

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MATO GROSSO DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS E  
PARASITÁRIAS**

**NATHÁLIA ANTUNES MACIEL**

**ANÁLISE DAS CÉLULAS HEMATOLÓGICAS E DO METABOLISMO DO  
FERRO NA ASPERGILOSE PULMONAR CRÔNICA**

**Campo Grande - MS  
2025**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MATO GROSSO DO SUL**

**NATHÁLIA ANTUNES MACIEL**

**ANÁLISE DAS CÉLULAS HEMATOLÓGICAS E DO METABOLISMO DO  
FERRO NA ASPERGILOSE PULMONAR CRÔNICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-  
graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias  
da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul,  
para a obtenção do título de mestre  
Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Anamaria M. M. Paniago  
Coorientadora: Dr<sup>a</sup> Eliana da C. A. de Brito

**Campo Grande - MS  
2025**

**NATHÁLIA ANTUNES MACIEL**

**ANÁLISE DAS CÉLULAS HEMATOLÓGICAS E DO METABOLISMO DO  
FERRO NA ASPERGILOSE PULMONAR CRÔNICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, para a obtenção do título de mestre

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Anamaria M. M. Paniago

Coorientadora: Dr<sup>a</sup> Eliana da C. A. de Brito

Campo Grande, MS, 24 de fevereiro de 2025

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

Dr<sup>a</sup> Anamaria Mello Miranda Paniago  
Universidade Federal do Mato Grosso do Sul

---

Dr James Venturini  
Universidade Federal do Mato Grosso do Sul

---

Dr<sup>a</sup> Jeniffer Michelline de Oliveira Custódio  
Centro Universitário Unigran Capital

---

Dr<sup>a</sup> Cláudia Elizabeth Volpe-Chaves  
Universidade Federal do Mato Grosso do Sul

---

Dr Vinicius Soares de Oliveira  
Centro Universitário Unigran Capital

## DEDICATÓRIA

A todos que um dia confiaram no meu potencial e me deram forças pra seguir em frente. Aos meus pais, avós e amigos que sempre são a luz no fim do túnel

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, pela Sua onisciência, onipresença e onipotência, que transformaram a oração de querer ser mestre em realidade. Deus foi meu porto seguro em todas as dificuldades, iluminando cada passo desta jornada. Também a Maria, mãe de Deus que tanto roga por mim.

À minha mãe, Sueli, que sonha comigo, torce e reza pelo meu sucesso com um amor incondicional. Ao meu pai, Marildo, que, mesmo em meio às turbulências, sempre esteve presente. Aos meus avós Cleusa, Nabor, Isaura e Mário (in memoriam), que não só auxiliaram na minha criação, mas continuam fazendo tudo por mim como se eu ainda fosse criança. Tenho certeza de que vocês, junto com toda a família — tios, tias, primos, primas, madrinhas e padrinhos —, vibram com cada conquista minha e se orgulham de cada passo que dou.

Aos meus maiores confidentes, a quem costumo chamar de minha "primeira camada da eletrosfera": Grazielle, Livia e Reinaldo. Vocês são os melhores amigos do mundo, sempre prontos para me ouvir, mesmo quando estou falando sobre coisas que não fazem parte do universo de vocês, por me ajudar e compartilhar momentos de alegria. Espero, de coração, conseguir retribuir todo o carinho, amor e cuidado que têm por mim. Sem vocês para me amparar no caos e dividir as conquistas, essa caminhada teria sido muito mais difícil.

Às minhas companheiras de pós-graduação, o trio que me acolheu e cuidou de mim nesses dois anos de mestrado: Danielle, Thaynara e Wesllaine. Vocês foram muito mais do que colegas — foram parceiras de risos, lágrimas e até de almoços, quando me ajudavam pacientemente a cortar a carne, já que eu tenho dificuldade com facas (risos). Um agradecimento especial à Taynara (técnica), que foi uma das primeiras pessoas a me acolher no LabDip. Ela me ensinou muito, me ajudou em diversas ocasiões e acabou se tornando minha parceira de açaí, sorvete e boas conversas. Vocês se tornaram amigas próximas, e, em um caso especial, uma de vocês acabou entrando oficialmente para a minha família. É um privilégio poder contar com a amizade e o carinho de vocês.

Ao Arthur, pelas risadas e por me ensinar as técnicas do Elisa; à Maricelma, por sua doçura e empatia que me acolheram sempre; ao Matheus, que, com paciência e generosidade, me ouviu, aconselhou e apoiou sempre que precisei; e à

Francine, cuja amizade e disponibilidade para trocar experiências tornaram o dia a dia mais leve e inspirador. A amizade de vocês é uma dádiva diária.

Ao Alexandre (infectologista), meu irmão de orientação, parceiro em todas as etapas do trabalho, desde a coleta de dados até o atendimento ambulatorial. Sua ajuda foi essencial desde o primeiro dia em que nos conhecemos em sala de aula.

Um médico excepcional, cuja amizade e parceria foram inestimáveis.

Aos orientandos da Dra. Anamaria, que sempre compartilharam tempo e conhecimento durante as reuniões do RADIF. Em especial, ao acadêmico Vinícius, que me ajudou diretamente na coleta de dados, tornando possível a conclusão deste trabalho.

Aos mestrandos e doutorandos Claudia, Jade, Alexandre, Wesley, Hafsa, Dality, Angelis, e aos meninos da iniciação científica Rafael, João Marcos e Célio. À técnica Priscilla e à Vivian, que já não faz parte da equipe, à Lucimar da coleta do Covid. Vocês foram parte essencial do meu percurso, contribuindo com aprendizados e momentos especiais.

À Dra. Bárbara, uma pessoa por quem tenho imensa admiração e carinho. Sua paciência e generosidade foram indispensáveis em tantos momentos. Obrigada por me ajudar e compartilhar seu conhecimento, espero um dia ser capaz de retribuir.

Ao professor Dr. Wellington, da biologia molecular, sempre disposto a nos ajudar com as ferramentas tecnológicas e a compartilhar seu vasto conhecimento. À professora Dra. Adriana França, de quem aprendi tanto sobre a docência e com quem construí uma relação de respeito e amizade que guardo com muito carinho. À professora Dra. Ana Paula, pela generosidade e pela oportunidade de participar de seus projetos, que tanto admiro. Ao professor Dr. James, o “cérebro” do nosso laboratório, sempre disponível e incansável em nos apoiar.

Aos profissionais do Hospital Dia, incluindo as meninas da recepção, a equipe de enfermagem (em especial Vânia, Diana, Adriana, Josival, Luís e Ivair), a farmacêutica Fernanda, a equipe médica (em especial Dra. Cláudia) e os residentes de infectologia, que me proporcionaram momentos valiosos de aprendizado e crescimento. Também agradeço ao Marco Aurélio, cuja amizade foi uma grata surpresa durante o seu pós-doc.

Aos pacientes que deram seu consentimento e fizeram possível essa pesquisa.

À UFMS, instituição que me acolheu durante esses dois anos e vai acolher pelos próximos quatro anos, como também as instituições de fomento que fizeram possível este trabalho ser concluído, e a banca de defesa e qualificação com doutores de excelência, em especial ao Dr. Vinicius Oliveira da Unigran Capital, quem me inspirou em muitos momentos na graduação, me orientou no TCC e até hoje se mantém solícito para quando necessito.

O agradecimento mais especial vai àquelas que foram primordiais para minha formação e para a concretização deste título. À minha coorientadora, Dra. Eliana, que, com paciência e dedicação, me apresentou ao universo das análises estatísticas e me guiou em muitos outros aspectos, especialmente no estudo sobre o metabolismo do ferro. Sua generosidade e atenção em compartilhar conhecimento fizeram toda a diferença em minha trajetória acadêmica.

E, especialmente, à minha orientadora Dra. Anamaria, que transformou um simples e-mail em um divisor de águas na minha vida. Em 7 de outubro de 2022, enviei mensagens para vários orientadores pedindo uma chance de orientação. Todas ficaram sem resposta, exceto a sua. Foi a sua resposta que abriu as portas para que esse sonho se tornasse realidade, e hoje sou imensamente grata por todos que não me responderam. Cada "não" silencioso me levou até o privilégio de ser orientada por alguém tão excepcional como você.

Minha eterna gratidão a vocês duas, que aceitaram a missão de me orientar e, mais do que isso, me ajudaram a me transformar e a alcançar o título de mestre. Este marco em minha vida é, em grande parte, fruto do compromisso, da paciência e da dedicação de vocês.

A todos que mencionei e também àqueles que, mesmo de forma breve, passaram pela minha vida e deixaram sua contribuição: obrigada por cada momento de aprendizado e evolução pessoal.

## EPÍGRAFE

“Aprenda todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana seja apenas outra alma humana.”  
- Carl Jung

## RESUMO

A aspergilose pulmonar crônica (APC) é uma infecção fúngica causada por *Aspergillus* spp., frequentemente observada em pacientes com lesões pulmonares preexistentes, como aquelas resultantes de tuberculose pulmonar (TBP) e outras infecções pulmonares. Os sintomas típicos incluem tosse crônica, perda de peso, dispneia, hemoptise e escarro hemoptoico. Este estudo visa compreender o impacto da APC nas células hematológicas e no metabolismo do ferro de pacientes com a doença. Foram analisados dados de uma coorte de 14 pacientes com APC atendidos entre janeiro de 2016 e julho de 2024 no Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian, em Campo Grande-MS. Os critérios de inclusão envolveram pacientes com 18 anos ou mais, diagnosticados com APC, cujos exames laboratoriais foram analisados em dois momentos: no início do tratamento e após seis meses de uso de itraconazol. Foram avaliadas variáveis clínicas e exames laboratoriais, incluindo hemograma, proteína C reativa (PCR), ferro sérico, capacidade total de ligação do ferro (TIBC), índice de saturação de transferrina (ISAT), ferritina, hepcidina e interleucina 6 (IL-6). Os testes estatísticos utilizados para análise foram o teste de normalidade de Shapiro-Wilk, qui-quadrado, teste T de Student, teste de Mann-Whitney, coeficiente de correlação de Pearson ou Spearman, e o p considerado significativo foi  $<0,05$ . No início do tratamento, 57,1% dos pacientes apresentaram anemia, com leucocitose observada em 35,7% dos casos. A linfopenia relativa foi encontrada em 64,3% dos pacientes e a monocitose relativa em 42,9%. A PCR estava elevada em 66,7% dos pacientes, indicando um quadro inflamatório ativo. Além disso, 61,5% dos pacientes apresentaram deficiência de ferro, refletindo um comprometimento do metabolismo do ferro. As principais comorbidades associadas aos pacientes foram a tuberculose pulmonar (TBP), que foi a mais prevalente, seguidas por doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), asma e pneumonias, que podem ter contribuído para a vulnerabilidade à infecção fúngica por *Aspergillus* spp. Após seis meses de tratamento antifúngico, anemia persistiu em 54,5% dos pacientes, e a PCR continuou elevada em mais da metade dos pacientes, indicando que a resposta terapêutica na APC é lenta e nem sempre leva à resolução completa dos marcadores inflamatórios, junto a uma persistência de leucocitose. A persistência da inflamação é consistente com a literatura, que sugere que o tratamento da APC pode não suprimir totalmente a atividade inflamatória nos primeiros meses, dependendo da gravidade do acometimento pulmonar. Foi possível observar correlações entre a IL-6 e nível sérico de ferro e eritrócitos, mostrando que ambos estão reduzidos no processo inflamatório. O monitoramento contínuo do perfil hematológico e do metabolismo do ferro é crucial para avaliar a resposta ao tratamento e a evolução clínica de pacientes com APC. A análise dos parâmetros inflamatórios e hematológicos pode fornecer informações importantes sobre a progressão da doença e o impacto do tratamento antifúngico, que demonstrou promover uma modulação da resposta inflamatória, embora de forma gradual.

**Palavras chave:** *Aspergillus*. Anemia da inflamação. Aspergilose pulmonar crônica. Hepcidina. Interleucina 6.

## ABSTRACT

Chronic pulmonary aspergillosis (CPA) is a fungal infection caused by *Aspergillus* spp., often observed in patients with preexisting lung lesions, such as those resulting from pulmonary tuberculosis (TB) and other pulmonary infections. Typical symptoms include chronic cough, weight loss, dyspnea, hemoptysis, and hemoptoic sputum. This study aims to understand the impact of CPA on hematological cells and iron metabolism in affected patients. Data from a cohort of 14 CPA patients treated between January 2016 and July 2024 at the Maria Aparecida Pedrossian University Hospital in Campo Grande-MS were analyzed. The inclusion criteria involved patients aged 18 or older, diagnosed with CPA, whose laboratory tests were analyzed at two time points: at the beginning of treatment and after six months of itraconazole use. Clinical variables and laboratory tests were assessed, including hemogram, C-reactive protein (CRP), serum iron, total iron-binding capacity (TIBC), transferrin saturation index (TSI), ferritin, hepcidin, and interleukin-6 (IL-6). Statistical tests used for analysis were the Shapiro-Wilk normality test, chi-square, Student's t-test, Mann-Whitney test, Pearson or Spearman correlation coefficient, with a significance level set at  $p < 0.05$ . At the start of treatment, 57.1% of patients had anemia, with leukocytosis observed in 35.7% of cases. Relative lymphopenia was found in 64.3% of patients and relative monocytosis in 42.9%. CRP was elevated in 66.7% of patients, indicating an active inflammatory process. Additionally, 61.5% of patients had iron deficiency, reflecting a disruption in iron metabolism. The main comorbidities associated with patients were pulmonary tuberculosis (TB), which was the most prevalent, followed by chronic obstructive pulmonary disease (COPD), asthma, and pneumonia, which may have contributed to vulnerability to *Aspergillus* spp. fungal infection. After six months of antifungal treatment, anemia persisted in 54.5% of patients, and CRP remained elevated in more than half of the patients, indicating that the therapeutic response in CPA is slow and does not always lead to the complete resolution of inflammatory markers, along with persistent leukocytosis. The persistence of inflammation is consistent with the literature, which suggests that the treatment of CPA may not fully suppress the inflammatory activity in the first few months, depending on the severity of the pulmonary involvement. Correlations between IL-6 and serum iron and erythrocytes were observed, showing that both are reduced in the inflammatory process. Continuous monitoring of the hematological profile and iron metabolism is crucial for evaluating the response to treatment and the clinical progression of CPA patients. Analysis of inflammatory and hematological parameters can provide important insights into disease progression and the impact of antifungal treatment, which has shown to promote modulation of the inflammatory response, although gradually.

**Keywords:** *Aspergillus*. Inflammation anemia. Chronic pulmonary aspergillosis. Hepcidin. Interleukin 6.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Representação esquemática dos aspectos morfológicos de fungos do gênero <i>Aspergillus</i> spp.....	17
<b>Figura 2</b> - TC de tórax com presença dos achados de cavitação e bola fúngica no lobo superior direito.....	26
<b>Figura 3</b> - <i>A. fumigatus</i> em lâmina após crescimento em cultura macroscopicamente e corado com azul lactofenol de algodão para análise microscópica.....	27
<b>Figura 4</b> - Representação da perda de sangue na hemoptise.....	33
<b>Figura 5</b> - Representação da regulação da proteína hepcidina.....	34
<b>Figura 6</b> - Citocinas inflamatórias e proteína envolvidas no metabolismo do ferro...	35
<b>Figura 7</b> - Representação dos gráficos de correlação de Pearson e Spearman conforme teste de normalidade .....	52

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Síndromes clínicas de doença pulmonar causada por <i>Aspergillus</i> spp... 19
<b>Tabela 2</b> - Diagnóstico da APC ..... 24
<b>Tabela 3</b> - Classificação das anemias de acordo com variáveis laboratoriais..... 33
<b>Tabela 4</b> - Características demográficas e clínicas dos pacientes com APC ..... 46
<b>Tabela 5</b> - Sintomas apresentados pelos pacientes com APC na inclusão e após 6 meses da instituição do tratamento ..... 47
<b>Tabela 6</b> - Alterações observadas nos exames iniciais e após 6 meses..... 48
<b>Tabela 7</b> - Mediana dos parâmetros laboratoriais iniciais e após 6 meses ..... 49
<b>Tabela 8</b> - Características gerais dos parâmetros dos exames laboratoriais, tipo de anemia característica e presença de hemoptise..... 50
<b>Tabela 9</b> - Sexo, idade e comorbidade pulmonar prévia e classificação da APC..... 51

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ABPA: Aspergilose broncopulmonar alérgica
- ADC: Anemia da doença crônica
- AI: Aspergilose invasiva
- APC: Aspergilose pulmonar crônica
- APCC: Aspergilose pulmonar cavitária crônica
- APFC: Aspergilose fibrosante crônica
- APISA: Aspergilose pulmonar invasiva subaguda
- AS: Aspergiloma simples
- CAPA: Aspergilose pulmonar associada à COVID-19, da língua inglesa *COVID-19-associated Pulmonary Aspergilosis*
- CIE: Contraimunoeletroforese
- DMT 1: Transportador de metal divalente 1, da língua inglesa *Divalent Metal Transporter 1*
- DPOC: Doença pulmonar obstrutiva crônica
- Elisa: Ensaio imunoenzimático, da língua inglesa *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
- Fe<sup>+2</sup>: Ferro heme
- Fe<sup>+3</sup>: Ferro não heme
- GAFFI: Fundo de Ação Global para Infecções Fúngicas, da língua inglesa *Global Action Fund for Fungal Infections*
- GM: Galactomanana
- HCM: Hemoglobina corpuscular média
- HCP1: Proteína transmembrana, da língua inglesa *Heme Carrier Protein 1*
- HGB: Hemoglobina
- IAPA: Aspergilose pulmonar associada à Influenza, da língua inglesa *Influenza-Associated Pulmonary Aspergillosis*
- IDD: Imunodifusão dupla em gel de ágar
- IFN- $\gamma$ : Interferon gama, da língua inglesa *Interferon-gamma*
- IgG: Imunoglobulina G
- IL-1  $\beta$ : Interleucina-1 beta
- IL-6: Interleucina-6
- ISAT: Índice de saturação da transferrina

JAK: janus quinase, na língua inglesa *janus kinase*

LBA: Lavado broncoalveolar

MNT: Micobactérias não tuberculosas

PCR: Proteína c reativa

RX: Raio-x

STAT 3: Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3, na língua inglesa *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*

TB: Tuberculose

TBP: Tuberculose pulmonar

TC: Tomografia computadorizada

TIBC: Capacidade total de ligação do ferro, da língua inglesa *Total Iron Binding Capacity*

TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral alfa, da língua inglesa *Tumor Necrosis Factor-alpha*

UTI: Unidade de terapia intensiva

VCM: Volume corpuscular médio

## SUMÁRIO

<b>1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....</b>	<b>16</b>
1.1 <i>Aspergillus</i> spp.....	16
1.2 Espectros da aspergilose .....	18
1.3 Aspergilose pulmonar crônica .....	20
1.3.1 Epidemiologia .....	20
1.3.2 Patogênese .....	21
1.3.3 Classificação clínica da APC.....	22
1.3.4 Diagnóstico.....	24
1.3.5 Imunodiagnósticos.....	28
1.3.6 Tratamento .....	30
1.3.7 Metabolismo do ferro e alterações laboratoriais na APC.....	31
<b>2. RACIONAL DA PESQUISA .....</b>	<b>40</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>41</b>
3.1 Objetivo geral.....	41
3.2 Objetivos específicos .....	41
<b>4. METODOLOGIA.....</b>	<b>42</b>
4.1 Aspectos éticos.....	42
4.3 Alocação dos participantes .....	42
4.4 Variáveis demográficas, clínicas, laboratoriais e epidemiológicas.....	43
4.5 Procedimentos realizados .....	43
4.6 Classificação da anemia com baixos níveis de ferro sérico.....	44
4.7 Análise de dados .....	44
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>46</b>
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>55</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>61</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>62</b>

## 1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 1.1 *Aspergillus* spp

O gênero *Aspergillus* foi inicialmente descrito por Micheli em 1729. O fungo é amplamente presente no ambiente, podendo ser encontrado no solo, na água, ou em restos orgânicos, como também encontrado em hospitais (Hansen *et al.*, 2008; Hinson; Moon; Plummer, 1952), e se espalham no ambiente por meio de hifas aéreas (Hope; Walsh; Denning, 2005). Os agentes causadores da aspergilose fazem parte da ordem Eurotiales e da família Aspergillaceae, sendo agrupados no gênero *Aspergillus* (Tsang *et al.*, 2018).

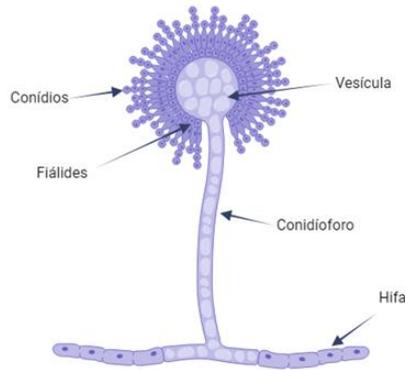
A principal forma de reprodução dos fungos deste gênero é a forma assexuada por meio de conídios que são propagados pelo ar e têm a capacidade de germinar em ambientes úmidos ricos em matéria orgânica, formando colônias de rápido crescimento. Essas colônias apresentam uma ampla diversidade de colorações, que variam conforme a espécie. Além da forma assexuada, também podem se reproduzir sexuadamente por meio de ascósporos (Geiser, 2009; Gugnani, 2003).

Devido à sua ampla variabilidade genética, o gênero *Aspergillus* é classificado com base na taxonomia mais atual, que considera não apenas os níveis de gênero e espécie, mas também categorias adicionais, como subgêneros, seções, subseções, séries e subespécies (Houbraken *et al.*, 2020). Essa abordagem detalhada permite uma organização sistemática e um melhor entendimento da diversidade desse grupo. Para isso, utilizam-se informações como o comportamento de crescimento em diferentes temperaturas, os padrões de compostos bioquímicos produzidos e técnicas moleculares, como a reação em cadeia da polimerase e sequenciamento genético, para definir e diferenciar essas categorias (Hong *et al.*, 2005; Lamoth, 2016; Samson *et al.*, 2007).

Os elementos microscópicos (figura 1), são fundamentais para a caracterização das espécies de *Aspergillus* spp., e permitem uma análise precisa. A identificação das espécies depende diretamente da avaliação micromorfológica, que inclui a análise das fiálides, estruturas responsáveis pela formação das cabeças conidiais onde os conídios estão agrupados. Os conidióforos, que sustentam as cabeças conidiais, também são examinados considerando sua configuração estrutural. Além disso, aspectos como a coloração e o tamanho das vesículas, localizadas na extremidade dos conidióforos e responsáveis pela sustentação das cabeças conidiais, são

características essenciais para diferenciar as espécies (Balajee *et al.*, 2007; Geiser, 2009; Samson *et al.*, 2007).

**Figura 1** - Representação esquemática dos aspectos morfológicos de fungos do gênero *Aspergillus* spp



Fonte: Elaborado por Arthur Santos na plataforma Bio Render (<https://www.biorender.com>)

Em geral não são patogênicos, mas, dentre as mais de 400 espécies descritas, 40 são conhecidas por causar doenças ao ser humano, sendo *A. fumigatus* a espécie de maior relevância médica, seguida por *A. niger* e *A. flavus* (Alastruey-Izquierdo *et al.*, 2018; Visagie *et al.*, 2024).

*A. fumigatus* é o agente mais frequente da aspergilose pulmonar e sinusites, enquanto, *A. flavus* é mais prevalente entre os casos de aspergilose broncopulmonar alérgica e na aspergilose com acometimento de tecidos cutâneos, mucosos e subcutâneos (Hachem *et al.*, 2014). Já infecções por *A. terreus* preocupam devido à resistência aos azóis e à anfotericina B, contribuindo para cerca de 4,0% dos casos de aspergilose invasiva, geralmente associados a desfechos clínicos desfavoráveis (Hachem *et al.*, 2014; Pastor; Guarro, 2014).

*A. niger* é uma espécie frequentemente associadas à otomicose, uma infecção oportunista do canal auditivo externo, com prevalência de 3,6% entre pacientes com doenças pulmonares obstrutivas (Bulpa; Dive; Sibille, 2007; Person *et al.*, 2010). Enquanto *A. nidulans* apresenta alta associação com a doença granulomatosa crônica, uma imunodeficiência primária rara causada por um defeito na metabolização de oxigênio pelos fagócitos. Essa condição torna os pacientes particularmente suscetíveis a infecções fúngicas, sendo as infecções por *A. nidulans* mais graves do que as causadas por *A. fumigatus* (Henriet; Verweij; Warris, 2012; Kanaujia; Singh; Rudramurthy, 2023).

Quando os esporos de *A. fumigatus* chegam ao pulmão, podem ficar retidos no muco, onde apresentam baixa imunogenicidade devido a uma camada externa composta por proteínas (rodlets hidrofóbicos). No entanto, em poucas horas, essa camada se perde, permitindo que os esporos absorvam umidade, inchem e iniciem o processo de germinação, formando hifas que se organizam em colônias. Essas colônias são revestidas por uma matriz extracelular, formando um biofilme que contribui para a adesão e proteção do fungo. Para se estabelecer no parênquima pulmonar, o *Aspergillus* spp. precisa competir com outros microrganismos e obter nutrientes essenciais, como ferro e zinco. Para isso, secreta enzimas que degradam a barreira epitelial, favorecendo a invasão tecidual. Em indivíduos imunocomprometidos, essa invasão pode resultar em infecções graves. *A. fumigatus* também demonstra grande versatilidade, conseguindo sobreviver em diferentes condições, desde o microbioma das vias aéreas até ambientes hipóxicos presentes em tecidos necróticos (Janssens; Lambrecht; Van Braeckel, 2024).

O ferro é o nutriente central para a patogenicidade de *A. fumigatus*, e a interferência na disponibilidade de ferro é prejudicial para o fungo, que emprega dois sistemas de captação de ferro de alta afinidade, a assimilação reductiva de ferro e a captação de ferro assistida por sideróforo. Os sideróforos são quelantes específicos de ferro férrico de baixa massa molecular. Há quatro sideróforos do tipo hidroxamato: ferricrocina e hidroxiferricrocina (tráfego intracelular de ferro), e fusarinina C e triacetilfusarinina C (eliminação de ferro extracelular), (Matthaiou *et al.*, 2018; Schrettl; Haas, 2011).

## 1.2 Espectros da aspergilose

A aspergilose pulmonar é causada pela inalação de conídios do gênero *Aspergillus* do ambiente, cuja patogenicidade depende do estado imunológico do indivíduo, da integridade de seu parênquima pulmonar e de como foi a exposição. As principais formas clínicas da aspergilose pulmonar são: doença alérgica por *Aspergillus*, aspergilose invasiva (AI) e aspergilose pulmonar crônica (APC) (Tabela 1) (Kosmidis; Denning, 2015).

**Tabela 1** - Síndromes clínicas de doença pulmonar causada por *Aspergillus* spp.

Formas Clínicas	Padrões de Apresentações Clínicas
APC	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aspergiloma simples (AS)</li> <li>- Aspergilose pulmonar cavitária crônica (APCC)</li> <li>- Aspergilose invasiva subaguda (APISA)</li> <li>- Nódulo de <i>Aspergillus</i></li> </ul>
Doença alérgica por <i>Aspergillus</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA)</li> <li>- Asma induzida</li> <li>- Sinusite alérgica</li> </ul>
AI	<ul style="list-style-type: none"> <li>- AI</li> <li>- Aspergilose traqueobrônquica</li> <li>-Aspergilose pulmonar associada à Influenza (IAPA)</li> <li>-Aspergilose pulmonar associada à COVID-19 (CAPA)</li> </ul>

Fonte: Adaptado de Kosmidis; Denning, 2015; Patel *et al.*, 2019; CAPA: Aspergilose Pulmonar associada à Covid-19; APCC: Aspergilose pulmonar cavitária crônica, APISA: Aspergilose invasiva subaguda, ABPA: Aspergilose broncopulmonar alérgica.

A aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA) é uma forma particular e exagerada da sensibilização por *Aspergillus* spp., mas nem todos os casos de sensibilização apresentam todos os critérios de ABPA (Agarwal, 2011). ABPA pode complicar casos de fibrose cística, e outras doenças pulmonares, e o tratamento é realizado com glicocorticoides e terapias antifúngicas (Agarwal *et al.*, 2020). O tratamento procura prevenir bronquiectasias e fibrose pulmonar (Kosmidis; Denning, 2015). Além da forma da ABPA, os pacientes também podem apresentar asma induzida por *Aspergillus* spp. e sinusite alérgica (Patel *et al.*, 2019).

A AI é uma infecção fúngica grave que ocorre principalmente em pacientes com redução importante do número e, ou da função dos neutrófilos. Entre os grupos de risco estão aqueles com leucemias, câncer, imunodeficiências adquiridas ou hereditárias, doenças autoimunes, e pacientes que realizaram transplantes de órgãos ou células-tronco. Além disso, condições como pneumonias virais, incluindo influenza e COVID-19, também podem predispor à AI. Essa doença é caracterizada por infecção pulmonar com risco significativo de disseminação angioinvasiva para outros órgãos (Ledoux; Herbrecht, 2023; Taccone *et al.*, 2015).

Pacientes internados em unidades de terapia intensiva (UTI) também apresentam alta incidência de AI. Nesse grupo, muitos não possuem fatores onco-hematológicos, mas apresentam condições como doenças pulmonares crônicas, uso prolongado de corticoides e ventilação mecânica, infecções concomitantes, diabetes

mellitus tipo 2, cirrose ou falência múltipla de órgãos (Ledoux; Herbrecht, 2023; Taccone *et al.*, 2015; Verma *et al.*, 2019).

Do ponto de vista radiológico, o padrão angioinvasivo é uma característica marcante da AI. Ele reflete a invasão de hifas pela parede dos vasos sanguíneos, levando à formação de trombos fúngicos que causam necrose tecidual e disseminação hematogênica. Esse padrão é classicamente associado à neutropenia grave e se manifesta como nódulos rodeados por opacidades em vidro fosco, representando hemorragia perilesional e formando o conhecido "sinal do halo" (Greene *et al.*, 2007).

O diagnóstico da AI exige uma abordagem integrada, combinando culturas de amostras respiratórias, detecção do antígeno galactomanana (GM) do *Aspergillus* spp., exames histopatológicos e exames de imagem. O tratamento baseia-se no uso de antifúngicos, como voriconazol ou posaconazol, com o objetivo de controlar a infecção. Devido à gravidade da condição e ao estado clínico dos pacientes, tanto o diagnóstico quanto o acompanhamento requerem uma abordagem multidisciplinar e monitorização rigorosa (Donnelly *et al.*, 2019; Ledoux; Herbrecht, 2023).

A APC foi relatada pela primeira vez em 1842 e se caracteriza pela sua evolução lenta e progressiva. Pulmões com alterações estruturais graves, como os com sequelas cavitárias da tuberculose pulmonar (TBP), enfisema pulmonar e fibrose cística são mais propensos ao acometimento por *Aspergillus* spp. (Alastruey-Izquierdo *et al.*, 2018; Denning; Pleuvry; Cole, 2011).

### **1.3 Aspergilose pulmonar crônica**

#### **1.3.1 Epidemiologia**

A carga global de APC não é completamente conhecida, uma incidência de cerca de 1,2 milhão de casos de APC em cinco anos após TB foi publicada (Denning, 2024).

A análise de sobrevivência de um estudo com 387 pacientes demonstrou que as taxas de sobrevivência foram de 62,0% em 5 anos. Observou-se um incremento de 1,7 vezes no risco de óbito a cada aumento de 10 anos na idade no momento do diagnóstico. O impacto se mostra significativo e progressivo da idade sobre a mortalidade (Lowe *et al.*, 2017). Desnutrição é relatada como um efeito independente na mortalidade dos pacientes, como também doenças pulmonares preexistentes

(Jakribettu *et al.*, 2019; Ohba *et al.*, 2012). A mortalidade em cinco anos, em alguns estudos, pode ultrapassar 50,0% (Aguilar-Company *et al.*, 2019).

Fatores independentes de risco de mortalidade vêm sendo relatados como tempo médio de internação, admissão na UTI, doenças hematológicas malignas e presença de padrão radiológico de consolidação alveolar pulmonar (Akram *et al.*, 2021).

### 1.3.2 Patogênese

O sistema imunológico normalmente impede o desenvolvimento da aspergilose quando os esporos de *Aspergillus* spp. são inalados (Barnes; Marr, 2006). No momento em que os conídios entram em contato com o pulmão, são fagocitados pelos macrófagos alveolares (Ibrahim-Granet *et al.*, 2003).

Doenças prévias que alterem a estrutura pulmonar podem dificultar os mecanismos imunológicos de defesa e facilitam a colonização, infecção e doença fúngica. Tuberculose pulmonar (TBP) prévia, em especial a com seqüela cavitária, é a predisposição mais comum observada em pacientes com APC. Cerca de um terço daqueles que tratam ficam com cavitações sequelares (Bongomin, 2020). Além da TB, infecções por micobactérias não-tuberculosas (MNT), doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), enfisema pulmonar e câncer de pulmão também são relatados por predispor (Smith; Denning, 2011).

Coinfecção pulmonar entre *Aspergillus* spp. e *Mycobacterium tuberculosis* podem ocorrer e os pacientes podem desenvolver APC e TBP concomitantemente. Devido essa possibilidade de coinfecção, é recomendado que se suspeite e investigue aspergilose em todos os pacientes com TBP ativa (Akram *et al.*, 2021; Nguyen *et al.*, 2021).

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é uma condição respiratória progressiva caracterizada pela obstrução persistente do fluxo aéreo. É causada principalmente pela exposição prolongada a substâncias irritantes, como fumaça de cigarro, poluentes ambientais ou ocupacionais (Decramer; Janssens; Miravittles, 2012; Svanes *et al.*, 2010). Exacerbações podem ser causadas por infecções virais, bacterianas, fúngicas, inflamação eosinofílica, causas mecânicas e ambientais (Otu *et al.*, 2023; Ritchie; Wedzicha, 2020; Tiew *et al.*, 2021).

Em países com baixas cargas de TBP, DPOC pode ser uma das causas mais comuns para predisposição de APC (Hayes; Novak-Frazer, 2016). Smith e Denning

(2011), relataram em seu estudo no Reino Unido de 126 casos de APC, que 33,0% dos pacientes tinham DPOC como doença subjacente, sendo a doença prévia mais comum entre os pacientes.

As MNT também podem afetar os pulmões alterando sua estrutura pulmonar. Takeda e colaboradores (2016) no Japão, relataram que pacientes com MNT que apresentavam cavidades pulmonares tinham mais propensão a desenvolver APC. A coinfeção de ambas mostra um prognóstico ruim com maiores chances de óbito que aqueles somente com infecção pulmonar por MNT (Phoompoung; Chayakulkeeree, 2020). MNT é relatado como um preditor independente de mortalidade (Lowes *et al.*, 2017).

O enfisema pulmonar pode predispor ao desenvolvimento de APC, devido às alterações estruturais da formação de grandes espaços aéreos resultantes da destruição dos septos alveolares dos pulmões. Maitre e colaboradores (2021) na França, observaram maior risco de mortalidade em pacientes DPOC e com enfisema pulmonar do que por infecção micobacteriana prévia. Fatores como o uso de corticosteroides para tratar o enfisema também podem contribuir, já que inibem a função dos macrófagos, aumentando o risco de infecção (Phoompoung; Chayakulkeeree, 2020).

Em casos de câncer de pulmão, a quimioterapia e a radioterapia podem causar uma imunossupressão, e a ressecção cirúrgica devido a alteração no parênquima pulmonar, podem facilitar a infecção (Smith; Denning, 2011). Mesmo após o sucesso cirúrgico, o paciente deve continuar sendo monitorado periodicamente afim de evitar uma infecção e evitar piora do dano pulmonar (Kim *et al.*, 2022).

### **1.3.3 Classificação clínica da APC**

A APC é classificada de acordo com as suas manifestações e achados radiológicos. As apresentações clínicas são: aspergiloma simples (AS), aspergilose pulmonar cavitária crônica (APCC), aspergilose pulmonar fibrosante crônica (APFC), nódulo de *Aspergillus* e aspergilose pulmonar invasiva subaguda (APISA) (Denning *et al.*, 2015).

#### **Aspergiloma simples**

O AS é caracterizado por uma única cavidade pulmonar contendo uma bola fúngica, que é uma matriz densa composta por fungos e restos celulares, geralmente

formada em áreas de dano pulmonar pré-existente. A condição é estável, sem progressão significativa ao longo dos meses, e frequentemente causa poucos sintomas, como tosse leve ou hemoptise (presença de sangue na expectoração) ocasional. O diagnóstico é baseado em exames de imagem e, nos casos assintomáticos, o manejo é conservador (Denning *et al.*, 2015).

### **Aspergilose pulmonar cavitária crônica**

A APCC, é caracterizada por uma ou várias cavitações, com ou sem aspergiloma, com presença de sintomas pulmonares e elevação dos marcadores inflamatórios por ao menos 3 meses. Sem tratamento, essas cavidades podem se expandir e se fundir ao longo dos anos, formando infiltrados pericavitários ou perfurando a pleura. Além disso, um aspergiloma pode surgir ou desaparecer nesse processo (Denning *et al.*, 2015).

### **Aspergilose pulmonar fibrosante crônica**

A APFC decorre de uma APCC não tratada adequadamente, com fibrose extensa e destruição de pelo menos dois lobos do parênquima pulmonar. Geralmente, a fibrose apresenta uma aparência sólida, embora seja possível observar cavidades, com fibrose ao redor. Aspergiloma também pode estar presente (Denning *et al.*, 2015).

### **Nódulo de *Aspergillus***

Nódulo de *Aspergillus* é frequentemente confundido com algum tipo de malignidade, como câncer, e diagnosticados por histologia após ressecção cirúrgica. É uma manifestação incomum de APC, e pode ser único ou múltiplo, podendo estar ou não dentro de uma cavitação pulmonar, medindo até 3 centímetros e necrose é constantemente observada (Ahn *et al.*, 2011; Baxter *et al.*, 2011; Denning *et al.*, 2015; Kang; Park; Jhun, 2020).

### **Aspergilose pulmonar invasiva subaguda**

A APISA ou como era chamada aspergilose pulmonar necrosante crônica, é uma forma intermediária entre a AI aguda e a APC, tendo características clínicas parecidas com a APCC, mas com progressão mais rápida. Geralmente afeta indivíduos com algum grau de imunossupressão ou doenças pulmonares estruturais, mas que possuem resposta imune parcial, como pacientes com diabetes, alcoolismo,

desnutrição ou uso de corticoides em baixa dose, radioterapia ou infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Denning *et al.*, 1991, 2015; Kim *et al.*, 2000).

### 1.3.4 Diagnóstico

Devido a diagnósticos errôneos principalmente em locais de recursos limitados, o Fundo de Ação Global para Infecções Fúngicas (GAFFI) realizou um painel internacional com especialistas em 2016, a fim de facilitar e simplificar o diagnóstico. São evidências para diagnóstico de APC: "1) perda de peso, tosse persistente e/ou hemoptise; 2) imagens de tórax mostrando infiltrados cavitários progressivos e/ou uma bola fúngica e/ou fibrose pericavitária ou infiltrados ou espessamento pleural; e 3) um resultado positivo do ensaio de IgG para *Aspergillus* ou outra evidência de infecção (Denning *et al.*, 2018).

O diagnóstico da APC é classificado em confirmado ou provável de acordo com Ocansey (2022), e é baseado nos sintomas característicos, exames de imagem, teste sorológico positivo para *Aspergillus* ou outra evidência como cultura ou pesquisa de fungos, como mostra a tabela 2.

**Tabela 2 – Diagnóstico da APC**

<b>Sintoma (I), imagem (II) e sorologia ou outra evidência (III)</b>	
Provável	I+II ou I+III
Confirmado	I+II+III

Fonte: Adaptado de Ocansey (2022)

### **Sintomas**

Segundo painel internacional do GAFFI de 2016, um ou mais dos seguintes sintomas: tosse, expectoração, perda de peso, tosse produtiva, dispneia, fadiga, dor torácica e hemoptise, os sintomas costumam aparecer no período de 1 a 6 meses, geralmente por 3 meses. Em indivíduos com doença pulmonar preexistente e sintomas crônicos, uma mudança no padrão ou na gravidade da apresentação clínica é o fator determinante para considerar a duração de 3 meses. Levando em conta os indivíduos assintomáticos ou com poucas alterações como em casos de aspergiloma simples, os achados de imagem e microbiológicos são essenciais no diagnóstico (Denning *et al.*, 2018).

Hemoptise é um sintoma alarmante e desenvolve em 12 a 43% dos pacientes, dor torácica é comum em 37% dos pacientes. Perda de peso e fadiga são comuns, mas nem sempre vistas. Tosse com ou sem expectoração e dispneia também são

comuns, como também em outras doenças pulmonares e não são suficientes para distinção (Denning *et al.*, 2018). Porém, pacientes com dispneia podem ter um prognóstico desfavorável, associado a um maior risco de mortalidade (Lowe *et al.*, 2017).

Geralmente a presença de hemoptise é mais frequente em pacientes com APC do que pacientes com TBP (Ocansey *et al.*, 2022). Naqueles com histórico de TBP tratada, o sintoma mostra um forte indicador de APC (Volpe-Chaves *et al.*, 2022).

A APC é de difícil diagnóstico, tendo suas manifestações sintomáticas muitas vezes confundidas com recidiva de TBP em pacientes já tratados previamente, devido à semelhança dos sintomas característicos de ambas doenças. Devido a isso, o diagnóstico diferencial deve sempre lembrado no manejo clínico (Ocansey *et al.*, 2022).

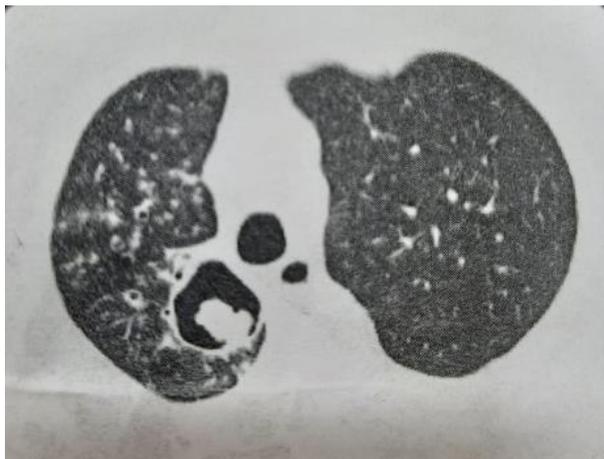
### **Achados de imagem**

Locais com recursos limitados enfrentam dificuldades diagnósticas. Nem todas as unidades de saúde têm acesso a exames de tomografia computadorizada (TC), somente a exames de raio-x (RX), complicando o diagnóstico por imagem (Denning *et al.*, 2018).

Bola fúngica pode ser visualizada nos exames de imagem, dentro de cavitações. É um achado altamente sugestivo de aspergiloma pois é improvável que a bola fúngica seja causada por algum outro fungo, e pode vir acompanhada de pouco ou nenhum sintoma (Denning *et al.*, 2015). Em alguns casos, a bola fúngica pode desaparecer ao longo do tempo (Godet *et al.*, 2016).

Cavitação podem ocorrer nas infecções por TBP, MNT e doenças fúngicas (Gadkowski; Stout, 2008). Na APC, podem apresentar uma ou mais cavidades, com progressão lenta dos achados por meses ou anos (Denning *et al.*, 2018). As cavitações podem ser novas causadas pela infecção pelo fungo, ou resultado de uma TBP prévia e pode conter (figura 2) ou não aspergiloma (Denning *et al.*, 2003). Os pacientes com APC podem apresentar comorbidades diagnosticadas previamente. Diabetes mellitus pode ter associação com a APC, como é também fator de risco para desenvolver cavitações na TBP (Nguyen *et al.*, 2021). Cavidades maiores também são fatores associados à pior resposta ao tratamento, e como resposta positiva, pode ser observada o afinamento da espessura da parede das cavitações pulmonares (Nam *et al.*, 2023).

**Figura 2** - TC de tórax com presença dos achados de cavitação e bola fúngica no lobo superior direito.



Fonte: Arquivos pessoais da Dra. Anamaria Paniago

Espessamento pleural é um dos achados mais comuns e específicos na APC, quando tratados adequadamente pode ser observado melhora clínica e radiológica (Denning *et al.*, 2018; Godet *et al.*, 2016). Quando visto em exames de imagem junto a consolidação ou cavitação, deve ser sinal de alarme para diagnóstico de APC (Desai *et al.*, 2015).

Infiltração pericavitária são áreas de inflamação ou opacidades densas, ao redor de cavidades pulmonares, que podem fundir a fibrose e espessamento pleural e podem ser visíveis em exames de RX (Denning *et al.*, 2018).

Sinais radiológicos de fibrose pulmonar extensa podem ser observados em casos de APFC decorrente da falta de tratamento, característico por ser um estágio avançado da APCC (Denning *et al.*, 2015).

Quando iniciado o tratamento com antifúngicos a mudança radiológica é lenta e pouco visível em até 3 meses mesmo nos exames de TC que são mais sensíveis que o RX (Nam *et al.*, 2023).

### **Pesquisa direta**

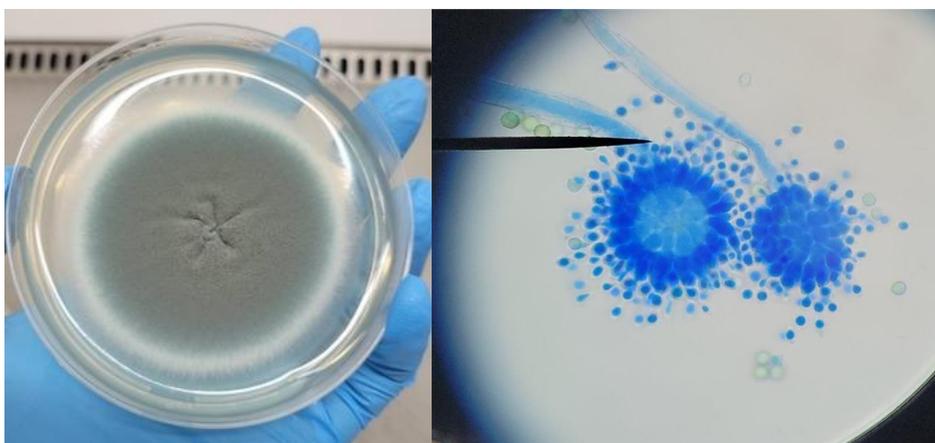
A pesquisa direta de fungos é preparada com a amostra respiratória, solução KOH e coloração em lâmina para visualização hifas hialinas septadas, sugestivas de *Aspergillus* spp. (McClenny, 2005; Moura; Cerqueira; Almeida, 2018; Schwarz *et al.*, 2024). Para auxiliar na visualização há muitas colorações que podem ser comumente usadas, como Gram, Giemsa, coloração de Wright, azul de toluidina O e hematoxilina de ferro de Weigert para colorir fungos (Sangeetha; Thangadurai, 2013). A técnica é

pouco sensível, não permite diferenciar as espécies, e devido a aparência morfológica ser parecida com de outros fungos, pode ser confundida com outros organismos (Moura; Cerqueira; Almeida, 2018; Schwarz *et al.*, 2024).

### Cultura

As colônias demoram ao menos sete dias para crescer em 25 a 37°C, e podem ser isolados em ágar Saboraud dextrose. Quando observado macroscopicamente, *A. fumigatus* é característico por aspecto de mofo branco algodado, e após alguns dias se torna aveludado ou granular de cor verde (figura 3). *A. niger* tem coloração branca e se tornam pretas. *A. terreus* também são brancas e depois passam a ser cor de canela com aparência de textura açucarada. *A. flavus* tem coloração verde-amareladas com fiáldes em sua superfície e *A. nidulans* tem coloração marrom (Schwarz *et al.*, 2024). Para observação microscópica e facilitar a identificação, pode ser utilizado azul de algodão lactofenol (figura 3), mas para confirmação definitiva pode exigir métodos moleculares ou espectrometria de massas (MALDI-TOF) (Sangeetha; Thangadurai, 2013). No caso das culturas para fungos, os resultados positivos são essenciais para identificar as espécies de *Aspergillus*, como também realizar os testes de sensibilidade e suscetibilidade aos antifúngicos (Mohamed *et al.*, 2022).

**Figura 3** - *A. fumigatus* em lâmina após crescimento em cultura macroscopicamente e corado com azul lactofenol de algodão para análise microscópica



Fonte: Micoteca do Laboratório de Doenças Infecciosas e Parasitárias (LabDip) da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS). Por Francine Dorneles

Considerando que *Aspergillus* é um fungo comum presente no ambiente, quando identificado na cultura para fungos, é imprescindível avaliar a possibilidade de

colonização, como também a de contaminação, que pode ser reduzida realizando as testagens de amostras de trato respiratório mais de uma vez (SHINFUKU et al., 2022). A cultura para diagnóstico de aspergilose pode ser útil, mas a especificidade deixa a desejar, tornando-se um desafio acreditar fielmente no resultado de uma cultura positiva (Page; Richardson; Denning, 2015).

### **Histologia**

A histologia é um método especialmente útil para diferenciar entre colonização por fungos, caracterizada pela presença de conídios, e uma infecção ativa, evidenciada pela presença de hifas, utilizando a biópsia pulmonar com colorações específicas de metenamina de prata ou ácido periódico de Schiff (Denning *et al.*, 2003; Hope; Walsh; Denning, 2005). A biópsia pulmonar é um procedimento invasivo e é pouco indicado na prática clínica. Quando a identificação morfológica não está clara ou não há crescimento em cultura, pode ser realizada reação em cadeia polimerase ou a hibridização *in situ* nas lâminas histológicas (Barnes; Marr, 2006).

### **1.3.5 Imunodiagnósticos**

Detecção de anticorpos podem ser realizados por teste de precipitina, como a imunodifusão em gel ágar (IDD) e a contraímunoeletroforese (CIE). A IDD é uma técnica de baixo custo, realizada com a preparação de ágar em uma lâmina, que faz uma reação antígeno e anticorpo formando uma linha de precipitação, fazendo assim a leitura do resultado obtido por titulação. Já na CIE ocorre a migração eletroforética dos antígenos e anticorpos em um meio de ágar, acelerada pela aplicação de uma corrente elétrica, fazendo a formação de uma linha de precipitação em um tempo reduzido (Coleman; Kaufman, 1972; Mackenzie; Philpot, 1975).

A detecção de anticorpos também pode ser realizada por ensaio imunoenzimático (Elisa) especificamente para anticorpos IgG anti-*Aspergillus*. A dosagem de anticorpos IgG também pode ser útil no acompanhamento do sucesso terapêutico durante o tratamento da APC. Quando vista a diminuição dos níveis de IgG séricos, representa uma boa resposta do paciente à terapia antifúngica (Page; Richardson; Denning, 2015).

Volpe-Chaves e colaboradores (2020), em uma revisão sistemática compararam a acurácia dos testes de precipitina versus Elisa no diagnóstico da APC e encontraram maior acurácia nos testes de Elisa que nos de IDD e CIE.

Além desses métodos, também podemos detectar anticorpos pelo método de fluxo lateral. Singh e colaboradores (2022), demonstraram sensibilidade de 86,7% e especificidade de 90,0% no teste de fluxo lateral imunocromatográfico LDBio para detecção de anticorpos IgG e IgM para *Aspergillus*, no diagnóstico de APC, um teste rápido de até 20 minutos que mostrou bom desempenho.

A GM é um antígeno produzido durante o crescimento fúngico, e é composto de uma cadeia de manose repetitiva contendo cadeias laterais de galactofuranose variáveis e complexas sendo estritamente dependentes da condição de crescimento do fungo. A dosagem de GM geralmente é utilizada no diagnóstico de AI, mas há estudos que avaliam o método para diagnóstico de AS (Krylov *et al.*, 2018; Kudoh; Okawa; Shibata, 2015; Sehgal *et al.*, 2019). Os métodos de diagnóstico por Elisa e por teste de fluxo lateral de GM desempenham empregabilidade satisfatória e podem ser realizados tanto no soro, como também em amostras respiratórias (dos Santos *et al.*, 2024).

Sehgal e colaboradores (2019), estudaram a acurácia do teste de GM e IgG anti-*Aspergillus fumigatus* para diagnóstico de AS. GM no lavado broncoalveolar (LBA) mostrou-se mais sensível que o sérico. O IgG mostrou sensibilidade razoável e excelente especificidade. Por ser de fácil realização, IgG pode ser o teste inicial de diagnóstico, se negativo, prosseguir com GM sérica. GM em LBA deve ser o último recurso, pois além de invasivo não está disponível em locais com recursos limitados. A combinação de testes sorológicos auxilia no diagnóstico de AS.

1,3-beta-D-glucano é um polissacarídeo encontrado na parede celular de diversos fungos, incluindo *Candida*, *Aspergillus* e alguns outros patógenos fúngicos, sendo útil para detecção de infecção fúngica, mas inespecífico para aspergilose, e podem ter reações cruzadas também por infecções bacterianas gram-negativas. O teste pode ser realizado em amostras sorológicas ou de LBA (Larkin *et al.*, 2020).

Atualmente, os testes de IgG são os mais promissores no diagnóstico de APC quando causada por *A. fumigatus*. Quando negativo e descartado a possibilidade de outras infecções, o exame de broncoscopia tem forte indicação pois o agente causador pode ser *Aspergillus* de outra espécie (Takazono; Izumikawa, 2018).

### 1.3.6 Tratamento

O primeiro caso relatado a receber tratamento com anfotericina B foi em 1957 (Kelmenson, 1959). Já em 1988, ocorreu o primeiro tratamento antifúngico oral bem sucedido, com itraconazol (De Beule *et al.*, 1988).

Itraconazol e voriconazol são antifúngicos utilizados para tratamento da APC considerados de primeira e segunda linha, respectivamente (Maghrabi; Denning, 2017). Em caso de complicações clínicas ou falha no tratamento, posaconazol pode ser recomendado (Denning *et al.*, 2015). Em casos de resistência aos azóis, anfotericina B ou equinocandinas podem ser utilizados para o tratamento (Alastruey-Izquierdo *et al.*, 2018). O itraconazol é geralmente a primeira escolha, por suscitar uma boa resposta clínica e menos efeitos colaterais. O medicamento tem maior eficácia quando utilizado por 12 meses ou mais, comparado com seu uso por 6 meses (Sehgal *et al.*, 2022).

Itraconazol age inibindo a enzima CYP3A4, enquanto voriconazol inibe a enzima CYP2C9. Na terapia com voriconazol são relatadas mais reações adversas que o itraconazol, como distúrbios visuais e hepatotoxicidade com necessidade de sua substituição (Maghrabi; Denning, 2017). A biodisponibilidade do itraconazol é incerta e alguns serviços médicos fazem a aferição dos níveis séricos durante o tratamento, e tem demonstrado que encontrar concentrações baixas séricas é comum, mas que a resposta clínica nem sempre vai depender desse fator levando em conta a melhora ou estabilidade dos casos, sendo os valores conhecidos recomendados para AI não ser estritamente aplicáveis nos casos de APC (de Oliveira *et al.*, 2023a).

A resistência antifúngica de *Aspergillus* aos azóis é preocupante, devido às mutações em seus genes que colocam os humanos em risco, limitando as opções de tratamento para o uso de anfotericina B, que apresenta maiores efeitos colaterais ao organismo, ou equinocandinas que não são efetivas em inibir completamente o fungo (Chowdhary *et al.*, 2013). Resistência ou efeitos adversos, como intolerância, são observados em mais de 50,0% dos pacientes (Kosmidis; Denning, 2015).

Pacientes com AS, que não apresentam sintomas entre 6 meses a 2 anos podem ficar sem tratamento antifúngico, ou somente com terapia de suporte com antitussígenos, desde que continuem sendo monitorados de forma rigorosa. Menos de 10,0% dos casos os aspergilomas se resolvem espontaneamente (Agarwal *et al.*, 2013; Passera *et al.*, 2012).

Aqueles diagnosticados com a forma APCC, mas assintomáticos, também podem ter o tratamento suspenso, desde que realizem exames de imagem com frequência para avaliação de progressão radiológica, e também piora clínica, que são sinais de alarme para inserção de tratamento antifúngico (Sehgal *et al.*, 2020).

A resposta radiológica ao tratamento da APC é considerada lenta e são escassas as mudanças visíveis em menos de 3 meses de tratamento antifúngico na TC, mas pode ser observado o afinamento da parede da cavitação pulmonar (NAM *et al.*, 2023). As respostas geralmente são vistas após 4 a 6 meses de tratamento, devendo ser o mínimo de tempo de tratamento (LARKIN *et al.*, 2020). No geral, o tratamento se estende por 12 meses ou mais, tendo em vista que o tratamento prolongado aumenta a chance de efeitos adversos, necessitando da descontinuação ou troca de medicação (de Oliveira *et al.*, 2023a)

Em casos de aspergiloma único, resistência aos azóis ou hemoptise persistente, o paciente poderá ser avaliado para realizar o procedimento de ressecção cirúrgica (Patterson *et al.*, 2016). Embora a remoção cirúrgica seja considerada como tratamento padrão, ela está associada a taxas significativas de mortalidade e morbidade (Lang *et al.*, 2020; Moodley; Pillay; Dheda, 2014). Portanto, abordagens terapêuticas conservadoras são incentivadas sempre que viáveis (Denning *et al.*, 2015).

Após a ressecção cirúrgica, o tempo de sobrevida mediano é de 14,3 anos. As taxas de sobrevivência em 1, 3, 5 e 10 anos são de 89,4%, 81,3%, 79,1% e 68,7%, respectivamente (Muniappan *et al.*, 2014).

Todos os pacientes com APC necessitam de acompanhamento médico de longo prazo devido a recidiva ser comum, a cura ser rara e ao risco de resistência aos antifúngicos (Medicine, 2016).

### **1.3.7 Metabolismo do ferro e alterações laboratoriais na APC**

O ferro é um micronutriente muito importante no metabolismo humano, com sua maior parte encontrado na hemoglobina (HGB), e os outros na composição de proteínas e na forma de estoque (ferritina e hemossiderina) (Paiva; Rondó; Guerra-Shinohara, 2000). Seu transporte no organismo ocorre através de uma proteína chamada transferrina, com quem tem alta afinidade, por meio da circulação sanguínea, a fim de ser entregue às células para ser utilizado nos processos fisiológicos (de Brito *et al.*, 2023; Wians *et al.*, 2001).

Após ser ingerido proveniente da alimentação, os enterócitos realizam a absorção e transporte do ferro no intestino, por meio das membranas apical e basolateral. Enquanto a membrana apical capta o ferro do grupo heme e íons inorgânicos para dentro da célula dos enterócitos, a membrana basolateral transfere o ferro absorvido do interior dos enterócitos para a circulação sanguínea (Roy; Enns, 2000). O transporte do ferro heme ( $\text{Fe}^{+2}$ ) ocorre através da proteína transportadora da heme (HCP1) e para o ferro não heme ( $\text{Fe}^{+3}$ ) por via da proteína transmembrana, chamada de transportador de metal divalente 1 (DMT 1), que também é a via para a passagem de outros metais divalentes, como cobalto, zinco, manganês, cobre, níquel e cádmio para o interior das células (Conrad; Umbreit; Moore, 1999).

A absorção do  $\text{Fe}^{+3}$  ocorre depois que ele é reduzido a  $\text{Fe}^{+2}$  com a ação do citocromo B (Dcytb) associado à membrana, e então o  $\text{Fe}^{+2}$  é transportado pela proteína DMT1 através da membrana apical (Andrews, 2005).

No enterócito o ferro poderá ser estocado em forma de ferritina ou por meio da membrana basolateral ser transportado para corrente sanguínea. Quando há uma deficiência de ferro, é sintetizada pouca ferritina e o ferro absorvido fica disponível para transporte (Srai; Bomford; McArdle, 2002).

Nesse sentido, os eritrócitos necessitam do ferro para sua estrutura e função. As três fontes que provêm ao organismo são do intestino por meio da dieta, dos macrófagos por meio do fim da vida útil dos eritrócitos e no fígado onde ficam armazenados ferro e ferritina (Miller, 2013).

Estima-se que 2,5 mL de sangue total contém 1,0 mg de ferro. Diariamente cerca de 1,0 mg de ferro proveniente da dieta e 20 mg de ferro reciclado da hemoglobina dão suporte a eritropoiese (Miller, 2013).

Anemia é caracterizada por níveis séricos de hemoglobina abaixo de 12 g/dL em mulheres e de 13 g/dL em homens. Quando o nível sérico de ferro está abaixo do normal, a anemia pode ser ferropriva ou anemia da inflamação (Weiss; Ganz; Goodnough, 2019).

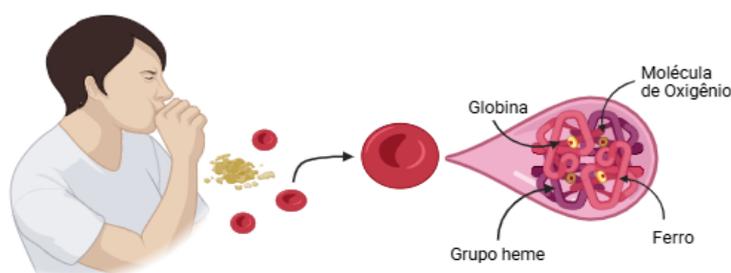
A avaliação e classificação da anemia ferropriva e anemia da inflamação ou doença crônica (ADC) é realizado por meio dos testes laboratoriais como os parâmetros do hemograma e da análise dos parâmetros do ferro (Tabela 3) (Wians *et al.*, 2001). Na APC, anemia pode ser um fator de mau prognóstico entre os pacientes (Jakribettu *et al.*, 2019).

**Tabela 3** - Classificação das anemias de acordo com variáveis laboratoriais

Variável	Anemia ferropriva	ADC	Explicação
<b>VCM e HCM</b>	Normocítica e normocrômica (estágio inicial) Microcítica e hipocrômica (estágio posterior)	Normocítica e normocrômica (60-70% dos casos) Microcítica e hipocrômica (30-40% dos casos)	Ferropriva: os eritrócitos são menores e com menos hemoglobina devido à falta de ferro; ADC: os eritrócitos podem ser normais ou ligeiramente menores, com a HGB por célula também afetada pela disponibilidade de ferro. O HCM pode ser normal ou baixo em ambas as condições, dependendo da gravidade da anemia.
<b>Ferro</b>	↓	↓	Ferropriva: deficiência de ferro; ADC: o ferro fica sequestrado nos estoques.
<b>TIBC</b>	↑	↓	Ferropriva: há mais transferrina disponível para captar ferro; ADC: a produção de transferrina é reduzida.
<b>ISAT</b>	↓	↓ ou ↔	Ferropriva: como há pouco ferro circulante, a transferrina tem pouca saturação na ferropriva; ADC: o ferro está sequestrado, também reduzindo a saturação.
<b>Ferritina</b>	↓	↔ ou ↑	Ferropriva: estoques estão reduzidos; ADC: ferritina aumentada por reação a fase aguda da inflamação.

↓ : baixo; ↑ : alto; ↔ : normal; ADC: anemia da doença crônica. Fonte: Adaptado de Wians *et al*, 2001

A anemia ferropriva pode ser ocasionada por baixa ingestão de alimentos ricos em ferro, absorção reduzida do ferro ou por perda crônica de sangue (Camaschella, 2019). Na aspergilose a perda de sangue pode ocorrer devido à hemoptise (figura 4), sintoma comum nestes pacientes. Essa anemia é característica por ser microcítica e hipocrômica, com níveis baixos de ferro sérico, com redução do ferro ligado à transferrina, níveis baixos de ferritina e baixas contagens de reticulócitos (Weiss; Ganz; Goodnough, 2019).

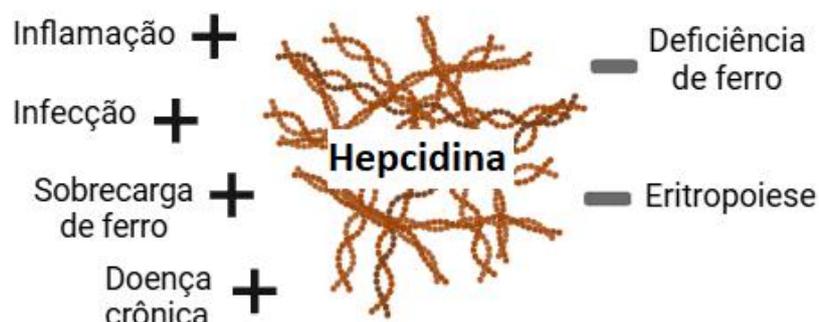
**Figura 4** - Representação da perda de sangue na hemoptise

Fonte: Elaborado na plataforma Bio Render (<https://www.biorender.com>)

A hepcidina é a principal reguladora do metabolismo do ferro, atuando sobre a ferroportina para controlar sua liberação e absorção. Suas principais ações ocorrem

nos enterócitos duodenais, responsáveis pela absorção intestinal de ferro, nos macrófagos, encarregados da reciclagem do mineral, e nos hepatócitos, que armazenam ferro. A regulação da hepcidina é influenciada por estímulos inflamatórios mediados pelas citocinas IL-6 (interleucina-6), IL-1 (interleucina-1), TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral alfa) e IFN- $\gamma$  (interferon gama). Em resposta a infecções, inflamações ou sobrecarga de ferro, seus níveis aumentam para reduzir a disponibilidade de ferro no organismo. Por outro lado, sua síntese é inibida quando há maior necessidade de ferro, como na eritropoiese ou em casos de anemia ferropriva (figura 5) (Ganz, 2011).

**Figura 5** - Representação da regulação da proteína hepcidina



Fonte: Elaborado na plataforma Bio Render (<https://www.biorender.com>)

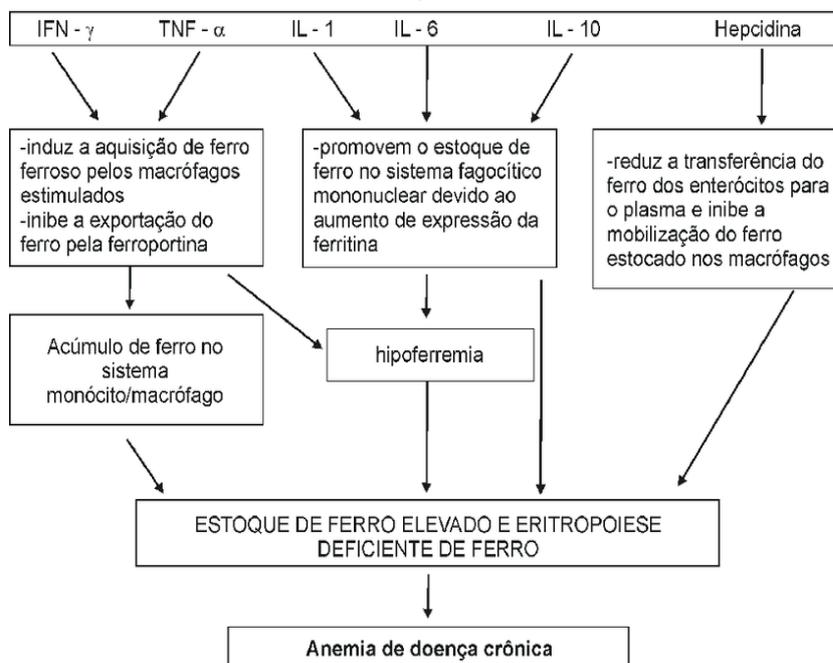
Quando os níveis de hepcidina estão elevados, ocorre a inibição da liberação de ferro pelos macrófagos e enterócitos, além da redução da absorção intestinal. Isso diminui a quantidade de ferro ligado à transferrina, prejudicando a eritropoiese e podendo levar à anemia da inflamação ou anemia da doença crônica (DRC) (Nicolas *et al.*, 2002; Pigeon *et al.*, 2001). Esse efeito se dá porque a hepcidina se liga à ferroportina, promovendo sua degradação e impedindo a exportação de ferro para o plasma. Como resultado, o ferro fica retido dentro dos enterócitos e macrófagos, sendo armazenado na forma de ferritina (Nemeth *et al.*, 2004; Nicolas *et al.*, 2002).

A indução de regulação do ferro devido à inflamação ocorre especificamente pela ação da IL-6 e não de outras citocinas inflamatórias, como a IL-1 e o TNF- $\alpha$  (Nemeth *et al.*, 2004). Isso ocorre porque a regulação da hepcidina é uma resposta de fase aguda do tipo II, na qual a IL-6 desempenha um papel central. As outras citocinas ativam vias inflamatórias gerais, enquanto a IL-6 atua diretamente nos hepatócitos, estimulando a expressão da hepcidina por meio da via de sinalização JAK-STAT3. Quando a IL-6 se liga ao seu receptor, ocorre a ativação da janus quinase

(JAK), que fosforila o transdutor de sinal e ativador de 3 (STAT3). O STAT3, é uma proteína chave que regula a expressão de vários genes em resposta a estímulos inflamatórios. Esse aumento de hepcidina resulta na redução da liberação de ferro pelos enterócitos e macrófagos, o que diminui os níveis séricos de ferro, contribuindo para o desenvolvimento da anemia da doença crônica (ADC) (Camaschella; Nai; Silvestri, 2020).

As citocinas tem papel importante na inflamação (figura 6). Além da IL-6 liberada durante a inflamação que estimula diretamente a produção de hepcidina nos hepatócitos, o TNF- $\alpha$  reduz a absorção de ferro no duodeno, enquanto a IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  aumentam a captação de ferro por macrófagos através do receptor de transferrina, DMT1 e proteínas como lactoferrina, assegurando ferro para funções celulares, mas limitando sua disponibilidade para patógenos. O IFN- $\gamma$  também contribui para essa regulação, promovendo a retenção de ferro nos macrófagos e aumentando a expressão de ferritina, reduzindo ainda mais o ferro disponível para a eritropoiese. Essa anemia é tipicamente normocítica e normocrômica, caracterizada por ferro sérico e ferro ligado à transferrina reduzidos, enquanto os níveis de ferritina permanecem normais ou elevados (Weiss; Ganz; Goodnough, 2019).

**Figura 6** - Citocinas inflamatórias e proteína envolvidas no metabolismo do ferro



Fonte: Adaptado de: Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase - Scientific Figure on ResearchGate. Disponível em:

[https://www.researchgate.net/figure/Figura-4-Alteracoes-do-metabolismo-do-ferro-na-ADC-Papel-dos-mediadores-inflamatorios-e\\_fig3\\_250035405](https://www.researchgate.net/figure/Figura-4-Alteracoes-do-metabolismo-do-ferro-na-ADC-Papel-dos-mediadores-inflamatorios-e_fig3_250035405)

Evidências mostram que defeitos na imunidade podem contribuir no desenvolvimento da APC em indivíduos que apresentam produção reduzida de citocinas como o IFN- $\gamma$  (Colombo *et al.*, 2022).

A liberação das citocinas inflamatórias também promove diminuição na eritropoiese, encurtando a vida útil das hemácias. Anemias graves com hemoglobina menor que 9 g/dL, associa-se a maior risco de mortalidade (Fraenkel, 2017).

A sobrecarga de ferro no organismo de indivíduos com transplantes de fígado, malignidades hematológicas e defeitos na eritropoiese e, ou no metabolismo do ferro podem aumentar o risco de aspergilose, pois aumenta a virulência fúngica (Matthaiou *et al.*, 2018).

A assimilação reductiva do ferro (RIA) é um mecanismo essencial para *A. fumigatus* adquirir ferro do ambiente, fundamental para sua sobrevivência e virulência. Nesse processo, enzimas chamadas ferrirredutases reduzem o ferro férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) a ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ), que é mais solúvel e pode ser transportado para dentro da célula por permeases específicas. No ambiente, o fungo também secreta sideróforos para capturar ferro. Durante infecções, o sistema imunológico restringe a disponibilidade desse metal por meio de proteínas como transferrina e ferritina. Em resposta, *A. fumigatus* intensifica tanto a RIA quanto o uso de sideróforos e transportadores especializados, garantindo sua proliferação mesmo sob condições de limitação de ferro (Matthaiou *et al.*, 2018; Schrettl; Haas, 2011). Assim, a anemia da inflamação decorrente de uma doença subjacente é corrigida, tratando-se a doença de base. O tratamento direto da anemia só deve ser realizado quando estiver prejudicando a recuperação do paciente com a doença crônica (Nemeth; Ganz, 2014). No caso das infecções fúngicas, a suplementação de ferro pode aumentar a sua disponibilidade para proliferação fúngica, com subsequente piora do quadro (de Brito *et al.*, 2023).

A proteína C reativa (PCR) é uma proteína reativa de fase aguda, induzido pela resposta as citocinas IL-6 e IL-1 $\beta$ . É um biomarcador sorológico inflamatório amplamente utilizado (Barichello *et al.*, 2022). Na APC tem sido observada com valores acima do normal (maior que 5 mg/dL), como relatado por Hou e colaboradores (2017) onde pacientes com a forma cavitária crônica apresentaram média de 15,1 mg/dL, enquanto AS 5,1 mg/dL e APISA 65,4 mg/dL. Niu e colaboradores (2020) relataram mediana de 14,9 mg/dL na APCC, 80,0 mg/dL na APISA e 8,7 mg/dL em

AS. De Oliveira e colaboradores (2023), relataram diferença estatística significativa ( $p= 0,018$ ) na PCR quando comparado entre as formas clínicas da APC, com mediana de 13 mg/dL na APCC, 19 mg/dL na APFC, 31 mg/dL na APISA e 2 mg/dL em nódulo de *Aspergillus*. No geral, os pacientes com AS e nódulo de *Aspergillus* possuem menos alterações e com isso, são menos inflamados quando comparados as demais formas clínicas, podendo ser útil na diferenciação dos subtipos (de Oliveira *et al.*, 2023b; Denning *et al.*, 2018).

Poucos são os estudos da PCR na APC antes e após o tratamento. Sehgal e colaboradores (2023) avaliaram os níveis de PCR após o tratamento da APC, e observaram que a PCR tem utilidade limitada no diagnóstico e acompanhamento de indivíduos com APC. Os níveis elevados de biomarcadores inflamatórios estão relacionados a um prognóstico desfavorável na APC (Niu *et al.*, 2020).

Com a entrada dos esporos fúngicos no pulmão, se ativa a imunidade mediada por células, levando ao aumento da produção dos leucócitos na medula óssea em resposta a infecção (Jakribettu *et al.*, 2019). A leucocitose é relatada na APC, como por Kang e colaboradores (2020) na Coreia, com média de 12.400/ $\mu$ /L e por Despois e colaboradores (2022) na Austrália uma mediana de leucócitos de 13.500/ $\mu$ /L. Valores mais altos de leucócitos são relatados em pacientes com APISA que na APCC e em AS (Niu *et al.*, 2020).

Neutrofilia pode estar presente devido a resposta do organismo à infecção e quando há formação de cavitações pulmonares. Chirumamilla e colaboradores (2024) na Índia, relataram que a falha na resposta de neutrófilos pode ser um fator importante para o aumento da suscetibilidade à infecção na APC e para o desenvolvimento de complicações pulmonares crônicas.

A linfopenia pode ocorrer devido alguma imunossupressão ou por uso de medicamentos imunossupressores, prejudicando a produção e a função dos linfócitos, especialmente dos linfócitos T CD4, como também durante a resposta inflamatória crônica, os linfócitos podem ser consumidos no local da infecção, levando à diminuição na circulação sanguínea (Glück *et al.*, 2005; Petramala *et al.*, 2024). A alteração está associada a um risco 1,4 vezes maior de infecção e a 1,7 vezes maior de morte relacionada à infecção na população geral (Warny *et al.*, 2018). A baixa contagem de linfócitos é relatado por Bongomin e colaboradores (2017) em 58,0% dos 144 pacientes com APC, sendo que 10,0% dos pacientes apresentaram

imunossupressão grave de linfócitos T CD4 (<200 células/ $\mu$ L), e os mesmos não viviam com a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV).

Quanto as alterações gerais relatadas na literatura, Nam e colaboradores (2023) observaram um aumento na PCR ( $p=0,044$ ) e nos neutrófilos ( $p=0,086$ ), e uma queda nos linfócitos ( $p=0,027$ ) dos pacientes com APC em deterioração após 6 meses de tratamento, como também um aumento na razão neutrófilo/linfócito ( $p=0,038$ ) com diferença estatística quando comparados ao grupo estável ou com melhora clínica. Jakribettu e colaboradores (2019) descreveram uma diminuição na hemoglobina ( $p=0,01$ ) nos pacientes com APC, aumento dos leucócitos ( $p=0,01$ ), dos monócitos ( $p<0,0001$ ) e neutrófilos ( $p=0,0007$ ), diminuição de linfócitos ( $p<0,0001$ ) quando comparados a indivíduos saudáveis. Quanto as chances de óbito, Chan e colaboradores (2016) em uma análise multivariada, observaram que os pacientes que evoluíram a óbito no momento da admissão apresentavam maiores contagens de leucócitos que aqueles que sobreviveram ( $p=0,011$ ), como também de neutrófilos ( $p=0,012$ ) e PCR elevada, mostrando uma atividade inflamatória alta e pior resposta ao tratamento.

Os monócitos desempenham um papel essencial na imunidade inata, fagocitando patógenos e modulando a resposta inflamatória, e frente a resposta infecciosa ao *Aspergillus*, fagocitam conídios e produzem citocinas para aumentar a atividade fungicida dos neutrófilos e facilitar as respostas adaptativas dos linfócitos T CD4 (Heung, 2020). Investigações de defeitos imunes nos monócitos foram realizadas e foi encontrada alterações na imunidade. Os monócitos de 10 pacientes com APC quando comparados a 10 indivíduos saudáveis mostraram menor expressão dos receptores TLR3 e TLR10, que são proteínas do sistema imunológico responsáveis por reconhecer patógenos e ativar a defesa do corpo. O TLR3 detecta RNA viral, mas também pode estar envolvido na resposta contra fungos, enquanto o TLR10 ajuda a regular a inflamação. Além disso, os pacientes apresentaram maior expressão de TREM1, um receptor que amplifica a inflamação. Isso sugere que a defesa contra o *Aspergillus fumigatus* é mais fraca nesses pacientes, enquanto a inflamação é exagerada (Smith *et al.*, 2014).

Na ADC, Theurl e colaboradores (2008) observaram níveis significativamente mais altos de hepcidina nos monócitos do que indivíduos saudáveis, sugerindo que a formação de hepcidina por monócitos ou macrófagos com os efeitos autócrinos na

homeostase do ferro fazem parte da defesa imunológica inata para reduzir a disponibilidade do nutriente essencial do ferro para patógenos.

## 2. RACIONAL DA PESQUISA

A aspergilose pulmonar crônica (APC) é uma infecção fúngica pouco estudada, de longa duração que afeta predominantemente pacientes com doença pulmonar subjacente. O processo inflamatório crônico associado à infecção pode levar a diversas alterações hematológicas e no metabolismo do ferro, impactando diretamente o manejo clínico desses pacientes.

Diante desse cenário, o hemograma e exames complementares como o ferrograma e a PCR desempenham um papel fundamental no diagnóstico e acompanhamento da APC. Essas avaliações laboratoriais permitem identificar padrões característicos da doença, incluindo possíveis anemias, e monitorar a resposta ao tratamento. A inflamação crônica interfere na homeostase do ferro e pode resultar em anemia da inflamação, enquanto a perdas de sangue por hemoptise e ou expectoração sanguinolenta crônica, em anemia por deficiência de ferro.

Avaliação de exames como hemograma, ferrograma, proteína C reativa, níveis de interleucina-6 (IL-6) e hepcidina, podem elucidar questões sobre as alterações hematológicas e as interações entre a inflamação e o metabolismo do ferro.

A investigação dessas alterações contribui para otimizar o manejo clínico da APC, permitindo um acompanhamento mais preciso da progressão da doença e da eficácia terapêutica ao longo do tempo.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Analisar os parâmetros hematológicos e do metabolismo do ferro em pacientes com aspergilose pulmonar crônica, antes e após instituição do tratamento.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- a) Analisar e interpretar os parâmetros hematológicos de pacientes com APC, antes e após instituição do tratamento
- b) Analisar e interpretar os aspectos envolvidos no metabolismo do ferro antes e após instituição do tratamento
- c) Correlacionar os parâmetros hematológicos e do metabolismo do ferro com parâmetros inflamatórios.

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1 Aspectos éticos**

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos (CEP) da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul sob número: 67923023.2.0000.0021.

### **4.2 Tipo e local do estudo**

Este é um estudo observacional, analítico, no qual o hemograma e os parâmetros do metabolismo do ferro de pacientes com APC foram analisados e comparados em dois estágios das doenças, durante a atividade da doença e após 6 meses de tratamento. O estudo foi realizado com pacientes atendidos no Hospital Dia Professora Esterina Corsini (Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian – HUMAP UFMS), no período de janeiro de 2016 a outubro de 2024.

### **4.3 Alocação dos participantes**

Os pacientes foram convidados a participar do estudo na ocasião de suas consultas agendadas no local do estudo. Aqueles que preencheram os critérios de inclusão, que concordaram com a pesquisa, e assinaram o termo de consentimento foram considerados como participantes da pesquisa.

#### **Critérios de inclusão**

Foram incluídos pacientes com 18 anos ou mais, de ambos os sexos, com diagnóstico de APC.

#### **Critério de exclusão**

Foram excluídas do estudo as gestantes, e os que tinham outras condições médicas que também interferiram no hemograma ou no metabolismo do ferro, como HIV, neoplasias, doenças autoimunes, doenças reumatológicas ou doença renal crônica e que estejam com TB ativa.

#### **Definição de caso**

Foi considerado caso de APC aqueles que preencheram critérios de definição conforme (Denning *et al.*, 2018);

Foi considerado com doença em atividade o paciente com sinais ou sintomas, sinais radiológicos de lesão ativa.

#### **4.4 Variáveis demográficas, clínicas, laboratoriais e epidemiológicas**

Foram utilizadas no estudo, as variáveis coletadas durante o atendimento e avaliação clínica, tais como idade, sexo, procedência, classificação de formas e gravidade clínica, medicamentos prescritos, resultados de exames microbiológicos ou sorológicos, aspectos tomográficos e evolução clínica. Essas variáveis foram obtidas dos prontuários clínicos dos pacientes.

Os resultados de hemograma e PCR da rotina assistencial foram coletados do sistema de informação laboratorial do hospital do estudo.

Soro dos pacientes, estavam estocados em biorrepositório e foram analisados quanto aos seguintes parâmetros: ferro sérico, Capacidade de Ligação do Ferro (TIBC), Índice de Saturação da Transferrina (ISAT), ferritina, dosagem de hepcidina e interleucina-6 (IL-6) por Elisa.

#### **4.5 Procedimentos realizados**

Exames da rotina assistencial foram realizados no Laboratório de Análises Clínicas - LAC do Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian – HUMAP.

**Hemograma completo:** pelo equipamento hematológico da Série-XN 3000 (Sysmex Corporation, Kobe, Japan) para analisar: série vermelha: eritrócitos totais, hemoglobina (HGB), hematócrito (HCT), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM); série branca: leucócitos totais, neutrófilos (neut%), linfócitos (linf%), monócitos (mono%), eosinófilos (eo%), basófilos (baso%) e plaquetas.

Valores de referência de acordo com Hoffbrand (2020): eritrócitos (4,5 - 6,5 milhões/mm<sup>3</sup>), HGB (13,5 - 17,5 g/dL), HCT (36,0 - 48,0%), VCM (80 - 95 fL), HCM (27 - 34 pg), leucócitos (4.500 - 11.000/mm<sup>3</sup>), neut% (41,0 - 77,0%), linf% (22,0 - 44,0%), mono% (1,0 - 8,0%), eo% (1,0 - 8,0%), baso% (0,0 - 1,0%), plaquetas (150.000 - 450.000/μL).

**Dosagem sérica da PCR:** pelo método imunoturbidimétrico (Cobas 600 analyzer e501). Valor de referência de acordo com o fabricante: 0 - 5 mg/L.

**Ferrograma e ferritina:** Ferro sérico foi determinado por ensaio colorimétrico (Roche ®); TIBC usando o ensaio colorimétrico (Roche ®). O índice de saturação da

transferrina (ISAT) foi calculado pela fórmula  $ISAT = \text{ferro s\u00e9rico}/TIBC \times (100)$  e expresso em porcentagem (%). Ferritina pelo teste de imunoensaio de eletroquimioluminesc\u00eancia (Roche \u2122). Valores de refer\u00eancia de acordo com o fabricante: Ferro (61 - 157  $\mu\text{g}/\text{dL}$ ), TIBC (250 - 410  $\mu\text{g}/\text{dL}$ ), ISAT (30 - 50%), Ferritina (30 - 400  $\text{ng}/\text{mL}$ ).

No Laborat\u00f3rio de Doen\u00e7as Infecciosas e Parasit\u00e1rias (LabDIP) da Faculdade de Medicina (FAMED) da UFMS foram realizados os seguintes exames:

**Hepcidina:** foram realizados em soro dos pacientes pelo m\u00e9todo imunoenzim\u00e1tico (Elisa) (Human Heparin Quantikine Elisa Kit/ Bio-Techne - R&D Systems \u2122). Para este estudo, foram utilizados valores de refer\u00eancia entre 13,7 e 23,1  $\text{ng}/\text{mL}$ , correspondentes a um intervalo de confian\u00e7a de 95,0% (IC 95%) com base na m\u00e9dia (18,4  $\text{ng}/\text{mL}$ ) derivada de uma coorte de 40 volunt\u00e1rios aparentemente saud\u00e1veis, conforme relatado pelos fabricantes.

**Interleucina-6 (IL-6):** foram realizados em soro pelo m\u00e9todo Elisa (Human IL-6 Quantikine HS Elisa Kit/ Bio-Techne - R&D Systems \u2122). Para este estudo, foram utilizados valores de refer\u00eancia entre 1,2-1,8  $\text{pg}/\text{mL}$ , correspondentes a um intervalo de confian\u00e7a de 95,0% (IC 95%) com base na m\u00e9dia (1,5  $\text{pg}/\text{mL}$ ) derivada de uma coorte de 30 volunt\u00e1rios aparentemente saud\u00e1veis, conforme relatado pelos fabricantes.

#### 4.6 Classifica\u00e7\u00e3o da anemia com baixos n\u00edveis de ferro s\u00e9rico

Anemia ferropriva: caracterizada por n\u00edveis baixos de ferro s\u00e9rico, com redu\u00e7\u00e3o do ISAT e n\u00edveis baixos de ferritina (Weiss; Ganz; Goodnough, 2019)

Anemia da inflama\u00e7\u00e3o: caracterizada pelo n\u00edvel de ferro s\u00e9rico diminuído, redu\u00e7\u00e3o de ISAT, ferritina normal ou aumentada (Weiss; Ganz; Goodnough, 2019).

#### 4.7 An\u00e1lise de dados

A an\u00e1lise estat\u00edstica foi realizada no software Jamovi (Version 1.6) para Windows.

O teste de Shapiro-Wilk foi usado para determinar se as vari\u00e1veis cont\u00ednuas t\u00eam distribui\u00e7\u00e3o normal. Os dados que seguiram uma distribui\u00e7\u00e3o normal foram apresentados como m\u00e9dia  $\pm$  desvio padr\u00e3o (DP). Os dados que n\u00e3o seguiram distribui\u00e7\u00e3o normal foram apresentados como mediana e primeiro e terceiro quartis [Q1;Q3].

As associações entre variáveis categóricas emparelhadas foram correlacionadas por teste de McNemar. Teste T de student ou teste U de Mann-Whitney, foram utilizados para associar variáveis numéricas quando os dados seguiram uma distribuição normal ou não normal, respectivamente.

Para as análises entre dois estágios no mesmo grupo foram usados T student para amostras pareadas ou Wilcoxon W quando os dados seguiram uma distribuição normal ou não normal, respectivamente.

As correlações entre as variáveis foram realizadas pelo coeficiente de Pearson (R) ou Spearman (Rho) quando distribuição normal e não normal. As correlações significativas foram assim classificadas:

De 0 a 0,19: muito fraca

De 0,2 a 0,39: fraca

De 0,40 a 0,59: moderada

De 0,6 a 0,79: forte

De 0,8 a 1: como muito forte

Foi considerado estatisticamente significativo o valor de  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

Foram incluídos no estudo 14 pacientes, nem todos eles acompanharam após 6 meses. As características demográficas e clínicas basais são mostradas na tabela 4. Observa-se predomínio de casos com APCC e/ou APFC, com mais de 50 anos e com histórico de ter tido TB anteriormente. Escavações pulmonares e presença de bola fúngica foram os achados mais frequentes nos exames de imagem.

Dos 14 pacientes, 3 (21,4%) evoluíram para óbito. Um deles faleceu 1 ano e 2 meses após o diagnóstico, em decorrência de choque séptico pulmonar e lesão pulmonar estrutural grave. Os outros dois faleceram após 1 ano e 6 meses, e 3 anos e 4 meses, respectivamente, sem causa relatada, pois os óbitos ocorreram em suas cidades de procedência, onde não foi possível obter mais detalhes. A mediana de tempo foi de 1,5 anos (Q1: 1,3; Q3: 2,4).

**Tabela 4** - Características demográficas e clínicas dos pacientes com APC

Variável	Mediana [1º; 3º quartis] ou n (%)
Idade	52,5 [36,3; 62,8]
Sexo masculino	7 (50)
Cor pretos e pardos	9 (64,3)
Tabagista	7 (50)
Etilista	6 (42,8)
Uso de drogas ilícitas	1 (7,1)
Privação de liberdade	1 (7,1)
IMC (n=8)	23,5 [16,6; 26,4]
Comorbidades pulmonares	
Histórico de TBP	13 (92,9)
DPOC	4 (28,6)
Asma	1 (7,1)
Histórico de pneumonias	2 (14,3)
Forma da APC	
APCC	8 (57,1)
APFC	4 (28,6)
AS	2 (14,3)
Alterações na TC	

**Tabela 4** - Características demográficas e clínicas dos pacientes com APC

Variável	Mediana [1º; 3º quartis] ou n (%)
Cavitação	12 (85,7)
Bola fúngica	12 (85,7)
Espessamento pleural	7 (50,0)
Espessamento da parede da cavitação	3 (21,4)
Bronquiectasias	8 (57,1)
Tempo de sintomas até o diagnóstico	
Até 1 mês	4 (28,6)
De 2 a 6 meses	5 (35,7)
De 6 meses há 1 ano	1 (7,1)
Mais de 1 ano	2 (14,3)
Não especificado	2 (14,3)
Antifúngico instituído	
Itraconazol	14 (100,0)

IMC: índice de massa corporal; TBP: tuberculose pulmonar; DPOC: doença pulmonar obstrutiva crônica, APC: aspergilose pulmonar crônica; APCC: aspergilose pulmonar cavitária crônica; APFC: aspergilose fibrosante crônica; AS: aspergiloma simples; TC: tomografia computadorizada. (n=14)

No momento da inclusão, os sintomas predominantes foram tosse (n=13; 92,9%), expectoração (n=10; 71,4%) e dispneia (n=9). Quase a metade apresentou hemoptise. Comparamos os sintomas clínicos iniciais e com 6 meses de tratamento, e observamos diferença estatística nos sintomas de expectoração e hemoptise (Tabela 5).

**Tabela 5** – Sintomas apresentados pelos pacientes com APC na inclusão e após 6 meses da instituição do tratamento

Sintoma inicial (n=14)	n (%)	Sintoma após 6 meses (n=12)	n (%)	p *
Tosse	13 (92,9)	Tosse	6 (50,0)	0,059
Expectoração	10 (71,4)	Expectoração	1 (8,3)	0,020
Dispneia	9 (64,3)	Dispneia	3 (25)	0,096
Hemoptise	6 (42,9)	Hemoptise	1 (8,3)	0,046
Perda de peso	4 (28,6)	Perda de peso	2 (16,7)	0,705

**Tabela 5** – Sintomas apresentados pelos pacientes com APC na inclusão e após 6 meses da instituição do tratamento

Sintoma inicial (n=14)	n (%)	Sintoma após 6 meses (n=12)	n (%)	p *
Dor torácica	2 (14,3)	Dor torácica	2 (16,7)	1,000
Febre	2 (14,3)	Febre	1 (8,3)	0,317

Valor do p obtido pelo teste de McNemar, considerando o emparelhamento de pacientes com seguimento

A tabela 6 mostra as frequências das alterações hematológicas, do metabolismo do ferro e de provas inflamatórias dos pacientes. Observa-se que mais da metade apresentaram linfopenia relativa, anemia, hipoferremia, ISAT baixo e PCR elevada, sem melhora após seis meses de tratamento.

**Tabela 6** - Alterações observadas nos exames iniciais e após 6 meses

Alterações	n inicial	n (%)	n (após 6 meses)	n (%)	p *
Anemia	14	8 (57,1)	11	6 (54,5)	0,564
Leucocitose	14	5 (35,7)	11	5 (45,4)	1,000
Neutrofilia	14	3 (21,4)	11	3 (27,3)	0,564
Linfopenia	14	9 (64,3)	11	4 (36,4)	0,083
Monocitose	14	6 (42,9)	11	2 (18,2)	0,083
Plaquetose	14	3 (21,4)	11	3 (27,3)	1,000
PCR elevada	12	8 (66,7)	11	6 (54,5)	0,414
Ferro baixo	13	8 (61,5)	7	4 (57,1)	0,317
TIBC elevado	12	2 (16,6)	7	0 (0)	0,317
TIBC baixo	12	4 (33,3)	7	1 (14,3)	0,157
ISAT baixo	12	8 (66,7)	7	7 (100)	0,059
Ferritina baixa	13	2 (15,4)	6	3 (50)	0,157

PCR: proteína c- reativa; TIBC: capacidade total de ligação do ferro; ISAT: índice de saturação da transferrina; valor do p obtido pelo teste de McNemar, considerando o emparelhamento de pacientes com seguimento

A tabela 7 mostra os valores medianos dos parâmetros hematológicos, de metabolismo do ferro e inflamatórios. Pode-se observar uma tendência ( $p=0,07$ ) de redução do percentual de neutrófilos e da PCR após seis meses.

**Tabela 7 - Mediana dos parâmetros laboratoriais iniciais e após 6 meses**

Parâmetros	N	Mediana [1°; 3° quartis]	N	Mediana [1°; 3° quartis]	p *
Eritrócitos	14	4,6 milhões/mm <sup>3</sup> [4,2; 48]	11	4,5 milhões/mm <sup>3</sup> [4,1; 5,1]	0,615
Hemoglobina	14	11,9 g/dL [10,3; 13,4]	11	11,9 g/dL [10,6; 13,9]	0,813
Hematócrito	14	36,9% [33,3; 40,2]	11	38,7% [34,5; 42,5]	0,576
VCM	14	84,3 fL [78,2; 87,6]	11	83,1 fL [75,7; 86,6]	0,723
HCM	14	27,9 pg [25,2; 28,4]	11	23,1 pg [21,5; 28,8]	0,308
Leucócitos	14	9.415/mm <sup>3</sup> [7.020; 13.690]	11	10.640/mm <sup>3</sup> [7.650; 12.800]	0,347
Neutrófilos	14	72,5% [65,5; 76,5]	11	67,0% [53,0; 76,5]	0,077
Linfócitos	14	20,0% [13,8; 21,8]	11	24,0% [15,5; 29,5]	0,052
Eosinófilos	14	2,0% [0,2; 2,7]	11	2,0% [1,5; 3,0]	0,714
Monócitos	14	7,0% [5,0; 9,0]	11	7,0% [6,5; 7,5]	0,158
Basófilos	14	0,0% [0; 0,7]	11	0,0% [0; 0,5]	0,773
Plaquetas	14	304.500/μL [258.000; 356.250]	11	321.000/μL [281.000; 411.000]	0,638
PCR	12	16,2 mg/L [1,8; 52,8]	11	6,36 mg/L [2,44; 31,7]	0,072
Ferro	13	43,0 μg/dL [35,0; 107,0]	7	47,0 μg/dL [24,0; 63,0]	0,913
TIBC	12	304,0 μg/dL [224,0; 333,0]	7	291,0 μg/dL [280,0; 315,0]	0,683
ISAT	12	22,5% [9,7; 35,5]	7	16,0% [9,0; 20,5]	0,551
Ferritina	13	134 ng/mL [44,0; 281,0]	6	66,5 ng/mL [18,8; 120,0]	0,248
IL-6	12	10,4 pg/mL [1,7; 44,4]	4	4,62 pg/mL [3,72; 5,40]	0,185
Hepcidina	12	18,5 ng/mL [2,8; 34,7]	4	11,7 ng/mL [1,9; 22,4]	0,185

VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; PCR: proteína c-reativa; TIBC: capacidade total de ligação do ferro, ISAT: índice de saturação da transferrina; IL-6: interleucina-6; valor do p obtido pelo teste de T de student ou Wilcoxon W, considerando o emparelhamento de pacientes com seguimento

Na tabela 8, podem ser observadas as características individuais de cada paciente nos parâmetros laboratoriais, anemia característica e presença de hemoptise.

A anemia observada em oito pacientes na inclusão foi caracterizada como ferropriva em um paciente (12,5%), ADC em dois (25,0%), mista em três (37,5%) e indefinida em dois (25,0%). Após seis meses de tratamento, anemia estava presente em seis pacientes, quatro apresentavam anemia ferropriva (66,6%) e dois indefinidos (33,3%), conforme a tabela 8. Não foi observada diferença estatística nos momentos iniciais e com 6 meses de tratamento nos parâmetros analisados, conforme a tabela 7.

**Tabela 8 – Características gerais dos parâmetros dos exames laboratoriais, tipo de anemia característica e presença de hemoptise**

<b>Paciente Inclusão</b>	<b>Microcitose</b>	<b>Hipocromia</b>	<b>HGB</b>	<b>Ferro</b>	<b>ISAT</b>	<b>TIBC</b>	<b>Ferritina</b>	<b>Hepcidina</b>	<b>PCR</b>	<b>IL-6</b>	<b>Anemia característica</b>	<b>Hemoptise</b>
1	Não	Não	Normal	Normal	Baixo	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Sem anemia	Não
2	Não	Não	Baixa	Baixo	Baixo	Baixa	Normal	Alta	Alta	Alta	ADC	Não
3	Não	Não	Baixa	Baixo	Baixo	Alta	Baixa	Baixa	Alta	Alta	Mista	Não
4	Sim	Sim	Baixa	Baixo	Baixo	Baixa	Normal	Alta	Alta	Alta	Mista	Sim
5	Sim	Sim	Baixa	Baixo	Baixo	Alta	Baixa	Baixa	Normal	Normal	Ferropriva	Sim
6	Não	Não	Normal	Normal	Normal	Normal	Alta	Normal	Normal	Normal	Sem anemia	Sim
7	Não	Não	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	NR	Normal	Sem anemia	Não
8	Sim	Sim	Normal	Baixo	Baixo	Normal	Normal	Alta	Alta	Alta	Sem anemia	Não
9	Não	Não	Baixa	Baixo	NR	NR	NR	NR	NR	NR	Indefinida	Não
10	Não	Não	Normal	Normal	Alta	Normal	Normal	Baixa	Alta	Alta	Sem anemia	Não
11	Não	Não	Baixa	Baixo	Baixo	Baixa	Normal	Alta	Alta	Alta	ADC	Sim
12	Sim	Sim	Baixa	NR	NR	NR	NR	NR	Alta	NR	Indefinida	Sim
13	Não	Não	Baixa	Baixo	Baixo	Baixa	Normal	Baixa	Alta	Alta	Mista	Sim
14	Não	Não	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Alta	Normal	Alta	Sem anemia	Não
<b>Após 6 meses</b>	<b>Microcitose</b>	<b>Hipocromia</b>	<b>HGB</b>	<b>Ferro</b>	<b>ISAT</b>	<b>TIBC</b>	<b>Ferritina</b>	<b>Hepcidina</b>	<b>PCR</b>	<b>IL-6</b>	<b>Anemia característica</b>	<b>Hemoptise</b>
1	Não	Sim	Normal	Normal	Baixa	Normal	Normal	Baixa	Normal	Baixa	Sem anemia	Não
2	Não	Não	Normal	Normal	Baixa	Normal	Normal	Normal	Normal	Alta	Sem anemia	Não
3	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NI
4	Sim	Sim	Baixa	Baixo	Baixa	Baixa	NR	NR	Alta	NR	Ferropriva	Não
5	Sim	Sim	Baixa	Baixo	Baixa	Não	Baixa	NR	Alta	NR	Ferropriva	Não
6	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NI
7	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	Não
8	Sim	Sim	Baixa	Baixo	Baixa	NR	Baixa	NR	Alta	NR	Ferropriva	Não
9	Não	Não	Baixa	NR	NR	NR	NR	NR	Alta	NR	Indefinida	Não
10	Não	Não	Normal	NR	NR	NR	NR	NR	Alta	NR	Sem anemia	Não
11	Não	Não	Normal	NR	NR	NR	NR	NR	Normal	NR	Sem anemia	Não
12	Sim	Sim	Baixa	NR	NR	NR	NR	NR	Alta	NR	Indefinida	Não
13	Não	Sim	Baixa	Baixo	Baixo	Normal	Baixa	Baixa	Normal	Alta	Ferropriva	Sim
14	Não	Não	Normal	Normal	Baixa	Normal	Normal	Alta	Normal	Alta	Sem anemia	Não

ADC: anemia da doença crônica; HGB: hemoglobina; ISAT: índice de saturação da transferrina; TIBC: capacidade total de ligação do ferro; NR: não realizado; NI: não informado

A tabela 9 mostra as comorbidades pulmonares prévias, classificação clínica da APC, como também sexo e idade.

**Tabela 9 – Sexo, idade e comorbidade pulmonar prévia e classificação da APC**

Paciente	Sexo	Idade	Comorbidade pulmonar	Classificação da APC
1	M	26	TBP prévia	APCC
2	M	64	TBP prévia e DPOC	APFC
3	M	56	TBP prévia	APCC
4	F	35	TBP prévia e pneumonias de repetição	APCC
5	M	80	TBP prévia e DPOC	APCC
6	M	41	TBP prévia	APCC
7	M	62	TBP prévia e asma	APCC
8	F	25	TBP prévia	APFC
9	F	59	TBP prévia e DPOC	APFC
10	F	63	TBP prévia	APCC
11	F	49	TBP prévia	AS
12	M	40	TBP prévia e DPOC	APFC
13	F	70	TBP prévia e histórico de pneumonia	APCC
14	F	33	Nenhuma	AS

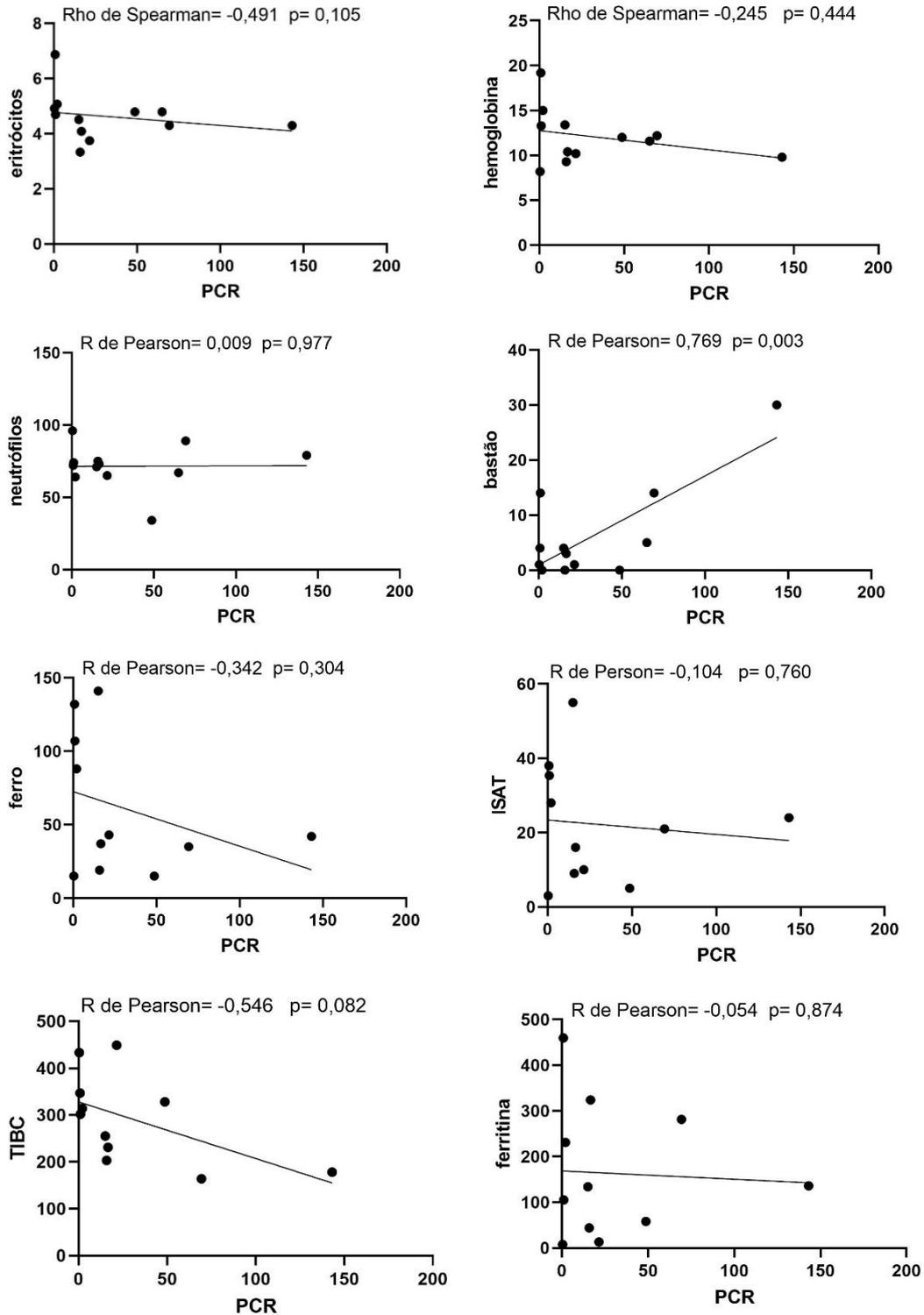
TBP: tuberculose pulmonar; DPOC: doença pulmonar obstrutiva crônica; APCC: aspergilose pulmonar crônica; APFC: aspergilose fibrosante crônica; AS: aspergiloma simples

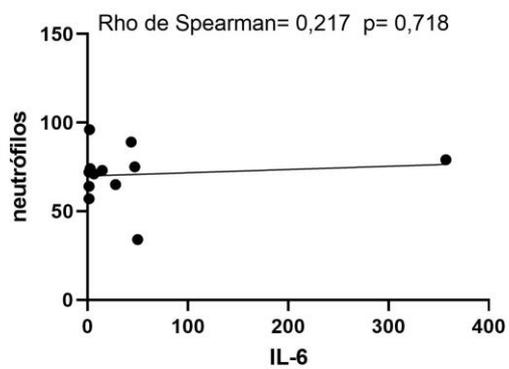
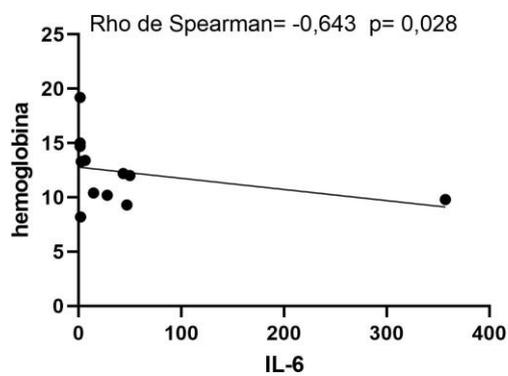
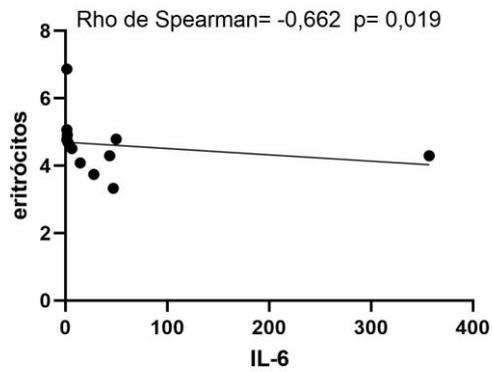
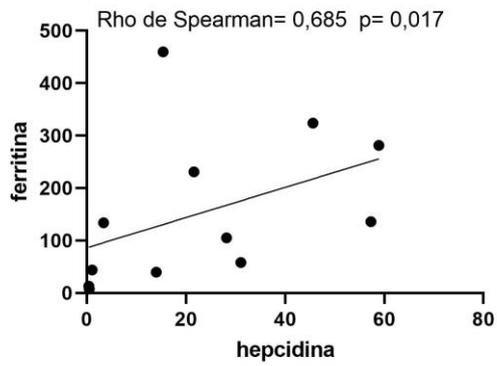
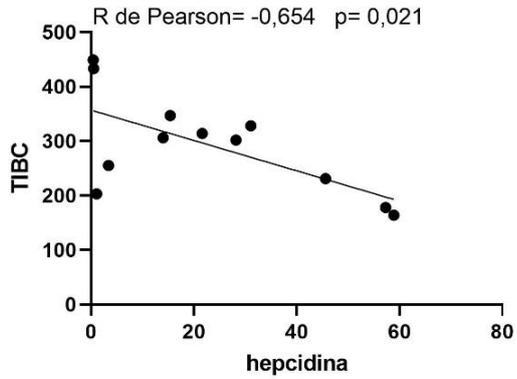
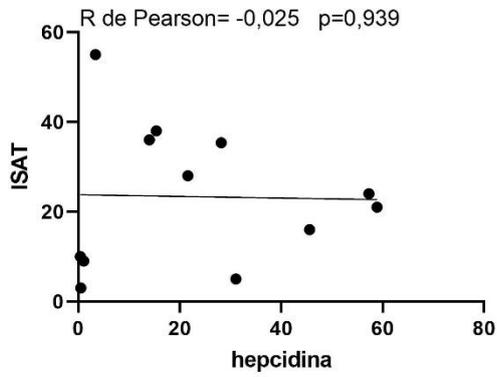
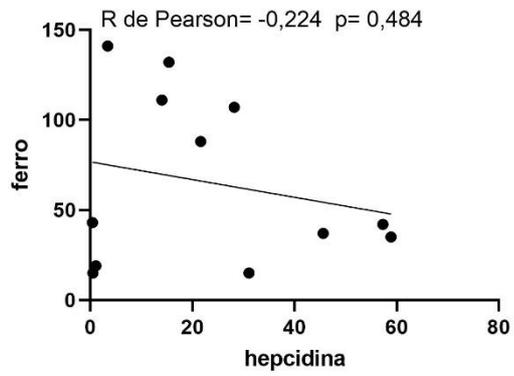
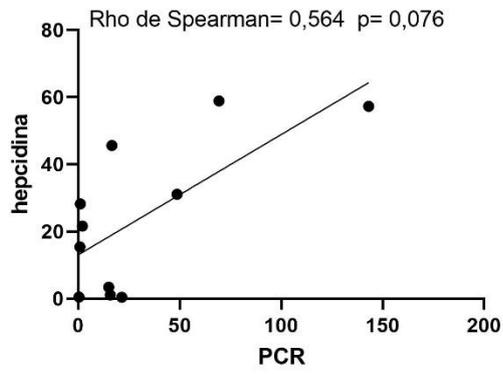
Foram relatados o uso dos seguintes corticoides utilizados pelos pacientes DPOC: formoterol + budesonida, fumarato de formoterol diidratado, salbutamol e prednisona.

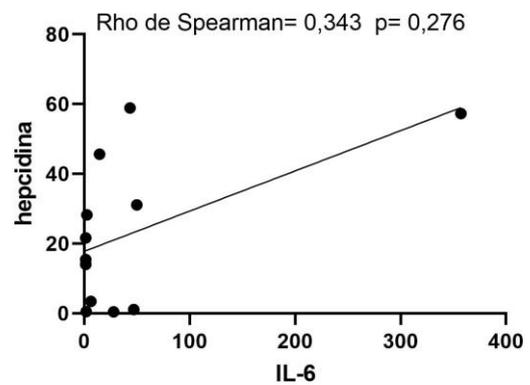
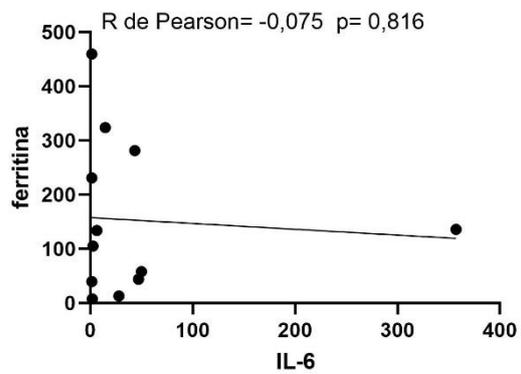
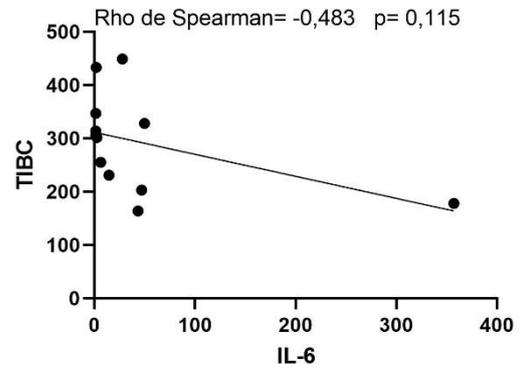
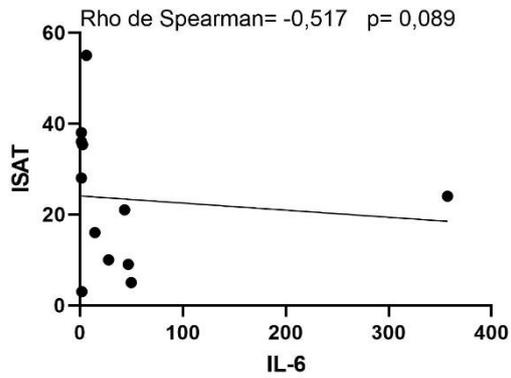
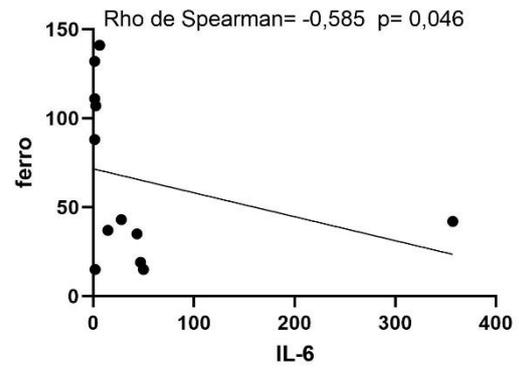
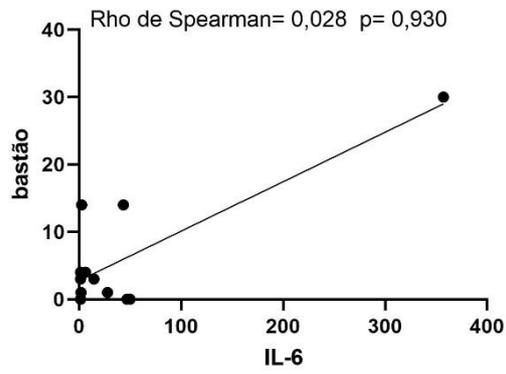
A paciente 13 (tabela 8 e 9) em específico, era classificada como APCC, tinha histórico de TBP, havia uma anemia mista que tornou-se ferropriva, e mesmo com a persistência da hemoptise, teve melhora no parâmetro do ferrograma (ferro: de 19,0 µg/dL para 47,0 µg/dL) e dos marcadores inflamatórios (PCR: de 15,8 para 1,6 mg/L) após 6 meses de tratamento, porém em seus exames de imagem haviam vários acometimentos pulmonares com cavitação medindo 75 x 47 mm, bola fúngica, espessamento pleural e da parede da cavitação, e bronquiectasias.

A figura 7, mostra as análises de correlação entre os marcadores inflamatórios e as demais variáveis. Observa-se que níveis de PCR se correlacionam de forma direta com valores relativos de bastonetes (forte) e uma tendência de correlação com a hepcidina (moderada). Outro marcador inflamatório, a IL-6, se correlacionou de forma indireta com eritrócitos (forte), HGB (forte), e ferro (moderada). A hepcidina se correlacionou diretamente com a ferritina (forte) e indiretamente com o TIBC (moderada).

**Figura 7** - Representação dos gráficos de correlação de Pearson e Spearman conforme teste de normalidade







Fonte: elaborada na aplicação Graphpad Prism 9.0.2

## 6. DISCUSSÃO

Os pacientes do estudo tinham, em sua maioria, histórico de TBP, mais de 50 anos de idade, nas formas APCC ou APFC, com tosse, expectoração e dispneia e foram tratados com itraconazol. Essas características são comuns nas casuísticas de APC (Despois *et al.*, 2022; Nam *et al.*, 2023) e conferem à amostra uma representatividade da APC em geral.

Os quatro pacientes que possuem a comorbidade DPOC tinham histórico de TBP, apresentavam as formas de APCC e APFC, e fizeram uso de corticoide afim da melhora de exacerbações e inflamação. O dano pulmonar da comorbidade propriamente dita já predispõe a infecção por APC (Phoompoung; Chayakulkeeree, 2020). Além disso, sabe-se que o uso de alguns corticoides pode causar uma imunossupressão, como prednisona e budesonida, prejudicando a imunidade inata e adaptativa, sendo um forte preditor pra desenvolvimento da APC e predispondo outras infecções como na TBP (Lee *et al.*, 2013; Phoompoung; Chayakulkeeree, 2020).

No presente estudo, grande parte dos pacientes apresentava anemia. A anemia na APC tem sido observada em outros estudos, como em 39,5% de 38 pacientes no Vietnã, porém neste estudo, a anemia não foi classificada e diferenciada (Nguyen *et al.*, 2021). Nam e colaboradores (2023), observaram que o grupo de pacientes com maior dano pulmonar apresentaram menor nível de HGB em comparação aos com danos menores. Nos pacientes havia predominância das formas APCC e APFC, que são formas com importante dano pulmonar, o que pode justificar a elevada frequência de HGB abaixo dos níveis normais.

Entre os pacientes com hemoptise, a maioria apresentava anemia e níveis baixos de ferro. Dos oito pacientes analisados, cinco (62,5%) mostraram aumento nos níveis de HGB após seis meses, embora a mediana geral tenha permanecido abaixo do valor de referência. Em relação ao ferro, entre os pacientes que realizaram o exame, um teve melhora, enquanto quatro continuaram com níveis baixos. Im e colaboradores (2021) analisaram 196 pacientes com APC, e observaram que 79 foram tratados por até 12 meses, dos quais 20 (25,0%) apresentaram hemoptise. Entre os 117 pacientes que necessitavam de mais de 12 meses de tratamento, 43 (37,0%) apresentaram hemoptise. Embora o estudo não tenha analisado os parâmetros do ferro, é amplamente reconhecido que o ferro é essencial para a síntese de HGB (Muckenthaler *et al.*, 2017).

Dos cinco pacientes que apresentaram hemoptise no início do tratamento, três deles foram acompanhados por seis meses e somente uma persistiu com o sintoma ( $p= 0,046$ ). A paciente referida possui uma cavitação extensa no parênquima pulmonar com presença de bola fúngica. Lee e colaboradores (2014) observaram que pacientes com diâmetro de cavidade maior ou igual a 22 mm com presença de aspergiloma maior ou igual a 18 mm apresentam risco aumentado de hemoptise. Sabe-se também que maiores cavidades tem associação à pior resposta terapêutica (Nam *et al.*, 2023).

Expectoração e hemoptise foram menos frequentes após seis meses de tratamento, enquanto tosse e dispneia persistiram. Sabe-se que a resposta terapêutica na APC é lenta e nem sempre ocorre a recuperação completa (Akram *et al.*, 2021) o que explica esses achados, bem como a persistência de níveis elevados de marcadores inflamatórios aqui observados.

A anemia associada à inflamação, foi diagnosticada em dois pacientes que, além de apresentar um hemograma e perfil de ferro compatíveis com essa condição, apresentava níveis bem elevados de hepcidina. Após seis meses de tratamento, os pacientes não apresentavam mais anemia, com normalização dos níveis de hepcidina e ferro, assim como a redução dos marcadores inflamatórios, incluindo a PCR e IL-6. Estes casos são típicos de anemia da inflamação, que após o início do tratamento da doença subjacente, observamos melhora tanto da anemia, como da inflamação (Poggiali; Amicis; Motta, 2014).

Dois dos pacientes com perfil misto, estavam com a hepcidina baixa (0,4 e 1,1 ng/mL). Anemias mistas são difíceis de diferenciar, e a análise da hepcidina nestes casos podem ser vantajosos no momento da investigação (Svenson *et al.*, 2015).

PCR normalizou com seis meses de tratamento apenas em três pacientes e IL-6 em nenhum, refletindo a persistência de inflamação mesmo após seis meses de tratamento antifúngico (Sproston; Ashworth, 2018). Camara e colaboradores (2015), relataram mediana de 25 mg/L (Q1 13; Q3 74) de PCR em 11 pacientes com APCC. Akram e colaboradores (2021), relataram mediana de 13,7 mg/L (Q1 9,3; Q3 17,5). Sehgal e colaboradores (2023), observaram que mesmo após 6 meses de tratamento, PCR diminuiu ou permaneceu estável em 60% dos casos, mas em 40% aumentaram, em uso de itraconazol. Os pacientes do presente estudo estavam com os parâmetros inflamatórios dentro da mediana prevista na literatura, e após 6 meses apesar da

melhora, ainda apresentavam inflamação persistente nos valores medianos gerais. Na APC, portanto, observa-se um persistente processo inflamatório crônico sugerindo que a atividade da doença não é suprimida nos primeiros seis meses de tratamento, e que dependendo da gravidade do acometimento pulmonar, o tratamento pode não ser suspenso.

Bongomin (2017), relatou linfopenia significativa em pacientes com APC, destacando que 10% dos indivíduos sem infecção documentada por HIV apresentaram supressão grave de linfócitos CD4. Além da linfopenia geral, o estudo reforça a ideia emergente de que a imunodeficiência leve e os polimorfismos genéticos desempenham um papel crucial no desenvolvimento da APC. No presente estudo, houve linfopenia relativa com uma tendência de melhora seis meses de tratamento antifúngico. Esse achado sugere que o tratamento adequado da APC, ao reduzir a carga fúngica e controlar a infecção, pode ter um impacto positivo na função imunológica dos pacientes, favorecendo a recuperação dos linfócitos.

Na APC, o estudo de Smith e colaboradores (2014) indica que a expressão reduzida de TLR3 e TLR10 pode comprometer o reconhecimento dos monócitos de maneira eficaz a *A. fumigatus*, levando a uma ativação inflamatória prolongada. Como compensação, há um aumento na expressão de TREM1, que amplifica a inflamação e pode contribuir para o recrutamento excessivo de monócitos. Esses achados ajudam a explicar a monocitose observada no início do nosso estudo, possivelmente refletindo um estado inflamatório persistente.

Dados de Hensel e colaboradores (2017) sugerem que a ativação exacerbada do sistema imunológico inato, incluindo a elevação dos monócitos, pode estar associada a piores desfechos clínicos, onde identificaram que pacientes com infecções graves e monocitose apresentaram pior prognóstico, especialmente em ambientes emergenciais, onde a resposta inflamatória desregulada pode contribuir para a progressão de uma doença infecciosa. No entanto, no presente estudo observou-se uma tendência de melhora da monocitose e de outros parâmetros inflamatórios, como a PCR após seis meses de tratamento antifúngico, sugerindo que o tratamento pode ajudar a modular a resposta inflamatória. Enquanto em infecções graves e desreguladas a monocitose e a inflamação exacerbada estão associadas a piores desfechos, na APC a regulação da infecção frente ao tratamento parecem

favorecer a resolução da monocitose e melhora da inflamação, o que contribui para uma melhora clínica e, possivelmente, um prognóstico mais favorável.

Devido à resposta inflamatória do sistema imune, a leucocitose é uma alteração comum frente à infecção. Leucocitose é relatada na literatura em 80 pacientes na Coreia com nódulos de *Aspergillus* com mediana de 12.400 leucócitos (Q1 7.600; Q3 14.800), em que tiveram diferença estatística nas contagens entre os grupos de pacientes com que tinham ou não presença de cavitação ( $p=0,029$ ), sugerindo que a presença de cavitação, pode ser um indicativo de uma forma mais agressiva ou avançada da infecção, com associação a uma resposta inflamatória mais intensa, refletida em uma leucocitose maior (Kang; Park; Jhun, 2020). Em nosso estudo, a maioria dos pacientes apresentavam a forma cavitária, seguido pela fibrosante e houve persistência da leucocitose na maioria dos pacientes.

Ainda sobre os achados de leucocitose, em outro estudo na Austrália com 28 pacientes foi relatado uma mediana de 13.500 leucócitos, que embora a amostra tenha sido menor, o valor encontrado está dentro da faixa esperada para a leucocitose em infecções pulmonares, refletindo a resposta imunológica diante da infecção fúngica (Despois *et al.*, 2022). Já no estudo de Jhun e colaboradores (2013), de 119 pacientes, 24,0% apresentavam leucócitos acima de 10.000/ $\mu$ l, e embora o valor não seja tão alto quanto o observado nos estudos anteriores, ainda assim houve uma quantia de pacientes apresentando leucocitose esperada em infecções pulmonares crônicas, refletindo na variabilidade da resposta imune entre os pacientes, com alguns apresentando uma reação mais acentuada à infecção, enquanto outros têm uma resposta menos intensa.

A análise estatística vista na figura 7 mostra uma correlação positiva forte entre os níveis de neutrófilos bastonetes e a PCR. Os bastões são uma forma imatura dos neutrófilos liberados pela medula óssea em resposta a estímulos inflamatórios ou infecciosos agudos quando a quantidade de neutrófilos maduros não é suficiente (Margraf; Lowell; Zarbock, 2022). A forte correlação observada sugere que, em situações de inflamação, o aumento de bastões reflete a mobilização do sistema imune para lidar com o estímulo agressor, enquanto a PCR, como um marcador inflamatório de fase aguda, indica a intensidade da resposta inflamatória sistêmica, contribuindo para o entendimento da gravidade do processo inflamatório.

A correlação do ferro com a IL-6 indicou uma relação negativa moderada e significativa. Isso sugere que, à medida que os níveis de ferro aumentam, os níveis de IL-6 tendem a diminuir. A IL-6 durante processos inflamatórios, pode reduzir a disponibilidade de ferro no organismo, principalmente por meio da regulação da hepcidina, inibindo a absorção do ferro (Weiss; Ganz; Goodnough, 2019).

Hemoglobina (HGB) e interleucina-6 (IL-6), tiveram uma correlação negativa moderada, como também ocorreu nos eritrócitos. Com à medida que os níveis de IL-6 aumentam, os níveis de hemoglobina e eritrócitos tendem a diminuir. A IL-6 pode reduzir a produção de hemoglobina ao estimular a produção de hepcidina, diminuindo a quantidade de ferro disponível essencial para a eritropoiese (Miller, 2013).

Hepcidina e ferritina tiveram uma relação positiva moderada e estatisticamente significativa. Com o aumento da hepcidina, a ferritina também tende a aumentar. A ferritina é a proteína responsável pelo armazenamento do ferro, e essa relação se dá devido quando há o aumento da hepcidina, há diminuição nos ferros disponíveis e aumento nos estoques de ferro (Weiss; Ganz; Goodnough, 2019).

Hepcidina e TIBC tiveram uma correlação negativa indicando que, à medida que os níveis de hepcidina aumentam, a TIBC tende a diminuir, e vice-versa. Essa relação reflete o papel regulador da hepcidina no metabolismo do ferro. Quando a hepcidina está elevada, como em estados inflamatórios ou doenças crônicas, a absorção intestinal de ferro e sua liberação dos estoques são reduzidas, resultando em menor produção de transferrina pelo fígado e, conseqüentemente, menor TIBC. Por outro lado, quando a hepcidina está baixa, como na deficiência de ferro, a produção de transferrina aumenta para otimizar a captação do ferro disponível, elevando a TIBC (Weiss; Ganz; Goodnough, 2019).

No geral os pacientes apresentam baixa mortalidade ao longo de um ano de tratamento, como também melhora e a estabilidade dos resultados clínicos, sorológicos e radiológicos quando utilizado terapia antifúngica prolongada como podemos observar neste e no estudo de Oliveira e colaboradores (2023).

Como limitação do estudo apontamos o número pequeno de pacientes e o caráter retrospectivo das coletas, de forma que nem todos os pacientes foram submetidos a todos os exames avaliados. Também houve a perda de seguimento de alguns durante o tratamento, e um acompanhamento de seguimento de 12 meses para observar a evolução poderia ser útil. No entanto, as casuísticas de APC em

estudo em um único centro, são habitualmente pequenas, considerando a baixa suspeita clínica, a falta de exames laboratoriais apropriados e conseqüentemente o subdiagnóstico da doença.

## 7. CONCLUSÃO

As mais frequentes alterações hematológicas observadas em pacientes com APC foram anemia, leucocitose com linfopenia e monocitose relativas, no entanto não muito intensas, o que está de acordo com o caráter crônico desta infecção.

Hipoferremia foi observada em mais da metade dos casos, predominando a hipoferremia associada a níveis normais ou baixos de ferritina . A diferenciação da anemia por deficiência de ferro da anemia da inflamação é importante no manejo clínico, pois a suplementação de ferro pode ser prejudicial no tratamento da APC porque favorece o crescimento do fungo. Por outro lado, a suplementação pode ser útil para aqueles com anemia ferropriva decorrente das perdas constantes de sangue por hemoptise.

Após seis meses de tratamento, a maioria dos pacientes ainda apresenta processo inflamatório ativo, demonstrado pelos níveis persistentemente elevados de PCR em mais da metade dos pacientes analisados antes e após tratamento, ainda que tenham reduzidos com o uso do antifúngico. Conseqüentemente, não ocorreram mudanças significativas nas alterações hematológicas e do metabolismo do ferro observadas na inclusão no estudo.

O acompanhamento de marcadores inflamatórios como PCR e a melhora dos parâmetros dos leucócitos como no caso dos monócitos e linfócitos podem ser úteis na monitorização da resposta ao tratamento e na compreensão da evolução da doença.

Foram observadas correlações entre a IL-6 e nível sérico de ferro e eritrócitos, mostrando que ambos estão reduzidos no processo inflamatório.

Há poucos estudos sobre as células hematológicas na APC e ainda menos sobre o metabolismo do ferro que busquem esclarecer a anemia quando presente, trazendo um esclarecimento inédito para as abordagens de manejo clínico.

## REFERÊNCIAS

- AGARWAL, R. *et al.* Allergic bronchopulmonary aspergillosis. **The Indian Journal of Medical Research**, [s. l.], v. 151, n. 6, p. 529–549, 2020.
- AGARWAL, R. *et al.* Itraconazole in chronic cavitary pulmonary aspergillosis: a randomised controlled trial and systematic review of literature. **Mycoses**, [s. l.], v. 56, n. 5, p. 559–570, 2013.
- AGARWAL, R. Severe Asthma with Fungal Sensitization. **Current Allergy and Asthma Reports**, [s. l.], v. 11, n. 5, p. 403–413, 2011.
- AGUILAR-COMPANY, J. *et al.* Chronic pulmonary aspergillosis in a tertiary care centre in Spain: A retrospective, observational study. **Mycoses**, [s. l.], v. 62, n. 9, p. 765–772, 2019.
- AHN, B.-C. *et al.* Pulmonary Aspergilloma Mimicking Metastasis from Papillary Thyroid Cancer. **Thyroid®**, [s. l.], v. 21, n. 5, p. 555–558, 2011.
- AKRAM, W. *et al.* Clinical manifestations, associated risk factors and treatment outcomes of Chronic Pulmonary Aspergillosis (CPA): Experiences from a tertiary care hospital in Lahore, Pakistan. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 16, n. 11, p. e0259766, 2021.
- ALASTRUEY-IZQUIERDO, A. *et al.* Treatment of Chronic Pulmonary Aspergillosis: Current Standards and Future Perspectives. **Respiration**, [s. l.], v. 96, n. 2, p. 159–170, 2018.
- ANDREWS, N. C. Molecular control of iron metabolism. **Best Practice & Research. Clinical Haematology**, [s. l.], v. 18, n. 2, p. 159–169, 2005.
- BALAJEE, S. A. *et al.* Aspergillus species identification in the clinical setting. **Studies in Mycology**, [s. l.], v. 59, n. 1, p. 39–46, 2007.
- BARICHELLO, T. *et al.* Biomarkers for sepsis: more than just fever and leukocytosis—a narrative review. **Critical Care**, [s. l.], v. 26, p. 14, 2022.
- BARNES, P. D.; MARR, K. A. Aspergillosis: Spectrum of Disease, Diagnosis, and Treatment. **Infectious Disease Clinics of North America**, [s. l.], v. 20, n. 3, Fungal Infections, p. 545–561, 2006.
- BAXTER, C. G. *et al.* Pulmonary aspergillosis: an alternative diagnosis to lung cancer after positive [18F]FDG positron emission tomography. **Thorax**, [s. l.], v. 66, n. 7, p. 638–640, 2011.
- BONGOMIN, F. *et al.* Innate and Adaptive Immune Defects in Chronic Pulmonary Aspergillosis. **Journal of Fungi**, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 26, 2017.
- BONGOMIN, F. Post-tuberculosis chronic pulmonary aspergillosis: An emerging public health concern. **PLOS Pathogens**, [s. l.], v. 16, n. 8, p. e1008742, 2020.

BULPA, P.; DIVE, A.; SIBILLE, Y. Invasive pulmonary aspergillosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease. **The European Respiratory Journal**, [s. l.], v. 30, n. 4, p. 782–800, 2007.

CAMARA, B. *et al.* Characteristics and outcomes of chronic pulmonary aspergillosis: a retrospective analysis of a tertiary hospital registry. **The Clinical Respiratory Journal**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 65–73, 2015.

CAMASCHELLA, C. Iron deficiency. **Blood**, [s. l.], v. 133, n. 1, p. 30–39, 2019.

CAMASCHELLA, C.; NAI, A.; SILVESTRI, L. Iron metabolism and iron disorders revisited in the hepcidin era. **Haematologica**, [s. l.], v. 105, n. 2, p. 260–272, 2020.

CHAN, J. F.-W. *et al.* A 10-year study reveals clinical and laboratory evidence for the ‘semi-invasive’ properties of chronic pulmonary aspergillosis. **Emerging Microbes & Infections**, [s. l.], v. 5, n. 4, p. e37, 2016.

CHOWDHARY, A. *et al.* Emergence of Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus* Strains due to Agricultural Azole Use Creates an Increasing Threat to Human Health. **PLOS Pathogens**, [s. l.], v. 9, n. 10, p. e1003633, 2013.

COLEMAN, R. M.; KAUFMAN, L. Use of the Immunodiffusion Test in the Serodiagnosis of Aspergillosis. **Applied Microbiology**, [s. l.], v. 23, n. 2, p. 301–308, 1972.

COLOMBO, S. A. P. *et al.* Defective Interferon-Gamma Production Is Common in Chronic Pulmonary Aspergillosis. **The Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 225, n. 10, p. 1822–1831, 2022.

CONRAD, M. E.; UMBREIT, J. N.; MOORE, E. G. Iron absorption and transport. **The American Journal of the Medical Sciences**, [s. l.], v. 318, n. 4, p. 213–229, 1999.

DE BEULE, K. *et al.* The treatment of aspergillosis and aspergilloma with itraconazole, clinical results of an open international study (1982-1987). **Mycoses**, [s. l.], v. 31, n. 9, p. 476–485, 1988.

DE BRITO, E. da C. A. *et al.* Iron metabolism disorders of patients with chronic paracoccidioidomycosis. **PloS One**, [s. l.], v. 18, n. 6, p. e0282218, 2023.

DE OLIVEIRA, V. F. *et al.* Itraconazole Serum Trough Concentrations Using Oral Capsules for the Treatment of Chronic Pulmonary Aspergillosis: What is the Target?. **Mycopathologia**, [s. l.], v. 188, n. 5, p. 693–698, 2023a.

DE OLIVEIRA, V. F. *et al.* Sensitivity of Antigen, Serology, and Microbiology Assays for Diagnosis of the Subtypes of Chronic Pulmonary Aspergillosis at a Teaching Hospital in São Paulo, Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 108, n. 1, p. 22–26, 2023b.

DECRAMER, M.; JANSSENS, W.; MIRAVITLLES, M. Chronic obstructive pulmonary disease. **Lancet (London, England)**, [s. l.], v. 379, n. 9823, p. 1341, 2012.

DENNING, D. W. *et al.* British Society for Medical Mycology proposed standards of care for patients with invasive fungal infections. **The Lancet. Infectious Diseases**, [s. l.], v. 3, n. 4, p. 230–240, 2003.

DENNING, D. W. *et al.* Case Definition of Chronic Pulmonary Aspergillosis in Resource-Constrained Settings. **Emerging Infectious Diseases**, [s. l.], v. 24, n. 8, p. e171312, 2018.

DENNING, D. W. *et al.* Chronic pulmonary aspergillosis: rationale and clinical guidelines for diagnosis and management. **European Respiratory Journal**, [s. l.], v. 47, n. 1, p. 45–68, 2015.

DENNING, D. W. Global incidence and mortality of severe fungal disease. **The Lancet Infectious Diseases**, [s. l.], v. 24, n. 7, p. e428–e438, 2024.

DENNING, D. W. *et al.* Pulmonary Aspergillosis in the Acquired Immunodeficiency Syndrome. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 324, n. 10, p. 654–662, 1991.

DENNING, D. W.; PLEUVRY, A.; COLE, D. C. Global burden of chronic pulmonary aspergillosis as a sequel to pulmonary tuberculosis. **Bulletin of the World Health Organization**, [s. l.], v. 89, p. 864–872, 2011.

DESAI, S. R. *et al.* Chronic Aspergillosis of the Lungs: Unravelling the Terminology and Radiology. **European Radiology**, [s. l.], v. 25, n. 10, p. 3100–3107, 2015.

DESPOIS, O. *et al.* Chronic Pulmonary Aspergillosis: Burden, Clinical Characteristics and Treatment Outcomes at a Large Australian Tertiary Hospital. **Journal of Fungi**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 110, 2022.

DONNELLY, J. P. *et al.* Revision and Update of the Consensus Definitions of Invasive Fungal Disease From the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, [s. l.], v. 71, n. 6, p. 1367–1376, 2019.

DOS SANTOS, A. P. *et al.* Performance of the IMMY® sona Aspergillus lateral flow assay for the detection of galactomannan in tracheal aspirate samples from Brazilian patients with COVID-19-associated pulmonary aspergillosis: Cross-sectional and systematic review of literature. **Mycoses**, [s. l.], v. 67, n. 8, p. e13789, 2024.

FRAENKEL, P. G. Anemia of Inflammation: A Review. **The Medical clinics of North America**, [s. l.], v. 101, n. 2, p. 285–296, 2017.

GADKOWSKI, L. B.; STOUT, J. E. Cavitory Pulmonary Disease. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 21, n. 2, p. 305–333, 2008.

GANZ, T. Hepcidin and iron regulation, 10 years later. **Blood**, [s. l.], v. 117, n. 17, p. 4425–4433, 2011.

GEISER, D. M. Sexual structures in Aspergillus: morphology, importance and genomics. **Medical Mycology**, [s. l.], v. 47 Suppl 1, p. S21-26, 2009.

GLÜCK, T. *et al.* Immune status and risk for infection in patients receiving chronic immunosuppressive therapy. **The Journal of Rheumatology**, [s. l.], v. 32, n. 8, p. 1473–1480, 2005.

GODET, C. *et al.* CT Imaging Assessment of Response to Treatment in Chronic Pulmonary Aspergillosis. **CHEST**, [s. l.], v. 150, n. 1, p. 139–147, 2016.

GREENE, R. E. *et al.* Imaging Findings in Acute Invasive Pulmonary Aspergillosis: Clinical Significance of the Halo Sign. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 44, n. 3, p. 373–379, 2007.

GUGNANI, H. C. Ecology and taxonomy of pathogenic aspergilli. **Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library**, [s. l.], v. 8, p. s346-357, 2003.

HACHEM, R. *et al.* Invasive aspergillosis caused by *Aspergillus terreus*: an emerging opportunistic infection with poor outcome independent of azole therapy. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s. l.], v. 69, n. 11, p. 3148–3155, 2014.

HANSEN, D. *et al.* Environmental sampling of particulate matter and fungal spores during demolition of a building on a hospital area. **Journal of Hospital Infection**, [s. l.], v. 70, n. 3, p. 259–264, 2008.

HAYES, G. E.; NOVAK-FRAZER, L. Chronic Pulmonary Aspergillosis—Where Are We? and Where Are We Going?. **Journal of Fungi**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 18, 2016.

HENRIET, S. S. V.; VERWEIJ, P. E.; WARRIS, A. *Aspergillus nidulans* and chronic granulomatous disease: a unique host-pathogen interaction. **The Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 206, n. 7, p. 1128–1137, 2012.

HENSEL, M. *et al.* Peripheral monocytosis as a predictive factor for adverse outcome in the emergency department: Survey based on a register study. **Medicine**, [s. l.], v. 96, n. 28, p. e7404, 2017.

HEUNG, L. J. Monocytes and the Host Response to Fungal Pathogens. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 10, p. 34, 2020.

HINSON, K. F. W.; MOON, A. J.; PLUMMER, N. S. Broncho-pulmonary Aspergillosis: A Review and a Report of Eight New Cases. **Thorax**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 317, 1952.

HONG, S.-B. *et al.* Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. **Mycologia**, [s. l.], v. 97, n. 6, p. 1316–1329, 2005.

HOPE, W. W.; WALSH, T. J.; DENNING, D. W. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. **The Lancet. Infectious Diseases**, [s. l.], v. 5, n. 10, p. 609–622, 2005.

HOU, X. *et al.* Clinical features and diagnosis of chronic pulmonary aspergillosis in Chinese patients. **Medicine**, [s. l.], v. 96, n. 42, p. e8315, 2017.

HOUBRAKEN, J. *et al.* Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (Eurotiales): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. **Studies in Mycology**, [s. l.], v. 95, p. 5–169, 2020.

IBRAHIM-GRANET, O. *et al.* Phagocytosis and Intracellular Fate of *Aspergillus fumigatus* Conidia in Alveolar Macrophages. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 71, n. 2, p. 891–903, 2003.

IM, Y. *et al.* Impact of treatment duration on recurrence of chronic pulmonary aspergillosis. **Journal of Infection**, [s. l.], v. 83, n. 4, p. 490–495, 2021.

JAKRIBETTU, R. P. *et al.* Clinical and laboratory profile of chronic pulmonary aspergillosis: a retrospective study. **Egyptian Journal of Bronchology**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 109–113, 2019.

JANSSENS, I.; LAMBRECHT, B. N.; VAN BRAECKEL, E. *Aspergillus* and the Lung. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, [s. l.], v. 45, n. 1, p. 3–20, 2024.

JHUN, B. W. *et al.* Clinical characteristics and treatment outcomes of chronic pulmonary aspergillosis. **Medical Mycology**, [s. l.], v. 51, n. 8, p. 811–817, 2013.

KANAUJIA, R.; SINGH, S.; RUDRAMURTHY, S. M. Aspergillosis: an Update on Clinical Spectrum, Diagnostic Schemes, and Management. **Current Fungal Infection Reports**, [s. l.], p. 1–12, 2023.

KANG, N.; PARK, J.; JHUN, B. W. Clinical Characteristics and Treatment Outcomes of Pathologically Confirmed *Aspergillus* Nodules. **Journal of Clinical Medicine**, [s. l.], v. 9, n. 7, p. 2185, 2020.

KELMENSEN, V. A. Treatment of Pulmonary Aspergillosis. **Diseases of the Chest**, [s. l.], v. 36, n. 4, p. 442–443, 1959.

KIM, B.-G. *et al.* Mortality and lung function decline in patients who develop chronic pulmonary aspergillosis after lung cancer surgery. **BMC Pulmonary Medicine**, [s. l.], v. 22, p. 436, 2022.

KIM, S. Y. *et al.* Semiinvasive Pulmonary Aspergillosis. **American Journal of Roentgenology**, [s. l.], v. 174, n. 3, p. 795–798, 2000.

KOSMIDIS, C.; DENNING, D. W. The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. **Thorax**, [s. l.], v. 70, n. 3, p. 270–277, 2015.

KRYLOV, V. B. *et al.* Synthesis of oligosaccharides related to galactomannans from *Aspergillus fumigatus* and their NMR spectral data. **Organic & Biomolecular Chemistry**, [s. l.], v. 16, n. 7, p. 1188–1199, 2018.

KUDO, A.; OKAWA, Y.; SHIBATA, N. Significant structural change in both O- and N-linked carbohydrate moieties of the antigenic galactomannan from *Aspergillus fumigatus* grown under different culture conditions. **Glycobiology**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 74–87, 2015.

LAMOTH, F. *Aspergillus fumigatus*-Related Species in Clinical Practice. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 7, 2016. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2016.00683/full>. Acesso em: 17 dez. 2024.

LANG, M. *et al.* Non-surgical treatment options for pulmonary aspergilloma. **Respiratory Medicine**, [s. l.], v. 164, p. 105903, 2020.

LARKIN, P. M. K. *et al.* A Collaborative Tale of Diagnosing and Treating Chronic Pulmonary Aspergillosis, from the Perspectives of Clinical Microbiologists, Surgical Pathologists, and Infectious Disease Clinicians. **Journal of Fungi**, [s. l.], v. 6, n. 3, p. 106, 2020.

LEDOUX, M.-P.; HERBRECHT, R. Invasive Pulmonary Aspergillosis. **Journal of Fungi**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 131, 2023.

LEE, J.-K. *et al.* Clinical course and prognostic factors of pulmonary aspergilloma. **Respirology**, [s. l.], v. 19, n. 7, p. 1066–1072, 2014.

LEE, C.-H. *et al.* Risk factors for pulmonary tuberculosis in patients with chronic obstructive airway disease in Taiwan: a nationwide cohort study. **BMC Infectious Diseases**, [s. l.], v. 13, p. 194, 2013.

LOWES, D. *et al.* Predictors of mortality in chronic pulmonary aspergillosis. **European Respiratory Journal**, [s. l.], v. 49, n. 2, 2017. Disponível em: <https://publications.ersnet.org/content/erj/49/2/1601062>. Acesso em: 9 dez. 2024.

MACKENZIE, D. W. R.; PHILPOT, C. M. Counterimmunoelectrophoresis as a routine mycoserological procedure. **Mycopathologia**, [s. l.], v. 57, n. 1, p. 1–7, 1975.

MAGHRABI, F.; DENNING, D. W. The Management of Chronic Pulmonary Aspergillosis: The UK National Aspergillosis Centre Approach. **Current Fungal Infection Reports**, [s. l.], v. 11, n. 4, p. 242–251, 2017.

MARGRAF, A.; LOWELL, C. A.; ZARBOCK, A. Neutrophils in acute inflammation: current concepts and translational implications. **Blood**, [s. l.], v. 139, n. 14, p. 2130–2144, 2022.

MATTHAIIOU, E. I. *et al.* Iron: an essential nutrient for *Aspergillus fumigatus* and a fulcrum for pathogenesis. **Current opinion in infectious diseases**, [s. l.], v. 31, n. 6, p. 506–511, 2018.

MCCLENNY, N. Laboratory detection and identification of *Aspergillus* species by microscopic observation and culture: the traditional approach. **Medical Mycology**, [s. l.], v. 43, n. Supplement\_1, p. S125–S128, 2005.

MEDICINE, T. L. R. Chronic pulmonary aspergillosis: help is on the way. **The Lancet Respiratory Medicine**, [s. l.], v. 4, n. 2, p. 83, 2016.

MILLER, J. L. Iron Deficiency Anemia: A Common and Curable Disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, [s. l.], v. 3, n. 7, p. a011866, 2013.

MOHAMED, A. *et al.* Serological evidence of chronic pulmonary Aspergillosis in tuberculosis patients in Kenya. **BMC Infectious Diseases**, [s. l.], v. 22, p. 798, 2022.

MOODLEY, L.; PILLAY, J.; DHEDA, K. Aspergilloma and the surgeon. **Journal of Thoracic Disease**, [s. l.], v. 6, n. 3, p. 202–209, 2014.

MOURA, S.; CERQUEIRA, L.; ALMEIDA, A. Invasive pulmonary aspergillosis: current diagnostic methodologies and a new molecular approach. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, [s. l.], v. 37, n. 8, p. 1393–1403, 2018.

MUCKENTHALER, M. U. *et al.* A Red Carpet for Iron Metabolism. **Cell**, [s. l.], v. 168, n. 3, p. 344–361, 2017.

MUNIAPPAN, A. *et al.* Surgical Therapy of Pulmonary Aspergillomas: A 30-Year North American Experience. **The Annals of Thoracic Surgery**, [s. l.], v. 97, n. 2, p. 432–438, 2014.

NAM, Y. *et al.* Chronic cavitary pulmonary aspergillosis: Serial clinical and CT findings correlated with antifungal treatment and patient response. **Mycoses**, [s. l.], v. 66, n. 2, p. 106–117, 2023.

NEMETH, E. *et al.* IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. **The Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 113, n. 9, p. 1271–1276, 2004.

NEMETH, E.; GANZ, T. Anemia of Inflammation. **Hematology/oncology clinics of North America**, [s. l.], v. 28, n. 4, p. 671–681, 2014.

NGUYEN, N. T. B. *et al.* Chronic Pulmonary Aspergillosis Situation among Post Tuberculosis Patients in Vietnam: An Observational Study. **Journal of Fungi (Basel, Switzerland)**, [s. l.], v. 7, n. 7, p. 532, 2021.

NICOLAS, G. *et al.* The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. **The Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 110, n. 7, p. 1037–1044, 2002.

NIU, Y. *et al.* Clinical features and outcome of patients with chronic pulmonary aspergillosis in China: A retrospective, observational study. **Journal de Mycologie Médicale**, [s. l.], v. 30, n. 4, p. 101041, 2020.

OCANSEY, B. K. *et al.* Chronic pulmonary aspergillosis is common among patients with presumed tuberculosis relapse in Ghana. **Medical Mycology**, [s. l.], v. 60, n. 9, p. myac063, 2022.

OHBA, H. *et al.* Clinical characteristics and prognosis of chronic pulmonary aspergillosis. **Respiratory Medicine**, [s. l.], v. 106, n. 5, p. 724–729, 2012.

OTU, A. *et al.* The clinical spectrum of aspergillosis in chronic obstructive pulmonary disease. **Infection**, [s. l.], v. 51, n. 4, p. 813–829, 2023.

PAGE, I. D.; RICHARDSON, M.; DENNING, D. W. Antibody testing in aspergillosis--quo vadis?. **Medical Mycology**, [s. l.], v. 53, n. 5, p. 417–439, 2015.

PAIVA, A. A.; RONDÓ, P. H.; GUERRA-SHINOHARA, E. M. Parâmetros para avaliação do estado nutricional de ferro. **Revista de Saúde Pública**, [s. l.], v. 34, p. 421–426, 2000.

PASSERA, E. *et al.* Pulmonary Aspergilloma: Clinical Aspects and Surgical Treatment Outcome. **Thoracic Surgery Clinics**, [s. l.], v. 22, n. 3, Surgical Management of Infectious Pleuropulmonary Diseases, p. 345–361, 2012.

PASTOR, F. J.; GUARRO, J. Treatment of *Aspergillus terreus* infections: A clinical problem not yet resolved. **International Journal of Antimicrobial Agents**, [s. l.], v. 44, n. 4, p. 281–289, 2014.

PATEL, Avani R *et al.* Diagnosing Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis: A Review. **Cureus**, [s. l.], v. 11, n. 4, p. e4550, 2019.

PATTERSON, T. F. *et al.* Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Aspergillosis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, [s. l.], v. 63, n. 4, p. e1–e60, 2016.

PERSON, A. K. *et al.* *Aspergillus niger*: an unusual cause of invasive pulmonary aspergillosis. **Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v. 59, n. Pt 7, p. 834–838, 2010.

PETRAMALA, L. *et al.* Clinical impact of transient lymphopenia. **Clinical and Experimental Medicine**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 77, 2024.

PHOOMPOUNG, P.; CHAYAKULKEEREE, M. Chronic Pulmonary Aspergillosis Following Nontuberculous Mycobacterial Infections: An Emerging Disease. **Journal of Fungi**, [s. l.], v. 6, n. 4, p. 346, 2020.

PIGEON, C. *et al.* A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. **The Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 276, n. 11, p. 7811–7819, 2001.

POGGIALI, E.; AMICIS, M. M. D.; MOTTA, I. Anemia of chronic disease: A unique defect of iron recycling for many different chronic diseases. **European Journal of Internal Medicine**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 12–17, 2014.

RITCHIE, A. I.; WEDZICHA, J. A. Definition, Causes, Pathogenesis, and Consequences of Chronic Obstructive Pulmonary Disease Exacerbations. **Clinics in Chest Medicine**, [s. l.], v. 41, n. 3, Chronic Obstructive Pulmonary Disease, p. 421–438, 2020.

ROY, C. N.; ENNS, C. A. Iron homeostasis: new tales from the crypt. **Blood**, [s. l.], v. 96, n. 13, p. 4020–4027, 2000.

SAMSON, R. A. *et al.* The species concept in *Aspergillus*: recommendations of an international panel. **Studies in Mycology**, [s. l.], v. 59, p. 71–73, 2007.

SANGEETHA, J.; THANGADURAI, D. Staining Techniques and Biochemical Methods for the Identification of Fungi. In: GUPTA, V. K. *et al.* (org.). **Laboratory Protocols in Fungal Biology: Current Methods in Fungal Biology**. New York, NY: Springer, 2013. p. 237–257. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-2356-0\\_19](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-2356-0_19). Acesso em: 5 fev. 2025.

SCHRETTL, M.; HAAS, H. Iron homeostasis—Achilles' heel of *Aspergillus fumigatus*? **Current Opinion in Microbiology**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 400–405, 2011.

SCHWARZ, M. C. R. *et al.* Current Analytical Methods and Challenges for the Clinical Diagnosis of Invasive Pulmonary Aspergillosis Infection. **Journal of Fungi**, [s. l.], v. 10, n. 12, p. 829, 2024.

SEHGAL, I. S. *et al.* An overview of the available treatments for chronic cavitary pulmonary aspergillosis. **Expert Review of Respiratory Medicine**, [s. l.], v. 14, n. 7, p. 715–727, 2020.

SEHGAL, I. S. *et al.* Efficacy of 12-months oral itraconazole versus 6-months oral itraconazole to prevent relapses of chronic pulmonary aspergillosis: an open-label, randomised controlled trial in India. **The Lancet Infectious Diseases**, [s. l.], v. 22, n. 7, p. 1052–1061, 2022.

SEHGAL, I. S. *et al.* Efficiency of *A. fumigatus*-specific IgG and galactomannan testing in the diagnosis of simple aspergilloma. **Mycoses**, [s. l.], v. 62, n. 12, p. 1108–1115, 2019.

SEHGAL, I. S. *et al.* Role of C-Reactive Protein and Erythrocyte Sedimentation Rate in the Diagnosis and Monitoring of Treatment Response in Treatment Naïve Subjects with Chronic Pulmonary Aspergillosis. **Mycopathologia**, [s. l.], v. 188, n. 5, p. 705–711, 2023.

SMITH, N. L. D. *et al.* Reduced expression of TLR3, TLR10 and TREM1 by human macrophages in Chronic cavitary pulmonary aspergillosis, and novel associations of VEGFA, DENND1B and PLAT. **Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, [s. l.], v. 20, n. 11, p. 0960-968, 2014.

SMITH, N. L.; DENNING, D. W. Underlying conditions in chronic pulmonary aspergillosis including simple aspergilloma. **European Respiratory Journal**, [s. l.], v. 37, n. 4, p. 865–872, 2011.

SPROSTON, N. R.; ASHWORTH, J. J. Role of C-Reactive Protein at Sites of Inflammation and Infection. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 9, 2018. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2018.00754/full>. Acesso em: 16 jan. 2025.

SRAI, S. K. S.; BOMFORD, A.; MCARDLE, H. J. Iron transport across cell membranes: molecular understanding of duodenal and placental iron uptake. **Best Practice & Research. Clinical Haematology**, [s. l.], v. 15, n. 2, p. 243–259, 2002.

SVANES, C. *et al.* Early life origins of chronic obstructive pulmonary disease. **Thorax**, [s. l.], v. 65, n. 1, p. 14–20, 2010.

SVENSON, N. J. *et al.* Iron Age or New Age: Ironing out the Diagnosis of Anaemia of Inflammation from Iron Deficiency Anaemia. **Blood**, [s. l.], v. 126, n. 23, p. 3354, 2015.

TACCONE, F. S. *et al.* Epidemiology of invasive aspergillosis in critically ill patients: clinical presentation, underlying conditions, and outcomes. **Critical Care**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 7, 2015.

TAKAZONO, T.; IZUMIKAWA, K. Recent Advances in Diagnosing Chronic Pulmonary Aspergillosis. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 9, p. 1810, 2018.

THEURL, I. *et al.* Autocrine formation of hepcidin induces iron retention in human monocytes. **Blood**, [s. l.], v. 111, n. 4, p. 2392–2399, 2008.

TIEW, P. Y. *et al.* A high-risk airway mycobiome is associated with frequent exacerbation and mortality in COPD. **European Respiratory Journal**, [s. l.], v. 57, n. 3, 2021. Disponível em: <https://publications.ersnet.org/content/erj/57/3/2002050>. Acesso em: 28 nov. 2024.

TSANG, C.-C. *et al.* Taxonomy and evolution of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* in the omics era – Past, present and future. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, [s. l.], v. 16, p. 197–210, 2018.

VERMA, N. *et al.* Invasive fungal infections amongst patients with acute-on-chronic liver failure at high risk for fungal infections. **Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver**, [s. l.], v. 39, n. 3, p. 503–513, 2019.

VISAGIE, C. M. *et al.* A review of recently introduced *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and other Eurotiales species. **Studies in Mycology**, [s. l.], v. 107, n. 1, p. 1–66, 2024.

VOLPE-CHAVES, C. E. *et al.* Prevalence of chronic pulmonary aspergillosis regarding time of tuberculosis diagnosis in Brazil. **Mycoses**, [s. l.], v. 65, n. 7, p. 715–723, 2022.

WARNY, M. *et al.* Lymphopenia and risk of infection and infection-related death in 98,344 individuals from a prospective Danish population-based study. **PLOS Medicine**, [s. l.], v. 15, n. 11, p. e1002685, 2018.

WEISS, G.; GANZ, T.; GOODNOUGH, L. T. Anemia of inflammation. **Blood**, [s. l.], v. 133, n. 1, p. 40–50, 2019.

WIANS, F. H. *et al.* Discriminating between iron deficiency anemia and anemia of chronic disease using traditional indices of iron status vs transferrin receptor concentration. **American Journal of Clinical Pathology**, [s. l.], v. 115, n. 1, p. 112–118, 2001.