseqüência da reação imunológica do tipo 3, mediada pelos complexos de IgG circulantes e a reação de hipersensibilidade tardia (tipo 4) causa a formação de granulomas e infiltrado mononuclear (BODEY & VARTIVARIAN, 1989).

5.2 - Aspergilose animal

As duas principais formas clínicas de aspergilose animal são decorrentes da invasão tecidual pelas hifas do fungo (aspergilose invasiva) ou pelo efeito das toxinas, produto do metabolismo fúngico sobre grãos estocados inadequadamente, ocasionando no hospedeiro a micotoxicose (ZOOK & MIGAKI, 1985).

5.2.1 - Infecção natural

O primeiro caso de aspergilose animal foi descrito há mais de 160 anos, por MAYER e EMMERT. A micose tem distribuição universal e atinge tanto animais selvagens quanto domésticos.

A alta prevalência das preceptinas séricas documenta os animais freqüentemente envolvidos, com positividade de 72% nas aves, 48% em cavalos e 43% no gado. Nestas infecções naturais, o órgão mais envolvido é o pulmão, embora possa comprometer qualquer outro sítio corpóreo.

O maior interesse veterinário reside, contudo, na rinite e otite externa em cães, placentite com aborto micótico em gados, cavalos e ovelhas (ZOOK & MIGAKI, 1985) e a saculite aérea dos pássaros associados à presença de cristais de oxalato de cálcio nas infecções causadas pelo *A. niger* (WOBSER & SAUDERS, 1975). PAL (1988) relata o primeiro caso de um aborto por *A. niger* em búfalo com o agente infeccioso, disseminado por todos os órgãos, cuja fonte de contágio provavelmente foi alimentar. Neste mesmo ano, BHATTACHARYA descreve-o pela primeira vez como patógeno para peixes.

5.2.2 - Infecção experimental

Nos trabalhos de pesquisa, os animais de maior susceptibilidade à infecção aspergilar são os camundongos jovens, constituindo a primeira escolha para trabalhos experimentais com fungos deste gênero (CORBEL & EADES, 1977).

De forma similar à aspergilose humana, as espécies de maior patogenicidade para os camundongos quando testados por via inalatória são *A. fumigatus*, *A. flavus* e *A. niger*, em ordem decrescente (BATHIA & MOHAPATRA, 1969, parts 1 e 2).

Entretanto, nos estudos com inoculação venosa, o maior grau de patogenicidade é verificado pelo o *A. niger*, seguido do *A. flavus* e *A. fumigatus*, sendo diretamente proporcional à concentração dos conídios utilizada (SUGIMOTO,

1960; SANDHU, SANDHU & DAMODARAM, 1970; DIXON, POLAK, WALSH, 1989). O *A. niger* na concentração de até 1.000.000 conídios/ml tem baixo potencial patogênico para os camundongos normais (FORD & FRIEDMAN, 1967; EPSTEIN et al., 1967). Destacando resultados semelhantes com o *A. niger* inoculado por via venosa nas concentrações de 10.000 e 1.000.000 conídios/ml, os camundongos normais (controles), quando foram sacrificados, revelaram ausência de reação tecidual e de elementos fúngicos no material de autópsia. Isto reflete a capacidade do sistema imunológico em eliminar o elementos fúngicos em um curto período de tempo (3 semanas). Também deve ser ressaltado que os controles envolvidos na infecção apresentaram reação inflamatória eficaz de intensidade proporcional ao número de hifas encontradas nos tecidos.

Por outro lado, nos animais com diabetes e diabetes com acidose metabólica, o maior grau de patogenicidade esteve relacionada a um menor tempo de sobrevivência, com maior concentração de hifas nos tecidos e maior número de órgãos envolvidos.

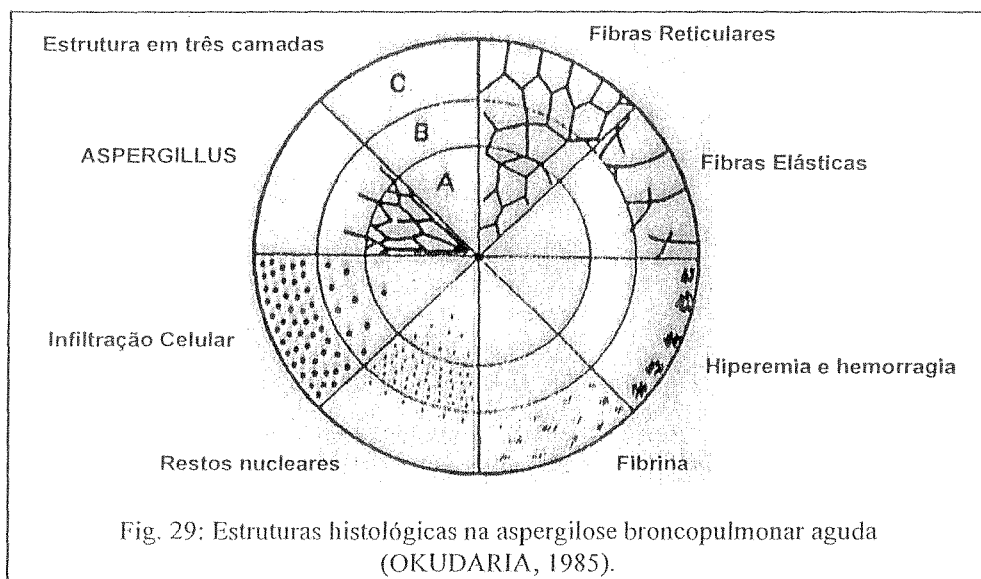
Nos animais com distúrbio metabólico, a reação tecidual foi desproporcional à gravidade da infecção pelo *A. niger*. A histopatologia mostrou grande número de hifas com invasão vascular, maior capacidade de disseminação na superfície tissular renal, ao lado de micélios na proximidade das paredes brônquicas dentro dos vasos sanguíneos e nos espaços alveolares. O infiltrado celular predominante foi de polimorfonuclear que atua diretamente contra as formas miceliais, enquanto que nos animais com diabetes mellitus a maior proporção de formas não germinantes do fungo esteve relacionada ao predomínio dos mononucleares. Assim, a imunidade celular é a principal linha de defesa contra a aspergilose, através de dois mecanismos independentes, os polimorfonucleares, atuando diretamente contra as hifas, e os macrófagos, dirigidos aos conídios aspergiliares. SHAFFNER e colaboradores (1983) ressaltam ainda que os macrófagos alveolares têm maior capacidade de destruir os conídios aspergiliares que os macrófagos de origem peritoneal e atuam independentes dos leucócitos e monócitos (BARDANA et al., 1975; DIAMOND, et al., 1978; FROMTLING & SHADONY, 1986; REPENTIGNY et al., 1993).

Na avaliação dos órgãos, no fígado não foram observadas hifas do *A. niger*, nos três grupos do estudo. Resultados concordantes aos descritos na literatura e explicados pelo fato de os órgãos com maior número de células do sistema monocítico/macrofágico terem maior capacidade para a fagocitose e eliminação dos conídios aspergiliares, antes de germinarem produzindo hifas (FORD, BAKER & FRIEDMAN, 1968; TURNER et al., 1976). Assim o maior tropismo é renal, seguido pelo envolvimento pulmonar, em trabalhos experimentais utilizando o *A. flavus* (SIDRANSKY et al., 1972), *A. fumigatus* ou *A. niger* (FORD & FRIEDMAN, 1967), independente da via de inoculação.

O padrão tecidual pulmonar de pneumonia intersticial foi encontrado por outros autores em trabalhos experimentais, utilizando as várias espécies de aspergilos. Estudo de TURNER e colaboradores (1976), utilizando ratos inoculados por via traqueal, com suspensões de 10.000.000 conídios de *A. fumigatus* e submetidos à corticoterapia, evidenciou resultados semelhantes com a presença de pneumonia intersticial e proeminente congestão vascular, hemorragia e necrose. SIDRANSKY (1972), inoculando *A. flavus* em doses crescentes via peritoneal em camundongo normais, destaca a presença transitória da pneumonia intersticial com congestão vascular e edema, antes da total eliminação dos conídios a nível pulmonar. Em 1959, este mesmo autor, em trabalho com camundongos imunodeprimidos com cortisona e sob antibioticoterapia, inoculados por via inalatória com *A. fumigatus*, mostra a presença de broncopneumonia hemorrágica, com hifas invadindo a parede brônquica e vasos. EPSTEIN e colaboradores (1967) demonstraram que camundongos sadios com o tempo eliminam as hifas, o que reduz a intensidade do infiltrado inflamatório, e é corroborado por nosso estudo, onde os controles sadios tinham infiltrado inflamatório proporcional ao número de hifas nos tecidos. Já os animais com acidose metabólica, embora albergando inúmeros elementos fúngicos, apresentavam reação tecidual desproporcional de baixa intensidade e ineficaz, quando comparados aos diabéticos e aos controles. Por outro lado, a maior concentração de elementos miceliais explica o predomínio de polimorfonucleares neste grupo quando comparados aos diabéticos ($p = 0,022$).

A nível renal, observou-se a mesma tendência registrada da literatura, formação de grandes massas miceliais em pelve renal, circunscritas por exsudato inflamatório (FORD, BAKER & FRIEDMAN, 1968; SIDRANSKY et al., 1972).

No que se refere aos seres humanos, a resposta à presença dos aspergilos nos tecidos ocasiona três diferentes reações teciduais: necrozante, supurativa e granulomatosa (PEÑA, 1971). OKUDARIA (1985) descreve a representação esquemática das principais estruturas histológicas dentro de um foco de aspergilose broncopulmonar aguda (Fig. 29). A lesão exhibe uma zona central de necrose de coagulação, envolvida por polimorfonucleares, geralmente com sinais de degeneração celular. Esta lesão é envolvida por uma zona periférica de hiperemia e hemorragia.



Ocasionalmente, a reação predominante é supurativa. A lesão granulomatosa é composta de células epitelióides e gigantes com infiltrado de polimorfonucleares e mononucleares. Não é uma reação necessariamente crônica, já tendo sido observada em caso de aspergilose pulmonar aguda. BARDANA (1980, part. 1) descreve a formação de corpo asteróide, principalmente em animais, e especialmente no gado, constituído de conglomerado de hifas coberto por um material fibrinóide composto de depósitos de antígeno e anticorpo (PEÑA, 1971; BARDANA, 1980; part.1; LEMOS & JENSEN, 1985).

O cultivo, embora sensível para o diagnóstico da infecção (94%), tem baixa especificidade (39%), já demonstrado anteriormente, devido ao fungo ser contaminante habitual de laboratório (AL-DOORY, 1985).

5.3 - A relação entre o diabetes mérito e infecção por *A. niger*

Severo (1987) relata, em estudo comparativo com *A. fumigatus*, que cinco de 21 pacientes com colonização intracavitária pulmonar por *A. niger* eram diabéticos (16%), e apenas sete de 246 pacientes eram diabéticos (0,9%) no grupo do *A. fumigatus*, demonstrando forte associação entre *A. niger* e diabetes (Razão de Chances = 10, 7; $p < 0,001$).

Na literatura esta associação foi registrada em outros 6 casos. Cinco deles como colonização intracavitária pulmonar (FARLEY et al., 1985; KAUFFMAN; WILSON & SCHWARTZ, 1984; VILLAR, PIMENTEL, COSTA, 1962; METZGER, GARAGUSI, KERWIN, 1984;) e um como aspergilose cutânea (RIPPON & REYES, 1984).

5.4 - O papel da acidose metabólica nos processos infecciosos humanos

O diabetes mérito, classicamente relacionado na literatura mundial a uma maior incidência de infecções em geral, e fúngicas em particular (SIDRANSKY & VERNEY, 1962; EPSTEIN et al., 1967; THORTON, 1971; WHEAT, 1980; FARLEY et al., 1985), tem fisiopatologia substanciada nos estados hiperglicêmicos, em estudos que relacionam o menor controle sobre a glicemia com a maior propensão à aquisição dos processos infecciosos (CRUICKSHANK & PAYNE, 1949; WERTMAN & HENNEY, 1962; BRAYTON et al., 1970; YAMAGUCHI et al., 1992). Contudo, posteriormente verificou-se que a hiperglicemia sem o estado de acidose associada não causa maiores taxas de infecção. CAMPBELL e colaboradores (1974) demonstraram em estudo prospectivo que a acidose é o fator responsável pela maior incidência de infecções em pacientes com diabetes mérito descompensado. O processo infeccioso estava presente nos pacientes com valores nos extremos inferiores de bicarbonato sérico.

O distúrbio metabólico do diabetes mellitus está relacionado com infecção nos valores que oscilavam de 17 a 28%, podendo atingir cifras mais altas nos casos fatais de descompensação no pH (SHELDON & BAUER, 1958, 1959). Portanto, o estado de acidose metabólica pode converter infecções bacterianas ou fúngicas em estados graves, com disseminação e lesão necrótica (PERILLIE, NOLAN & FINCH, 1962).

A acidose metabólica compromete diretamente o sistema imunológico através da diminuição da capacidade de fagocitose dos polimorfonucleares, queda na concentração tecidual dos granulócitos e maiores taxas de degeneração celular em diabéticos acidóticos (SHELDON & BAUER, 1962; BYBEE & ROGERS, 1964; THORTON, 1971).

A descoberta de como a acidemia deprime o sistema imune trará um melhor entendimento da fisiopatologia da infecção nestes pacientes e, por conseguinte, repercussão direta na conduta destes casos. Resta saber se a manutenção do pH em níveis estreitos da normalidade (7.35 - 7.45), seria capaz de diminuir a incidência de infecção por *A. niger* e se a indução de um estado de alcalose metabólica reduziria o risco de infecção no grupo de pacientes expostos a freqüentes quedas do pH: diabéticos, pacientes com sepse, portadores de insuficiência cardíaca congestiva, DBPOC, insuficiência renal, desnutridos ou alcoólatras.

5.4.1 - Acidose nas infecções experimentais

Através deste estudo, foi possível demonstrar que a piora do prognóstico e o aumento do risco para infecção pelo *A. niger* está diretamente relacionada à acidose metabólica presente na diabetes mellitus.

Vários trabalhos utilizaram o monohidrato de aloxano para criar condições de hiperglicemia, presente 24 horas após a injeção da droga e persistia em 90% dos animais testados, como também o diabetes mellitus associada à acidose metabólica, esta última condição persistente das primeiras horas após o uso da droga até 5 dias depois, possibilitando modelo experimental para o estudo da associação entre acidemia e infecção (LUKENS, 1948).

A droga atua por destruição direta das células Beta das ilhotas de Langerhans, estabelecendo na fase inicial um quadro agudo de hipoglicemia pela liberação das moléculas de insulina pré-formadas. Segue-se imediatamente por um período de hiperglicemia e queda no pH sanguíneo que simula o estado da cetoacidose diabética humana. Esta condição persiste no máximo 5 a 7 dias, quando o animal deixa o estado de acidose e permanece definitivamente com aumento dos níveis glicêmicos.

SIDRANSKY e VERNEY (1962), utilizando camundongos expostos a conídios de *A. flavus* por via inalatória, demonstram que os animais com diabetes e acidose tornam-se altamente susceptivos a aspergilose pulmonar, comportando-se de forma semelhante aos imunosuprimidos com cortisona. O resultado é confirmado pela análise histológica pulmonar que demonstra maior invasão tecidual e proliferação das hifas nos portadores de acidemia do que nos camundongos com diabetes crônico pelo aloxano. Este é o único trabalho da literatura que relaciona a aspergilose com distúrbio no pH. Entretanto, a relação entre os zigomicetos e diabetes mélico com acidose corrobora o papel da acidemia como facilitadora de processos infecciosos micóticos (ABRANSON, WILSON & ARKY, 1967).

BAUER, FLANAGAN e SHELDON (1955), utilizando coelhos inoculados com suspensões de *Rhizopus oryzae* via nasal, 48 a 72 horas pós uso do aloxano, demonstraram que a acidose diminui a resposta inflamatória e aumenta o grau de degeneração celular comparado aos controles. Estes autores, em 1956, compararam a hiperglicemia com a acidose e diabetes, utilizando o mesmo modelo experimental, e repetiram os resultados já demonstrados, com infecção mais grave e de maior extensão no grupo dos diabéticos e acidóticos. Outros trabalhos experimentais, comparando o diabetes mélico induzido na fase crônica do aloxano com a acidose e hiperglicemia na fase inicial do uso da droga, verificaram resultados semelhantes, confirmando a maior susceptibilidade do hospedeiro diabético acidótico às infecções por zigomicetos, relacionada à menor resposta do exsudato inflamatório agudo através da diminuição sérica dos polimorfonucleares, ação menos intensa e menos efetiva. Estas alterações imunológicas correspondem ao período de crescimento do fungo e disseminação da infecção (SHOFIELD & BAKER, 1956; ELDER & BAKER, 1956 ;BAKER et al., 1956; SHELDON & BAUER, 1958).

5.5 - A oxalose distrófica adquirida

Oxalose é uma condição patológica caracterizada por deposição de oxalato de cálcio nos tecidos, decorrente de uma produção excessiva ou de uma queda no seu catabolismo com aumento na concentração corpórea deste sal (WILLIAMS & SMITH, 1983; SEVERO, 1987). Também resulta de um aumento na absorção intestinal ou na menor taxa de eliminação renal de oxalato (SMITH, 1968). Trata-se de manifestação histológica secundária a inúmeros e diferentes estados clínicos patológicos, envolvendo anormalidades tanto endógenas como exógenas do metabolismo do oxalato (CHAPLIN, 1977). Embora a oxalose distrófica adquirida produzida pelo *A. niger* não tenha sido evidenciada neste estudo, assim como em outros trabalhos experimentais, esta é uma complicação comum nas infecções naturais por este fungo, em seres humanos e em animais. O *A. niger* possui as enzimas do ciclo de Krebs e na presença de glicose ou ácido cítrico produz o ácido oxálico, utilizando a clivagem hidrolítica do oxalocetato por meio da enzima oxalato descarboxilase produzida em meios de baixo pH (EMILIANE & BEKES, 1964; MULLER, 1975 ; MÜLLER & FROSH, 1975; parts 1 e 2).

A oxalose distrófica adquirida ocorre sem um distúrbio aparente no metabolismo do cálcio, em tecido alterado, lesionado, degenerado ou necrótico, e na presença de meios com pH ácido (5, 0 e 5.5) o oxalato reage com o cálcio do sangue e fluidos corpóreos, gerando o oxalato de cálcio (CHAPLIN, 1977). Achados adicionais documentaram a precipitação desses cristais em pulmões com fibras de asbesto (VICKS, 1986). Embora uma oxalose leve possa estar associada à infecção por *A. flavus* ou até mesmo pelo *A. fumigatus* (NIME & HUTCHINS, 1973; MITCHEL, 1990), os cristais de oxalato de cálcio são uma característica peculiar das infecções pelo *A. niger* (FARLEY et al., 1985).

HETHERINGTON (1943) descreve o caso de CIPA pelo *A. niger*, associado à presença de cristais de cálcio, em paciente com passado de litíase renal. Em 1973, NIME & HUTCHINS demonstram a associação de aspergilose pulmonar e sinusal com os cristais de oxalato de cálcio em 11 de 68 casos. Em três casos, nos quais foi

identificado o **A. niger**, chama atenção o primeiro relato que mostrou que o paciente evoluiu para insuficiência renal aguda, devido ao depósito maciço dos cristais de oxalato de cálcio nos túbulos renais, e o caso número 2, constituindo o primeiro relato de APNC por **A. niger**. WOBSE & SAUDERS, em 1975, documentam o problema em ave, cuja autópsia demonstra infecção pelo **A. niger** nos pulmões e presença dos cristais. Em 1976, HARA, MISUGI e SHIMANOUCI descrevem o primeiro caso no Japão de CIPA por **A. niger** e o diagnóstico dos cristais de oxalato de cálcio por métodos histoquímicos, associado à difração de raios-X. Em 1979, REYS, KATHURIA e MAC GLASHAN descrevem a presença destes cristais no líquido pleural. Em 1981, SEVERO e colaboradores chamam a atenção para o problema em nosso meio, com relato de paciente com CIPA e insuficiência renal aguda secundária aos depósitos dos cristais a nível tubular renal. KAUFFMAN, WILSON e SCHWARTZ, em 1984, publicam o segundo relato de APNC pelo **A. niger** em paciente com oxalose. Neste mesmo ano, METZER, GARAGUSI e KERWIN relacionam a presença do ácido oxálico a dano tecidual pulmonar, e RIPON e REYES mostram a importância dos cristais na identificação do agente agressor, relacionando a presença dos cristais birefringentes à presença de fungos em um paciente com pé diabético e infecção pelo **A. niger** e zigomicose.

Portanto, o encontro de cristais de oxalato de cálcio em qualquer espécime de tecido ou fluido corporal deve levantar a suspeita diagnóstica de infecção por **A. niger** e mais raramente por **A. flavus** ou mesmo **A. fumigatus** (REYS, KATHURIA & MAC GLASHAN, 1979). No estudo de FARLEY e colaboradores (1985), a análise da citologia pulmonar de 11 pacientes com aspergilose associada a cristais de oxalato de cálcio, demonstrou que a maior incidência de infecção foi pelo **A. niger** (45%), em seguida pelo **A. flavus** (16%) e **A. fumigatus** com (7%). ROSEN (1981) e WIGGINS, CLARK e CORRIN (1989) reafirmam a necessidade de se suspeitar da presença do **A. niger** nos casos onde são descobertos os cristais de oxalato de cálcio. A dosagem do ácido oxálico no lavado broncoalveolar em pacientes com aspergilose invasiva permite terapêutica precoce e resultados mais favoráveis (BENOIT et al., 1985; FARLEY, MABRY & MUÑOZ, 1986).

Por fim, vale ressaltar que a presença dos cristais de oxalato de cálcio tem efeito deletério no parênquima pulmonar. O mecanismo exato ainda não está completamente esclarecido. Em trabalho recente, GHIO e colaboradores (1992) referem a hipótese oxidante da toxicidade. Os cristais de oxalato de cálcio produzidos pelo *A. niger* se ligam ao íon férrico presentes nas seguintes proteínas: transferrina, lactoferrina em fosfatos, esterres, citratos e na membrana lipídica, por competição direta nas áreas de maior concentração de oxalato dos tecidos infectados pelo fungo. Análise “in vitro” mostra que o complexo formado de oxalato de cálcio e íons férricos ligados à sua superfície gera a produção de radicais hidroxila (OH)- e aumenta a ativação do macrófago alveolar, levando à produção de radicais oxidantes de forma direta e indireta com a ativação da fagocitose granulocítica.

Nas infecções por *A.niger*, o tratamento precoce, voltado para a eliminação do fungo através de cirurgia, antimicóticos ou associando os dois procedimentos é mandatório, já que o prognóstico é ruim, com êxito letal em curto período de tempo (NIME & HUTCHINS, 1973; SEVERO et al., 1981). Uma proposta terapêutica de efeitos ainda não testados é a alcalinização do meio onde se encontra o *A. niger*, com o objetivo de reduzir a produção do ácido oxálico e a posterior formação dos cristais de oxalato de cálcio, tendo em vista o caráter acidofílico do fungo (ABDEL-RAHIM & ARBAB, 1985).

A perspectiva da descoberta de novas abordagens terapêuticas para infecções fúngicas, o conhecimento do mecanismo exato de destruição tissular pelo *A. niger*, o entendimento dos mecanismos imunológicos desencadeados, a identificação de enzimas que permitam o entendimento da fisiopatologia do microrganismo e especialmente o exato conhecimento da ação da acidose metabólica na infecção desencadeada por fungos acidofílicos trarão imediata aplicação clínica.

• 6 •

Conclusão

- 6.1 - A utilização de modelos experimentais com camundongos é viável no estudo da aspergilose;
- 6.2 - **A. niger** não é patogênico para camundongos sadios em concentrações de até 10^6 conídios/ml;
- 6.3 - A acidose metabólica constitui fator de risco para aquisição da aspergilose por **A. niger**, atuando como agravante prognóstico;
- 6.4 - A hiperglicemia isolada não constitui risco para maior prevalência ou pior prognóstico da infecção pelo **A.niger**;
- 6.5 - O maior tropismo tecidual foi renal, seguido pelo pulmonar, ambos com parasitismo miceliano, e o fígado apresentou conídios não havendo hifas;
- 6.6 - O pulmão tem como achado histopatológico predominante a pneumonia intersticial difusa e a nível renal a pielonefrite;
- 6.7 - A reação tecidual foi inespecífica e dependente essencialmente do mecanismo fagocítico celular dos polimorfonucleares e mononucleares, não havendo formações de cristais de oxalato de cálcio;
- 6.8 - As características bioquímicas e micromorfológicas definiram esta infecção como uma entidade nosológica única de abordagem diagnóstico-terapêutica próprias, no caleidoscópio das infecções aspergiliares;

6.9 - A identificação micromorfológica dos elementos fúngicos nos cortes histológicos, na coloração pela prata, constitui padrão áureo no diagnóstico da micose;

6.10 -O isolamento em cultivo dos fragmentos de tecido apresenta sensibilidade de 89%, especificidade de 36%, valor preditivo positivo de 44% e valor produtivo negativo de 87%.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL - RAIM, A. M. & ARBAB, H. A. - Factors affecting spore germination in *Aspergillus niger*. *Mycopathol.*, **89**:75 - 79, 1985.
- ABRAMSON, E.; WILSON, D. & ARKY, R. A. - Rhinocerebral phycomycosis in association with diabetic ketoacidoses. *Ann. Inter. Med.*, **66**:735 - 742, 1967.
- ADELSON, H. J. & MALCON, J. A. - Endocavitary treatment of pulmonary mycetomas. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **98**:87 - 92, 1968.
- AL - DOORY, Y. - The micology of the aspergilli. In: AL - DOORY, Y. & WAGNER, G. E. (ed. s.). *Aspergillosis*. Springfield. Charles C. Thomas, pub, 1985. chap. 3. p. 25 - 42..
- ARNOW, P. M.; ANDERSEIN, R. L.; MAINUS, P.D. & SMITH, E. J. - Pulmonary aspergillosis during hospital renovation. *Am. Rev. Resp. Dis.*, **118**:49 - 53, 1978.
- AUSTWICK, P. K. C. - Phogenicity. In: RAPER, K. E. & FENNELL, D. I. - **The genus *Aspergillus***. Huntington, Robert E. Krieger, Pub Co, 1977. chap. 7. p. 82 - 126 .
- BAKER, R. D.; SCHOFIELD, R. A.; ELDER, T. D. & SPOTO, Jr. - Alloxan diabetes and cortisone as modifyng factors in experimental mucormycosis. *Fed. proc.*, **15**:506, 1956. (Abstract).
- BAKER, R. D. - Leukopenia and therapy in leukemia as factors predisposing to fatal mycosis. *Amer. J. Clin. Pathol.*, **37**:358, 1962.

- BARDANA, Jr., E. J.; GERBER, J. D. & CIANCIULLE, F. P. - The general and special immune response to pulmonary aspergillosis. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **112**: 799, 1975.
- BARDANA, Jr., E. J. - The clinical spectrum of aspergillosis. Part 1. Epidemiology, pathogenicity, infection in animals and immunology of *Aspergillus*. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, **13**:21 - 63, 1980.
- BARDANA, Jr., E. J. - The clinical spectrum of aspergillosis. Part 2. Classification and description of saprophytic, allergic and invasive variants of humana disease. *Critic. Rev. Clin. Lab. Sci.*, **13**:85 - 159, 1980.
- BAUER, H.; FLANAGAN, J. F. & SHELDON, W. H. - Experimental cerebral mucormycosis in rabbits with alloxan diabetes. *Yale J. Biol. Med.*, **28**:29 - 36, 1955.
- BAUER, H.; FLANAGAN, J. F. & SHELDON, W. H. - The effects of metabolic alterations on experimental *Rhizopus oryzae* (mucormycosis) infection. *Yale J. Biol. Med.*, **29**:23 - 32, 1956.
- BENOIT, G.; CHAUVIM, M. F.; CORDONIER, C.; CASTIER, A. & BERNAUDIM, J. F. - Oxalic acid in broncoalveolar lavage fluid from patients with invasive pulmonary Aspergillosis. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **132**:748 - 751, 1985.
- BETHUNE, N. & MOFFAT, W. - Experimental pulmonary Aspergillosis with *Aspergillus Niger*: superimposition of this fungus on a primary pulmonary tuberculosis. *J. Thorac. Surg.*, **3**: 86 - 98, 1933.
- BHATHIA, V. N. & MOHAPATHA, L. N. - Experimental aspergillosis in mice. Part 1. Pathogenic potential of *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger*. *Mykosen*, **12**:615, 1969.

- BHATIA, V.N & MOHAPATRA, L.N- Eperimental aspergillosis in mice. Part. 2
Enhanced susceptibility of the cortisone treated mice to infection with
Aspergillus fumigatus, Aspergillus flavus and Aspergillus niger. Mykosen,
13: 105 - 110, 1969.
- BHATTACHARYA, U. - **Aspergillus niger**: a new record as a fish pathogen.
Environ. Ecol., 6:231 - 232, 1988.
- BINDER, R. E.; FALING, R. J.; PUBATCH, R. D.; MAHASAEN, C. & SNIDER,
G. L. - Pulmonary aspergillosis: a discrete clinical entity. **Medicine, 61:**109 -
124, 1982.
- BLACKMON, J. A. & ALLEN, L. - Infectious diseases of the lung. **Lab. Med.,**
14:77 - 85, 1983.
- BODEY, G. P. & VARTIVARIAN, S. - Aspergillosis. **Eur. J. Clin. Microbiol.**
Infect. Dis., 8:413 - 437, 1989.
- BRAYTON, R. G.; STOKES, R. E.; SCHWARTZ, M. S. & LOURIA, D. B. - Effect
of alcohol and various diseases on leukocyte mobilization, phagocytosis and
intracellular bacterial killing. **New Engl. J. Med., 282:**123, 1970.
- BROWN, E., FREEDMAN, S.; ARBEIT, R. & GOMES, S. - Invasive pulmonary
aspergillosis in an apparently non - imunocomprised host. **Am J. Med., 69:**
624 - 628, 1988.
- BUTZ, R. O. ; ZVETINA, J. R. & LEININGER, B. J. - Ten year experience with
micetoma in patients with pulmonary tuberculosis. **Chest., 87:**356 - 358, 1985.
- BYBEE, J. D. & ROGERS, D. E. - The phagocytic activity of polimorphonuclear
leukocytes obtained from patients with diabetes mellitus. **J. Lab. Clin. Med.,**
64:1, 1964.
- CAHILL, K. M.; EL MOFTY, A. M. & KAWAGUCHI, P. - Primary cutaneous
aspergillosis. **Arch. Derm., 96:** 545 - 547, 1967.

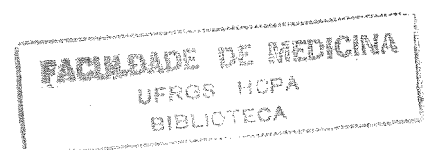
- CAMPBELL, I. W.; MUNRO, J. F.; DUNCAN, I. J. P. & MCCUISH, A. C. - Infection and severe diabetic decompensation. **Practitioner**, 213:813 - 818, 1974.
- CANNON, G. & HILLS, W. - Secondary aspergillosis (*Aspergillus niger*) Superimposed upon bronchiectasis. **Thorax surg.**, 4:533 - 535, 1935.
- CHANDLER, F. W. - *In vivo* inhibition of *Legionella pneumophila* by *Aspergillus*. **Lancet**, 1: 994, 1981.
- CHAPARAS, S. D.; KAUFMAN, L.; KIM, S. J. & MC LAUGHLIN, L. W. - Characterization of antigens from *Aspergillus fumigatus*. Reactivity in immunodiffusion tests with serum from patients with aspergillosis caused by *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* and *Aspergillus fumigatus*. **Am. Rev. Respir. Dis.**, 122:647 - 650, 1988.
- CHAPLIN, A. J. - Histopathological occurrence and characterization of calcium oxalate a review. **J. Clin. Pathol.**, 30:800, 1977.
- CLELAND, W.W.& JOHNSON, M.J.-Studies on the formation of oxalic acid by *Aspergillus niger*.**J.Biol.Chem.**, 220:595-600, 1956.
- COHEN, M. S.; BROOK, C. J.; NAYLOR, B.; PLOUFFE, J.; SILVA, Jr., J.; & WEG, J. G. - Pulmonary phycomycetoma in a patient with diabetes mellitus. **Am. Rev. Respir. Dis.**, 116: 519 - 523, 1977.
- COHEN, M. S.; ISTURY, R. E.; MALECH, H. L.; ROOT, R. K.; WILFERT, C. M.; GUTMAN, L. & BUKELEY, R. T. - Fungal infection in chronic granulomatous disease: the importance of the phagocyte in defense against fungi. **Am. J. Med.**, 71:59 - 66, 1981.
- CORBEL, M.J.& EADES, M.-Examination of the effect of age and acquired immunity on the susceptibility of mice to infection with *Aspergillus fumigatus*. **Mycopathol.**, 60:79-85, 1977.

- CRUICKSHANK, A. H. & PAYNE, T. P. B. - Antipneumococcal powers of the blood in alloxan diabetes in rabbits. **Bull. Johns Hopkins Hosp.**, **84**:334, 1949.
- DE BRACCO, M. M.; BUDZO, D. B & NEGRONI, R. - Mechanisms of activation of complement by extracts of *Aspergillus fumigatus*. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, **5**:339, 1976.
- DIAMOND, R. D.; KRZESICKI, R.; EPSTEIN, B & JAO, W. - Damage to hyphal forms of fungi by human leucocytes in vitro: a possible host defense mechanism in aspergillosis and mucormycosis. **Am. J. Pathol.**, **91**:313 - 328, 1978.
- DIXON, D.M.;POLAK, A.&WALSH, T.J.-Fungus dose dependent primary pulmonary aspergillosis in immunosuppressed mice.**Infect. Immun.**, **57**:1452-1456, 1989.
- EDGE, J. R.; SANTSFIELD, D. & FLETCHER, D. E. - Pulmonary aspergillosis in an unselected hospital population. **Chest**, **59**: 407 - 413, 1971.
- ELDER, D. T. & BAKER, R.D. - Pulmonary mucormycosis in rabbits with alloxan diabetes, increased invasiveness of fungus during acute toxic phase of diabetes. **Arch. Pathol.**, **61**:159 - 168, 1956.
- EMILIANE, E. & BEKES, P. - Enzymatic oxalate decarboxylation in *Aspergillus Niger*. **Arch Chem. Biophys.**, **488**:105, 1964.
- EPSTEIN, S. M.; VERNEY, E.; MIALE, T. D. & SYDRANSKY, H. - Studies on the pathogenesis of experimental pulmonary aspergillosis. **Am. J. Pathol.**, **51**:770 - 788, 1967.

- FARLEY, M. L.; MALBRY, L. & MUÑOZ, L. A. - Oxalic acid level in bal fluid from patients with invasive pulmonary Aspergillosis. **Am. Rev. Respir. Dis.**, **133**:709, 1986
- FARLEY, M. R.; MALBRY, L. C.; MUÑOZ, L. A. & DISERENS, H. W. - Crystals occurig in punonary cytology specimes. Assotiation with **Aspergillus** infection. **Acth Cytol.**, **29**:737 - 744, 1985.
- FORD, S. & FRIEDMAN, L. - Experimental study of the pathogenicity of aspergilli for mice. **J. Bacteriol.**, **94**: 928 - 933, 1967.
- FORD, S; BAKER, R.D. & FRIEDMAN, L. - Celular reactions and pathology in experimental disseminated aspergillosis.. **J. Infect. Dis.**, **118**: 370, 1968.
- FRANCOME, W. H. & TOWNSEND, S. R. - Pancytopenia and disseminated aspergillosis. **Canad. Med. Ass. J.**, **92**:81, 1965.
- FRASER, R. G. & PARÉ, J. A. P. - Infectious diseases of the lungs. In: _____ - **Diagnosis of diseases of the chest**. 3rd ed. Philadelphia, W. B. Saunders, 1989. v. 2. chap. 6. p. 988 - 1016.
- FRONTLING, R. A. & SHADOMY, H. J. - An overview of macrophage fungal interections. **Mycophatol.**, **93**:77 - 93, 1986.
- GEFTER, W.; WEINGRAD, T. P.; EPSTEIN, D. M.; OCHS, R. H. & MÜLLER, W. T. - "Semi - invasive" pulmonary aspergillosis. **Radilogy**, **140**:313 - 321, 1981.
- GEMEINHARDT, H.; ECKERT, H. & FISHER, P. - Localized aspergillosis of the lung caused by **Aspergillus niger**. **Z. Erkrank. Atm. Org.**, **159**:289 - 291, 1982.
- GERGOVICH, F. G.; RICHMAN, S. P; RODRIGUEZ, U.; LUNA, M.; MC CREDIE, K. B. & BODEY, G. A. - Sucessful control of systemic **Aspergillus Niger** infections in two patients with acute leucemia. **Cancer**, **36**: 2271 - 2276, 1975.

- GHIO, A. J.; PETERSEIM, D. S.; ROGGLI, V. L. & PIANTADOSI, C. A. - Pulmonary oxalate deposition associated with *Aspergillus niger* infection. An oxidante hypothesis of toxicity. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **145**:1499 - 1502, 1992.
- GREENBERG, D.; AMANAN, A. J.; WARA, D. W. & KALTRUDIS, H. B. - Immunity to *Aspergillus* to patients with chronic granulomatous disease. *J. Pediatr.*, **90**:601, 1977.
- GROCOTT, R. C. - A stain for fungi in tissue sections and smears using gomori's methenamine - silver nitrate technic. *Am. J. Clin. Pathol.*, **25**:975 - 979, 1955.
- GUGNANI, H. C.; OKAFOR, B. C.; NZELIBE, F. & NJOKU - OBI, A. N. U. - Etiological agents of otomycosis in Nigeria. *Mycoses*, **35**:224 - 229, 1989.
- HANSEN, K. - Schimmelpitz asthma verhandl. d. deutsch. geselesch. f. *Imm. Med.* **40**:204, 1928
- HARA, M. ; MISUGI, K. & SHIMANOUCHE, H. - Aspergilloma by *Aspergillus niger* with calcium oxalate deposition. *Yokohama Med. Bull.*, **27**:115 - 121, 1976.
- HERNANDEZ, C. D. - Infecciones oticas por *Aspergillus*. *An. Iber. Amer.*, **5**:535 - 544, 1990.
- HETHERINGTON, L. H. - Primary Aspergillosis of the lungs. *Am. Rev. Tuberc.*, **47**:107 - 108, 1943.
- HORN, C. R.; WOOD, N. C. & HUGHES, J. A. - Invasive aspergillosis following post - influenza pneumonia. *Br. J. Dis. Chest*, **77**:407416, 1983.
- HUTTER, R.V.P.& COLLINS, H.S.- The occurence of opportunistic fungus infections in a cancer hospital. *Lab. Invest.*, **11**:1035, 1962.

- ISRAEL, H. L. & OSTROW, A. - Sarcoidosis and aspergilloma. **Am. J. Med.**, 47:243 - 250, 1969.
- JAIN, S. K.; AGRAWAL, R. L. & AGRAWAL, M. - *Aspergillus* infection in pulmonary tuberculosis. **Indian J. Med. Sci.**, 36: 48 - 51, 1982.
- JOHNSTON, R. B. Jr. & BAEHNER, R. L. - Chronic granulomatous disease. Correlation between pathogenesis and clinical findings. **Pediatrics**, 48:730, 1971.
- KAUFFANAN, C. A.; WILSON, K. J. & SCHWARTZ, D. B. - Necrotising pulmonary aspergillosis with oxalosis. **Mykosen**, 27:535 - 538, 1984.
- KOPP, B.; CUSMAN, M. W.; FOTTER, R.; STEINER, H.; BEAUFORT, F. & STAMMBERGER, A. - Aspergillosis of the paranasal sinuses. **Radiology**, 156:715 - 716, 1985.
- KURREIN, F.; GREEN, G. H. & ROWLES, S. L. - Localized deposition of calcium oxalate around a pulmonary *Aspergillus niger* fungus ball. **Am. J. Clin. Pathol.**, 64: 556 - 563, 1975.
- LANDAU, J. W.; NEWCOMER, V. P. & SCHULTZ, J. - Aspergillosis report of two instances in children associated with acute leukemia and review of the pertinent literature. **Mycopathol. Mycol. Appl.**, 20:177 - 224, 1963.
- LEE, E. T. - Examples of survival data analysis. In _____ - **Statistical Methods for Survival Data Analysis**. California, Life time Learning Publications, 1980. p. 20 - 43.
- LEE, S. H.; BARNES, W. H. & SCHALTZEL, W. P. - Pulmonary aspergillosis and the importance of oxalate crystal recognition in cytology specimens. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, 110:1176 - 1179, 1986.



- LEMOS, L. B. & JENSEN, A. B. - Pathology of aspergillosis. In: AL - DOORY, Y. & WAGNER, G. E.. (eds.). **Aspergillosis**. Springfield. Charles C. Thomas, pub, 1985. Chap. 10. p. 156 - 193.
- LÉPINE, P.; CADILLON, J. & CHAUMONT, L. - In: MASSON & CIE (éd.). **Manuel des inoculations et prelevements chez les animaux de laboratoire**. 6 ed. Boul saint - germain, Paris, 1964. p. 8 - 9.
- LONDERO, A. T. & GUADALLUPE - CORTÉS, J. M. - Aspergiloses pulmonares. **J. Pneumol.**, 16:78 - 90, 1990.
- LOUTHERENOO, W.; PARK, W. S.; PHILLIPPE, L. & SCHUMACHER Jr., R. - Localized peripheral calcium oxalate crystals deposition caused by **Aspergillus niger** infection. **J. Reumatol.**, 17:407 - 412, 1990..
- LUKENS, F. D. W. - Alloxan diabetes. **Physiol. Rev.**, 28: 304, 1948.
- MAHVI, T. H.; WEBB, H. M.; DIXON, C. D. & BONE, J. A. - Systemic aspergillosis caused by **Aspergillus niger** after open heart surgery. **Jama.**, 203:178 - 180, 1968.
- MERKOW, L.P. ; SHIELDON, M.E.;SIDRANSKY, H. ;VERNEY, E.M.S.& PARDO, M-.The pathogenesis of experimental pulmonary aspergillosis.**Am.J.Pathol.**, 62:57-74, 1971.
- METZER, J.B. ; GARAGUSI, V.F. & KERWIN, D.M.-Pulmonary oxalosis caused by **Aspergillus niger**.**Am.Rev.Respir.Dis.**, 129:501-502, 1894.
- MITCHEL, K. M. - Coexisting bacterial pyelonephirites and bilateral uretral fungus ball in a diabetic patient. **J. Flórida M.A.**, 77: 596 - 599, 1990.
- MOORE, R. S.; HASLETON, P. S.; BAWSON, R. & STANBRIDGE, T. N. - **Aspergillus niger** endocarditis complicating aortic tissue valve replacement. **Thorax**, 39:76 - 77, 1984.

- MÜLLER, H. M. - Oxalate acumulation from citrate by *Aspergillus niger*. Biosynthesis of oxalate from it's ultimate precursor. *Arch. Microbiol.*, **103**:185 - 189, 1975.
- MÜLLER, H. M. & FROSH, S. - Oxalate accumulation from citrate by *Aspergillus niger*. 1. Involvement of the tricarboxylic acid cycle. *Arch. Microbiol.*, **104**:159 - 162, 1975.
- MÜLLER, H. M. & FROSH, S. - Oxalate acumulation from citrate by *Aspergillus niger*. 2. Involvement of the tricarboxilic acid cycle. *Arch. Microbiol.*, **104**:159 - 162, 1975.
- NIME, F. A. & HUTCHINS, G. M. - Oxalosis caused by *Aspergillus* infection. *Jhons Hopkins Med. J.*, **133**:183 - 194, 1973.
- OKUDARIA, M. - Detection of fungi in tissues. In: HOWARD, D. H. (ed). *Fungi pathogenic for humans and animals (in three parts)*. New York. Marcel Decker inc., 1985. pt. 811., chap. 7. p. 229 - 283.
- OPAL, S.; ASP, A. A.; CANNADY, Jr., P. B.; BURTON, L. J. & HAMMER, P. G. - Efficacy of infection control measures during a nosocomial outbreak of disseminated aspergillosis associated with hospital construction. *J. Infect. Dis.*, **153**:634 - 637, 1986.
- PAL, M. - *Aspergillus niger* associated with mycotic abortion in a buffalo (*Bubalus bubalis*). *Mycosis*, **31**:17 - 19, 1988.
- PANKE, T. W.; MC MANUS, A. T. & SPEBAR, M. J. - Infection of a burn wound by *Aspergillus niger*. Gross appearance simulating ecthyma gangrenosa. *Am. J. Clin. Pathol.*, **73**: 230 - 232, 1979.
- PEÑA, C. E. - Aspergilosis. In:BAKER, R. D. (ed.). *The pathologic anatomy of mycoses*. Berlin, Springer - Verlag, 1971. p. 762 - 831.

- PENNINGTON, J.E. - *Aspergillus* lung disease. *Med. Clin. North Am.*, **64**:475-490, 1980.
- _____ - Opportunistic Fungal Pneumonias: *Aspergillus*, *Mucor*, *Candida* and *Torulopsis*. In: _____ - *Respiratory Infections Diagnosis and Management*. 2nd. ed. New York, Raven Press, 1983. p. 329 - 337.
- PERILLIE, P. E.; NOLAN, J. P. & FINCH, J. C. - Studies on the resistance to infection on diabetes mellitus. Local exudative cellular response. *J. Lab. Clin. Med.*, **59**:1008, 1962.
- PERVEZ, N. K.; KLEINERMAN, J. & KATTAN, M. - Pseudomembranous necrotizing bronchial aspergillosis. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **131**:961 - 963, 1985.
- POLLAK, L. & ORTEGA, A. A. - Las micosis bronchopulmonares en Venezuela. *Thorax*, **16**:135 - 145, 1967.
- RAPER, K.B. & FENNELL, D.I. - *The genus Aspergillus*. New York, Robert E. Kriger, pub CO, 1977.
- REPENTIGNY, L.; PETITBOI, S.; BOUSHIRA, M. I.; MICHALISZYN, E.; SÉNÉCHAL, S.; GEMDRON, N. & MONTPLAISIR, S. - Aquirid immunity in experimental murine aspergillosis is mediated by macrophages. *Infect. Immunol.*, **61**:3791 - 3802, 1993.
- REYES, C. V.; KATHURIA, S. & MAC GLASHAN, A. - Diagnostic value of calcium oxalate crystals in respiratory and pleural fluid cytology. A case report. *Acta Cytol.*, **23**: 65 - 68, 1979.
- RHAME, F. S. - Prevention of nosocomial aspergillosis. *J. Hosp. Infect.*, **18**: 466 - 472, 1991. (Suppl.).

- RIPPON, J. W. & REYES, C. V. - Localized oxalosis associated with simultaneous *Aspergillus* and mucor infection in diabetic foot gangrene. **Human Pathol.**, **15**:89 - 91, 1984.
- ROSEN, P. P. - *Aspergillus niger*. **Am. J. Clin. Pathol.**, **75**:440, 1981. (Letter).
- RUBIN, R. H. - Fungal Infections in the Immunocompromised host. In: FISHMAN, A. P. - **Pulmonary Diseases and Disorders**. 2nd ed. São Paulo, Mc Graw - Hill Book Company, 1988. v. 2. chap. 110. p. 1761 - 1767.
- SALFELDER, K.; LISCANO, T. R. & SAUERTEIG, E. - Aspergillosis. In: _____ - **Atlas of fungal pathology**. Kluwer Academic Publishers, Hingham, 1990. v. 17. p. 38 - 44.
- SANDHU, R. S.; MEHTA, S. K.; KHAN, Z. U.; & SINGH, M. M. - Role of *Aspergillus* and candida species in allergic bronchopulmonary mycosis. **Scand. J. Resp. Dis.**, **60**:235 - 242, 1979.
- SANDHU, D.K.; SANDHU, R.S.; DAMODARAN, V.N. & RANDHWA, H.S. - Effect of cortizone on bronchopulmonary aspergillosis in mice exposed to spores of various *Aspergillus* species. **Saborraudia**, **8**:32-38, 1970.
- SCHAFFENER, A. - Aquired immune deficiency syndrome is disseminated aspergillosis predictive of underlying celular immunodeficiency ?. **J. Infec. Dis.**, **149**:828 - 829, 1984.
- SCHAFFENER, A.; DOUGLAS, H.; BRAUDE, A. I. & DAVIS, C. E. - Killing of aspergillosis spores depends on the anatomical source of the macrophage. **Infec. Immunity**, **42**:1109 - 1983.
- SCHOFILD, R. A. & BAKER, R. D. - Experimental Mucormycosis (*Rhizopus*) infection in mice. The failure of chonic alloxan diabetes to modify host suscetibility. **Arch. Pathol.**, **61**:407 - 405, 1956.

- SCHOLER, H. J. - Thermophilia (termotolerance) of the aspergilli in relation to their pathogenicity. In: HALLER, R & SUTER, F. (eds.). **Aspergillosis and farmer's lung in man and animal**. Bern Hans Huber, Pub, 1974, p. 35 - 40.
- SEATON, A. & ROBERTSON, M. D. - **Aspergillus**, asthma and amoebae. **Lancet**, **1**:893 - 894, 1989.
- SEVERO, L. C. - Aspergilose. In: SILVA, L. C. C. (Ed.). - **Compêndio de pneumologia**. 2. ed. São Paulo, Fundação Byk, 1993. p. 619 - 628.
- SEVERO, L. C. - **Colonização intracavitária pulmonar por *Aspergillus niger*. Análise de suas peculiaridades**. Porto Alegre, 1987. (Tese - doutorado - Universidade Federal do Rio Grande do Sul)
- SEVERO, L. C. - Oxalose. **Arq. Bras. Med.** **61**:103 - 107, 1987.
- SEVERO, L. C.; HETZEL, J. L.; PALOMBINI, B. C.; PORTO, N. S.; NEGRETO, J. S. & LONDERO, A. T. - Aspergiloma pulmonar por ***Aspergillus niger***. Apresentação de caso. **J. Pneumol.**, **4**: 9 - 11, 1978.
- SEVERO, L. C.; LONDERO, A. T.; GEYER, G. R. & PICCON, P. D. - Oxalosis associated with an ***Aspergillus niger*** fungus ball. Report of a case. **Mycopathol.**, **73**:29 - 31, 1981.
- SHARMA, T. N.; GUPTA, P. R.; MEHROTRA, A. K. & PURIT, S. D. - Aspergilloma with ABPA due to ***Aspergillus niger***. **J. Assoc. Phys. India**, **33**:748, 1985.
- SHELDON, W. H. & BAUER, H. - Activation of quiescent mucormycotic granulomata in rabbits by induction of acute alloxan diabetes. **J. Exp. Med.**, **108**:171, 1958..
- SHELDON, W. H. & BAUER, H. - The role of predisposing factors in experimental fungus infectios. **Lab. Invest.**, **2**:1184 - 1191, 1962.

- SHELDON, W. W. & BAUER, H. - The development of the acute inflammatory response to experimental cutaneous mucormycosis in normal and diabetic rabbits. *J. Exp. Med.*, **110**:845 - 858, 1959.
- SIDRANSKY, H. & PEARL, M. A. - Pulmonary fungus infections associated with steroid and antibiotic therapy. *Chest*, **9**:630, 1961.
- SIDRANSKY, H. & VERNEY, E. - Experimental aspects - experimental aspergillosis. *Lab. Investig.*, **11**:1172 - 1183., part 2, 1962.
- SIDRANSKY, H.; EPSTEIN, S. M.; VERVEY, E. & HOROWITZ, C. - Experimental visceral aspergillosis. *Am. J. Pathol.*, **69**:55 - 67, 1972.
- SIDRANSKY, H. & FRIEDMAN, L. - The effect of cortisone and antibiotics agents on experimental pulmonary aspergillosis. *Am. J. Pathol.* **35**:169-179, 1959
- SIEGEL, S. - *Estatística não paramétrica*. 2. ed. Recife, Mc Graw - Hill do Brasil, 1979. 333p.
- SINGH, N.; VICTOR, L. Y. D. & RIHS, J. D. - Invasive aspergillosis in Aids. *South. Med. J.*, **84**:822 - 827, 1991.
- SINSKI, J. T. - The epidemiology of aspergillosis. In:AL - DOORY, Y. & WAGNER, G. E. (eds.). *Aspegillosis*. Springfield. Charles C. Thomas, pub, 1985. chap. 3. p. 25 - 42.
- SLUYTER, T. - De vegetabilibus organismi animalis parasitis, ac de novo epiphyto in pipyriasi versicolore obvio. *Diss. Inaug. Berolini*, p. 4. 1847.
- SMITH, W. - Disorders of oxalate metabolism. *Am. J. Med.*, **45**: 716 - 732, 1968.
- STUART, E. A. & BLANK, F. - Aspergillosis of the ear. *Can. Am. J.*, **72**:334 - 337, 1955.

- STURTEVANT, P. & LADGE, J. P. - Participation of complement in the phagocytosis of the conidia of *Aspergillus fumigatus* by human polymorphonuclear cells. **J. infect. Dis.**, **166**:580 - 586, 1992.
- SUGIMOTO, H. - Influence of cortisone or corticotropin on experimental aspergillosis in mice. **Am. Rev. Respir. Dis.**, **81**:801, 1960. (Abstrat).
- THIEMAN, J.E. - Fermentação por fungos. In: BACILA, M. **Curso de fisiologia de microorganismos**. Curitiba, Instituto de bioquímica da Universidade do Paraná, 1960. C. XVI. p. 275-295.
- THORTON, G. F. - Infection and diabetes. **Clin. Med. North. Am.**, **55**:931 - 938, 1971.
- TOIGO, A. - Pulmonary aspergillosis. **Am. Rev. Respir. Dis.**, **81**:392 - 396, 1960.
- TUAZON, C. V.; WASHBURN, R. C. & BENNET, S. E. - Phagocytosis and fungicidal activity of monocytes from patients with immunodeficiency syndrome. **J. Infect. Dis.**, **151**:565, 1985.
- TURNER, K. J.; HACKSHAW, R.; PAPADIMITRIOU, J. & PERROT, J. - The pathogenesis of experimental pulmonary aspergillosis in normal and cortisone treated rats. **J. Pathol.**, **118**:65 - 73, 1976.
- UTZ, J. P.; GERMAN, J. L.; LOURIA; D. B.; EMMONS, C. W. & BARTER, F. C. - Pulmonary aspergillosis with cavitation. Iodine therapy associated with an unusual electrolyte disturbance. **N. Engl. J. Med.**, **260**:264 - 268, 1959.
- VICKS, R. - Oxalosis in asbestosis. A study of calcium oxalate dehydrate crystalization on asbestos bodies. **Am. Rev. Respir. Dis.**, **133**:361, 1986. (Suppl.)
- VILLAR, T. G.; PIMENTEL, J. C.; & COSTA, M. F. - The tumor like forms of aspergillosis of the lung (pulmonary aspergilloma). A report of five new cases and a review of the Portuguese literature. **Thorax**, **17**:22 - 38, 1962.

- VIRCHOW, R. - Beitrage zur lehre von den beim menschen vorkommenden pflanzlichen parasiten. **Virchow's Arch. Pathol. Anat. Klin.** 9:557-593, 1856.
- WAGNER, G. E. - Introduction. In: AL-DOORY, Y. & WAGNER, G. E. (eds.). **Aspergillosis**. Springfield, Charles C. Thomas, pub, 1985, Chap. 1. p. 3 - 6.
- WAISBREN, B. A. - Alloxan diabetes in mice. **Proc. Soc Exp Biol. Med.**, 67:154, 1948.
- WALMSLEY, S.; DEVI, S.; KING, S. & SCHNEIDER, R. - Invasive **Aspergillus** infection in a pediatric hospital: a ten year review. **Pediatr. Infect. Dis.**, 12:673 - 682, 1993.
- WEILAND, D.; FERGUSON, R. M.; PETERSON, P. K.; SNOVER, D. C.; SIMMONS, R. L. & NAJARIAN, J. S. - Aspergillosis in 25 renal transplant patients. **Ann. Surg.**, 198:622 - 629, 1983.
- WERTMAN, K. F. & HENNEY, M. D. - The effects of alloxan diabetes on phagocytoses and susceptibility to infection. **J. Immunol.**, 89:314 - 317, 1962.
- WHEAT, L. J. - Infections and diabetes mellitus. **Diabetes care**, 3:187, 1980.
- WIGGINS, J.; CLARK, T. J. K. & CORRIN, B. - Chronic necrotising pneumonia caused by **Aspergillus niger**. **Thorax**, 44:440 - 441, 1989.
- WILLIAMS, H. E. & SMITH, Jr., L. H. - Primary Hiperoxaluria. In: STAMBURY, J. B.; WYNGAARDEN, J. B.; FREDRICKSON, D. S.; GALASTEIN, L. L. & BROWN, M. S. - **The metabolic basis of inherited disease**. 5nd ed. New York, MacGraw - Hill Book Company, 1983. chap. 10. p. 204 - 228.
- WOBESER, G. & SAUDERS, J. R. - Pulmonary oxalosis in association with **Aspergillus niger** infection in a great horned owl (*Bubo Virginianus*). **Avian Dis.**, 19:388 - 392, 1975.

- WOLSCHLAGER, C. & KHON, F. - Aspergillomas complicating sarcoidosis. A prospective study in 100 patients. **Chest**, **86**:585 - 588, 1984.
- YAMAGUCHI, M.; MISHIYA, H.; MANO, K.; KUNII, O. & MIYASHITA, H. - Chronic necrotizing pulmonary aspergillosis caused by *Aspergillus niger* in a mildly immunocompromised host. **Thorax**, **47**:570 - 571, 1992.
- YOUNG, R. C.; BENETT, J. E. & VOGEL, C. L. P. - Aspergillosis: spectrum of the disease in 98 patients. **Medicine**, **49**:147 - 173, 1971.
- ZAROR, L.; FICHMAN, O.; SUZUKI, F. A.; & FELIPE, R. G. - Otomycosis in São Paulo. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **3**:169 - 173, 1991.
- ZOOK, B. C. & MIGAKI, G. - Aspergillosis in animals. In: AL-DOORY, Y. & WAGNER, G. (eds.). **Aspergillosis**. Springfield. Charles C. Thomas, pub, 1985, chap. 12. p. 207 - 256.