



MESTRADO EM CIÊNCIAS
AMBIENTAIS E SAÚDE

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU
MESTRADO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SAÚDE

**AVALIAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DE PACIENTES SUBMETIDOS AO TESTE DE
GALACTOMANANA SÉRICA COM SUSPEITA DE ASPERGILOSE INVASIVA**

DAIANE DE OLIVEIRA CUNHA

GOIÂNIA – GOIÁS

Março de 2017



MESTRADO EM CIÊNCIAS
AMBIENTAIS E SAÚDE

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU
MESTRADO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SAÚDE

**AVALIAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DE PACIENTES SUBMETIDOS AO TESTE DE
GALACTOMANANA SÉRICA COM SUSPEITA DE ASPERGILOSE INVASIVA**

DAIANE DE OLIVEIRA CUNHA

Orientador: Prof. Dr. Antonio Márcio Teodoro Cordeiro Silva

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Saúde, da Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais e Saúde.

GOIÂNIA – GOIÁS

Março de 2017

Dados Internacionais de Catalogação da Publicação (CIP)
(Sistema de Bibliotecas PUC Goiás)

C972a

Cunha, Daiane de Oliveira

Avaliação epidemiológica de pacientes submetidos ao teste de galactomanana serica com suspeita de aspergilose invasiva[manuscrito]/ Daiane de Oliveira Cunha

71f.;il.30 cm

Texto em português com resumo em inglês
Dissertação (mestrado) -- Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Ambientais e Saúde, Goiânia, 2017

1. Aspergilose - (subd. geog.). 2. Polimorfismo (Genética).
I.Silva, Antonio Márcio Teodoro Cordeiro. II.Pontifícia Universidade Católica de Goiás. III. Título.

CDU: 575(043)



DISSERTAÇÃO DO MESTRADO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SAÚDE
DEFENDIDA EM 13 DE MARÇO DE 2017 E CONSIDERADA

APROVADA PELA BANCA EXAMINADORA:

1)


Prof. Dr. Antônio Márcio Teodoro Cordeiro Silva / PUC Goiás (Presidente)

2)


Prof. Dr. Rogério José de Almeida / UFG (Membro Externo)

3)


Prof. Dr. Cesar Augusto Sam Tiago Vilanova-Costa / PUC Goiás (Membro)

4)

Prof. Dra. Jacqueline Andréia Bernardes Leão Cordeiro / UFG (Suplente)

DEDICATÓRIA

A Deus, aquele que me concedeu forças, nunca permitindo com que eu fracassasse ou desistisse, sendo meu maior refúgio em meio às dificuldades.

Aos meus Pais, que não mediram esforços ao oferecer o melhor para minha vida, ensinando-me a vivê-la com dignidade e perseverança, sempre buscando a realização dos meus sonhos.

Aos meus familiares que foram fundamentais para que eu pudesse chegar onde cheguei.

A todos que de maneira direta ou indireta contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, o meu muito Obrigada!

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Antonio Márcio Teodoro Cordeiro Silva, meu orientador, por todo apoio e profissionalismo. Obrigada por sempre me incentivar, me repreender e me defender quando julgou que eu mereci. Sou grata por todos os ensinamentos que me proporcionastes, pela amizade que me premiastes e por eu ter chegado até aqui, pois sem o seu incentivo nada disso seria possível. Sempre serás, para mim, um exemplo de sabedoria e de Biomédico.

À Pontifícia Universidade Católica de Goiás de modo geral, ao Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde e à todos os Docentes do Programa por abrirem as portas e terem sido peças chaves para o meu crescimento profissional.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG), por ter me proporcionado uma bolsa de estudo, a qual foi crucial para a conclusão do meu mestrado.

À Profa. Ms Hellen da Silva Cintra de Paula por todos os conhecimentos compartilhados durante o primeiro ano de realização deste trabalho, sou grata imensamente por ter me acolhido e me ajudado quando precisei.

À Profa. Dr^a. Vera Aparecida Saddi pela oportunidade concedida de desenvolver o meu trabalho no Hospital Araújo Jorge, obrigada também pela oportunidade de ter usufruído um pouco dos seus conhecimentos.

Ao Professor Dr. Cesar Sam Tiago Vilanova-Costa, obrigada pelo carinho e por toda e qualquer ajuda prestada para a realização desta pesquisa.

Ao amigo Daniel Bastos pela amizade, atenção e por não ter medido esforços para me ajudar na realização do presente estudo. Aprendi muito em nossas conversas e você é uma amizade que ganhei nesses dois anos de mestrado e espero que perdure por muito tempo ainda.

Ao meu namorado Willas Moreira Lopes, por ser minha fortaleza e melhor amigo. Sou grata por estares sempre ao meu lado, dividindo momentos de lutas e conquistas.

À minha irmã Cíntia de Oliveira Cunha, por nesses longos dois anos de mestrado ter sido minha companhia e por representar, tão bem, uma pequena parte da nossa família.

Aos meus familiares, tias e tios, primas e primos, meu muito obrigada por sempre fazerem parte disso tudo, mesmo de longe, e por sempre estarem torcendo pela minha vitória.

Aos meus Pais, Dione de Oliveira Cunha e Francisco das Chagas Sobrinho Cunha, por serem a razão de tudo, por todos os ensinamentos dados, por todos os momentos que me repreenderam sempre pensando no meu melhor, buscando incansavelmente meus voos mais altos, me preparando e me ensinando a ser forte para as lutas que a vida me proporcionaria, e por sempre fazerem dos meus sonhos os seus.

A todos, meu Muito Obrigada!

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Receptores de reconhecimento padrão envolvidos na detecção imunológica inata contra o *Aspergillus* spp. 16
- Figura 2.** Classificação dos SNPS de acordo com a sua localização no genoma 23

LISTA DE TABELAS

Artigo 1. Associação entre polimorfismos dos genes que codificam os receptores celulares DECTINA-1 e *Toll-Like* e susceptibilidade à Aspergilose Invasiva

Tabela 1. Referências bibliográficas identificadas de acordo com as palavras-chave e bases de dados utilizadas 32

Tabela 2. Dados dos artigos selecionados 23

Tabela 3. Resumo da associação genética dos genes que codificam os receptores *Toll-like* com susceptibilidade à Aspergilose estudada nos últimos anos 35

Tabela 4. Resumo da associação genética dos genes *CLEC7A* com susceptibilidade à Aspergilose estudada nos últimos anos 36

Artigo 1. Avaliação Epidemiológica de pacientes submetidos ao teste de galactomana sérica com suspeita de Aspergilose Invasiva

Tabela 1. Características epidemiológicas e clínicas dos pacientes 48

Tabela 2. Variáveis associadas ao índice de galactomana sérica 49

Tabela 3. Variáveis associadas ao Diagnóstico de AI de acordo com EORTC/MSG 51

LISTA DE SIGLAS

ACCG	Associação de Combate ao Câncer em Goiás
AI	Aspergilose Invasiva
ANF-B	Anfotericina-B
AP-1	Proteína Ativadora 1
BHI	do inglês, <i>Ágar Brain Heart infusion</i>
DHM	Doença Hematológica Maligna
EORTC/MSG	do inglês, <i>European Organization for Research and Treatment of Cancer</i>
GM	Galactomanana
HAJ	Hospital Araújo Jorge
IL-17 ou IL-17A	Interleucina 17
LBA	Lavado Broncoalveolar
LBD	Aspergillus de fluxo lateral
LRR	do inglês, <i>Leucine-Rich Repeat</i>
NF-kB	Fator nuclear Kappa B
PAMPs	do inglês, <i>Pathogen-associated Molecular Patterns</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RRP	Receptores de Reconhecimento Padrão
SNP	Polimorfismos genéticos de base única
TC	Tomografia Computadorizada
TIR	do inglês, Toll-Interleucine-1 Receptor
TLR	<i>Toll-like</i>
TMO	Transplante de Medula Óssea

RESUMO

A presente dissertação foi construída na modalidade de artigos científicos, sendo constituída por dois artigos. O primeiro, intitulado “Avaliação epidemiológica de pacientes submetidos ao teste de galactomanana sérica com suspeita de Aspergilose Invasiva”, teve como objetivo avaliar a incidência de Aspergilose Invasiva em pacientes com doenças hematológicas acompanhadas em um hospital de referência de Goiânia, Goiás, Brasil, e determinar os principais fatores que contribuem para o desenvolvimento da doença. Para isso, foram avaliadas 1367 amostras de 264 pacientes com doenças hematológicas malignas tratadas no Setor de Hematologia do Hospital Araújo Jorge, os quais realizaram exame de detecção de galactomanana, no período de 2013 a 2015, e foram excluídos pacientes que não possuíam dados clínicos em prontuários e com perda de seguimento no hospital. Dentre os dados alcançados por meio do presente estudo observou-se que a média de idade foi de 43,7 anos, onde 55,5% eram pertencentes ao sexo masculino. Do total de pacientes avaliados, 133 realizaram TMO, sendo que 38,9% eram do tipo autólogo e 17,9% do tipo alogênico. De acordo com a classificação para Aspergilose Invasiva conforme a *European Organization for Research and Treatment of Cancer*, a doença foi interpretada como comprovada em 7,3%, definida por cultura positiva para o fungo, 6,4% como provável pela detecção de galactomanana no sangue e presença de infiltrados pulmonares e 5,1% como possível por alterações radiológicas sugestivas de Aspergilose Invasiva e galactomanana negativo. A taxa de mortalidade para Aspergilose Invasiva comprovada/provável/possível foi de 61,3% e mostrou que a doença estava significativamente associada com o risco de morte ($p < 0,0001$). Ao considerarmos a alta taxa de mortalidade causada pelo desenvolvimento da Aspergilose Invasiva e que a realização de uma terapia precoce promove significativa melhora do prognóstico dos pacientes, concluímos que a detecção de galactomanana, realizada como acompanhamento dos pacientes com alto risco de desenvolver a doença, pode ser considerada um método eficaz para auxiliar na identificação de Aspergilose Invasiva. O segundo artigo, intitulado “Associação entre polimorfismos dos genes que codificam os receptores celulares Dectina-1 e *Toll-like* e susceptibilidade à Aspergilose Invasiva”, teve como objetivo descrever os polimorfismos nos genes que codificam os receptores Dectina-1 e *Toll-like*, buscando possíveis associações com a susceptibilidade individual à Aspergilose Invasiva. Este estudo utilizou como base metodológica uma revisão sistemática da literatura e como base de dados a PubMed e PMC do NCBI. As palavras-chaves utilizadas foram: *Invasive aspergillosis*, *polymorphism*, *Dectin-1* e *Toll-like*. A partir desta busca, 415 estudos foram encontrados e de acordo com os critérios de inclusão e exclusão 8 estudos foram selecionados. Com a realização deste, constatou-se que vários são os estudos que descrevem os polimorfismos de base única com uma maior susceptibilidade à Aspergilose Invasiva. Os principais são em genes que codificam os receptores *Toll-like* e os que codificam citocinas e quimiocinas (Dectina-1). Assim, pode-se perceber que de acordo com estudos já realizados há uma associação significativa de polimorfismos genéticos com a Aspergilose Invasiva, porém estudos mais amplos devem ser realizados para se obter resultados mais fidedignos. De modo geral, concluímos com essa dissertação que o desenvolvimento da Aspergilose Invasiva está associado com diversos fatores, sendo um deles o genético, e que, devido aos altos índices de mortalidade causados pela Aspergilose Invasiva, a detecção de galactomanana é de fundamental importância para o tratamento dos pacientes que apresentam uma maior probabilidade de desenvolver a doença, auxiliando principalmente no prognóstico e diagnóstico precoce da mesma.

Palavras-Chave: Aspergilose Invasiva; Galactomanana; Polimorfismos Genéticos; Dectina-1; *Toll-Like*.

ABSTRACT

The present dissertation was constructed in the form of scientific articles, being constituted by two articles. The first one, titled "Epidemiological evaluation of patients submitted to the serum galactomannan test with suspected Aspergillosis Invasive", aimed to evaluate the incidence of Invasive Aspergillosis in patients with hematological diseases followed at a reference hospital in Goiânia, Goiás, Brazil. Determine the main factors that contribute to the development of the disease. For this, 1367 samples of 264 patients with malignant hematological diseases treated in the Hematology Sector of Hospital Araújo Jorge, who underwent galactomannan detection, were evaluated in the period from 2013 to 2015, and were excluded patients who had no clinical data in Medical records and loss of follow-up at the hospital. Among the data obtained through the present study it was observed that the mean age was 43.7 years, where 55.5% were male. Of the total number of patients evaluated, 133 performed BMT, 38.9% of which were autologous and 17.9% of the allogeneic type. According to the classification for Invasive Aspergillosis according to the European Organization for Research and Treatment of Cancer, the disease was interpreted as proven in 7.3%, defined by culture positive for the fungus, 6.4% as probable by the detection of galactomannan in the Blood and presence of pulmonary infiltrates and 5.1% as possible by radiological alterations suggestive of Invasive Aspergillosis and galactomannan negative. The estimated / probable / probable Aspergillosis Invasive mortality rate was 61.3% and showed that the disease was significantly associated with the risk of death ($p < 0.0001$). When considering the high mortality rate caused by the development of Aspergillosis Invasive and the fact that an early therapy promotes a significant improvement in the prognosis of patients, we conclude that the detection of galactomannan, performed as a follow-up of patients at high risk of developing the disease, can be considered an effective method to aid in the identification of Invasive Aspergillosis. The second article entitled "Association between polymorphisms of genes encoding Dectin-1 and Toll-like cellular receptors and susceptibility to Invasive Aspergillosis", aimed to describe the polymorphisms in genes encoding Dectin-1 and Toll-like receptors, Seeking possible associations with the individual susceptibility to Invasive Aspergillosis. This study used as a methodological basis a systematic review of the literature and as a database to PubMed and PMC of the NCBI. The keywords used were: Invasive aspergillosis, polymorphism, Dectin-1 and Toll-like. From this search, 415 studies were found and according to the inclusion and exclusion criteria 8 studies were selected. With the accomplishment of this, it was verified that several are the studies that describe the single base polymorphisms with a greater susceptibility to the Invasive Aspergillosis. The major ones are in genes encoding Toll-like receptors and those that encode cytokines and chemokines (Dectin-1). Thus, it can be observed that, according to studies already carried out, there is a significant association of genetic polymorphisms with Aspergillosis Invasive, but more extensive studies must be performed to obtain more reliable results. In general, we conclude with this dissertation that the development of Invasive Aspergillosis is associated with several factors, one of them being genetic, and that, due to the high mortality rates caused by Invasive Aspergillosis, the detection of galactomannan is of fundamental importance for the Treatment of patients who are more likely to develop the disease, mainly aiding in the prognosis and early diagnosis of it.

Keywords: Invasive Aspergillosis; Galactomannan; Genetic Polymorphisms; Dectin-1; Toll-Like.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	13
1 REVISÃO DA LITERATURA.....	15
1.1 Aspectos Gerais da Aspergilose Invasiva.....	15
1.2 A imunidade inata associada ao <i>Aspergillus spp</i>	15
1.3 Diagnóstico da Aspergilose Invasiva	18
1.3.1 ELISA sanduíche	19
1.3.2 Cultura	20
1.3.3 Tomografia computadorizada (TC)	21
1.3.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	21
1.4 Tratamento.....	22
1.5 Polimorfismos genéticos de base única (SNP) associados à AI.....	23
2 OBJETIVOS.....	25
2.1 Geral	25
2.2 Específicos.....	25
3 METODOLOGIA.....	26
3.1 Aspectos Éticos	26
3.2 Local do Estudo e Amostra	26
3.3 Instrumento para a Coleta dos Dados	27
3.4 Organização e Análise dos dados	28
4 PRODUÇÕES	29
4.1 ARTIGO 1	29
4.2 ARTIGO 2.....	43
CONCLUSÃO.....	58
REFERÊNCIAS	59
ANEXOS	64

INTRODUÇÃO

A Aspergilose Invasiva (AI) é causada por espécies de *Aspergillus* spp., sendo considerada uma infecção fúngica oportunista. Existem mais de 800 espécies do fungo, porém apenas algumas são capazes de desenvolver a doença. A porta de entrada mais comum desses fungos é através da inalação de esporos nos seios nasais e no trato respiratório. Uma vez inalados, na ausência de defesas apropriadas do hospedeiro, os esporos aumentam, germinam e se disseminam hematogenicamente por invasão vascular. Indivíduos com uma defesa normal raramente desenvolvem a doença^{1,2,3}.

O fungo *Aspergillus* spp., está presente normalmente no solo, residências, aparelhos de ar condicionado e vestimentas³. Devido à ubiquidade do mesmo, o risco de infecção em indivíduos imunodeprimidos é grande⁴. Desta forma há uma maior necessidade de investimentos voltados ao diagnóstico precoce, para que o tratamento seja iniciado o mais rápido possível.

Embora existam antifúngicos que melhoram o prognóstico da AI a doença permanece relacionada com altos índices de mortalidade, 40 a 70%, principalmente em indivíduos que foram submetidos ao transplante de células-tronco hematopoiéticas^{1,2}.

O diagnóstico de AI é classificado como possível, provável e comprovado de acordo com a *European Organization for Research and Treatment of Cancer* (EORTC/MSG). Considera-se diagnóstico comprovado quando o paciente apresenta resultado do exame de cultura positivo para *Aspergillus* spp; diagnóstico provável quando o paciente possui exame de Tomografia Computadorizada (TC) do tórax com presença de infiltrados pulmonares e detecção de galactomanana (GM) no soro por ELISA positivo; e diagnóstico possível quando observa-se resultados com infiltrados pulmonares visualizados em TC de tórax, porém GM negativo⁵.

A GM é um componente polissacarídeo presente na parede celular do *Aspergillus* spp., podendo ser detectado no líquido broncoalveolar (LBA) e no sangue. O teste de ELISA utilizado para detecção é comercialmente denominado Platelia® *Aspergillus* EIA – Biorad, considerado como fundamental para o diagnóstico de AI pela EORTC/MSG⁶.

Estudos epidemiológicos apontaram a relação de vários fatores associados à probabilidade do indivíduo de desenvolver a patologia, e um destes fatores é o genético⁵.

Apesar das diferentes variações genômicas que podem ocorrer, as patologias geralmente encontram-se associadas à presença de polimorfismos gênicos⁶.

O reconhecimento inicial de diversos patógenos se dá por receptores celulares presentes em células da imunidade inata, designados de receptores de reconhecimento padrão (PRR)⁷⁻¹⁴. Partindo deste princípio, alguns estudos já descreveram a associação entre a AI e polimorfismos dos genes que codificam os receptores Dectina-1 e *Toll-like*¹⁴⁻¹⁶. Tais polimorfismos podem alterar as vias de sinalização, aumentando a susceptibilidade do indivíduo de desenvolver a doença¹⁶. A identificação da associação dos polimorfismos nos genes que codificam esses receptores com a AI é fundamental, já que ambos se mostram eficazes na resposta imune inata contra o fungo⁹⁻¹⁶.

Essa dissertação é composta por dois artigos. O primeiro titulado por “Associação entre polimorfismos dos genes que codificam os receptores celulares Dectina-1 e *Toll-like* e susceptibilidade à Aspergilose Invasiva”, teve como objetivo investigar na literatura especializada se os polimorfismos que codificam esses receptores aumentam a susceptibilidade a doença. O segundo estudo titulado por “Avaliação epidemiológica de pacientes submetidos ao teste de galactomanana sérica com suspeita de Aspergilose Invasiva” teve o objetivo de traçar o perfil epidemiológico de pacientes que realizaram teste de galactomanana por ELISA com suspeita de AI atendidos em um hospital de referência.

A realização de ambos os estudos, justifica-se pela necessidade de buscar maiores conhecimentos em torno do diagnóstico, tratamento e dos conhecimentos genéticos que envolvem a gênese da Aspergilose Invasiva.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Aspectos Gerais da Aspergilose Invasiva

A AI é considerada uma das infecções fúngicas mais prevalentes em indivíduos imunocomprometidos. A morbidade e a mortalidade destes indivíduos estão fortemente associadas a esta infecção, que é causada por fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* spp.¹⁻³. Tal gênero engloba mais de 180 espécies, e 34 são eficazes para causar patologias em humanos³. A frequência da AI varia de 5 a 15% em indivíduos que foram submetidos ao transplante de medula óssea (TMO). Já em indivíduos neutropênicos por cerca de um mês, com qualquer doença maligna hematológica, a incidência pode chegar a 70%. As taxas de mortalidade dos indivíduos infectados são superiores a 90% e estão associadas à dificuldade do diagnóstico precoce, fundamental para um melhor prognóstico, e as terapias antifúngicas com início tardio^{4,13,17}.

A AI em pacientes que foram submetidos ao TMO alogênico apresentou uma frequência de 15,1% e em pacientes que realizaram TMO autólogo, esta frequência é 2%^{18,19}. Junto a este fator, estão incluídos no grupo de risco aqueles que apresentam leucemias agudas, doença granulomatosa crônica, doença pulmonar crônica, transplantados de órgãos sólidos (5 a 15%), usuários de anticorpos monoclonais, pacientes neutropênicos e com monocitopenia, pacientes que realizam terapias com corticosteroides e imunossupressores em doses elevadas e fatores genéticos^{1,18-21}.

O prognóstico da patologia depende principalmente da precocidade com que o diagnóstico é realizado. De acordo com um estudo, realizado em Taiwan, a mortalidade em pacientes que apresentavam tal doença teve um aumento de 40% para 90% quando o diagnóstico foi realizado dentro de 10 dias ou a partir do 11º dia da doença²¹.

1.2 A imunidade inata associada ao *Aspergillus* spp.

O *Aspergillus* spp. é um fungo considerado ubíquo, o qual cresce de modo independente no meio ambiente sem a necessidade de um hospedeiro, podendo liberar uma grande quantidade de esporos no ar^{1,19}. Pode ser encontrado normalmente no solo, comida, restos de plantas e ambientes internos²². Vários são os fatores que contribuem para a

patogenicidade do fungo, porém o principal está associado ao tamanho dos conídios, que por serem pequenos, facilmente se dispersam pelo ambiente. Além disso, a temperatura corporal dos seres humanos favorece o crescimento do fungo, já que este cresce em temperatura de 37°C. As espécies de *Aspergillus* spp. são capazes de se aderir ao endotélio e epitélio e posteriormente invadem a corrente sanguínea³.

Em pacientes imunocompetentes, o sistema imune inato geralmente atua de maneira eficiente. Tal fato evita a forma angioinvasiva do patógeno, onde o epitélio respiratório atua de modo primário como uma barreira mecânica por meio das células ciliadas e mucosas. Estas células são responsáveis pela produção de derivados oxidativos e outras moléculas que apresentam toxicidade direta ao fungo^{23,24}.

Macrófagos alveolares realizam a primeira defesa do hospedeiro através da fagocitose dos conídios inalados. Após a germinação do fungo, os neutrófilos atuam predominantemente nesta defesa, combatendo hifas germinadas, que são a forma invasiva do tecido^{19,25}. O reconhecimento inicial de diversos patógenos se dá por receptores celulares presentes em células da imunidade inata, designados de receptores de reconhecimento padrão (RRP). Esses receptores reconhecem partículas características presentes na parede celular do fungo (PAMPs, do inglês, *Pathogen-associated Molecular Patterns*) e passam a produzir citocinas e quimiocinas que estimulam o recrutamento de neutrófilos e, conseqüentemente, ocorre a imunidade específica para o antígeno (Figura 1)^{19,26}.

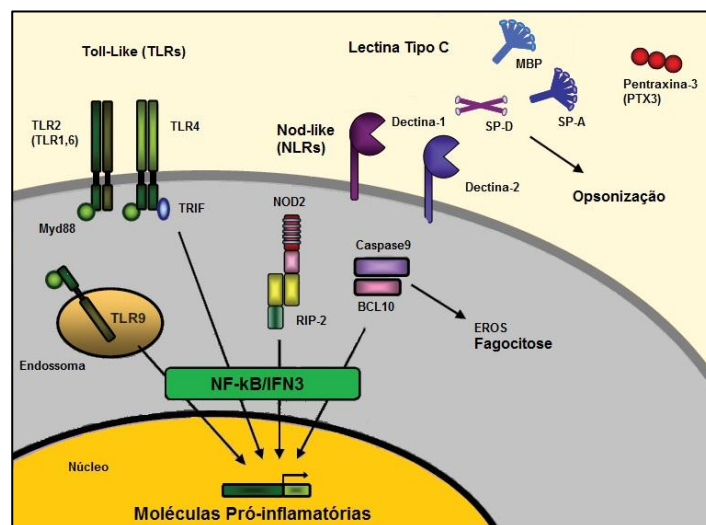


Figura 1. Receptores de reconhecimento padrão envolvidos na detecção imunológica inata contra o *Aspergillus* spp. Adaptado de Lamoth et al. (2011).

Diversas são as classe de RRP's que atuam reconhecendo PAMPs fúngicos. Como exemplo podemos relatar os receptores *Toll-like*, Dectina-1, Pentaxina-3, SP-A, SP-D e Lectina de ligação a Manose. A parede celular fúngica apresenta betaglucanos que induzem a resposta inflamatória em macrófagos. Deste modo, a ativação da imunidade inata coordenada por RRP's específicos, resulta no controle do crescimento de fungos evitando uma posterior inflamação^{1,20}.

Dois receptores vêm sendo relatados como fundamentais para que o desenvolvimento da resposta imune inata contra o *Aspergillus* spp. ocorra de modo eficaz²⁶⁻²⁸. Tais receptores serão descritos de modo mais detalhado a seguir.

1.2.1 Receptores *Toll-like*

Os receptores *Toll-like* são fundamentais para o sistema imune inato já que são capazes de reconhecer uma grande quantidade de PAMPs. A sua família apresenta 12 proteínas transmembranares diferentes, que podem estar localizadas na superfície da célula (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 e TLR6) ou dentro de vesículas endocíticas (TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9)^{1,9}.

Esses receptores apresentam como característica a presença de um domínio extracelular, o qual contém repetições ricas em leucina (LRR, do inglês, *Leucine-Rich Repeat*) e um domínio receptor Toll citoplasmático interleucina-1 (TIR, do inglês, *Toll-Interleucine-1 Receptor*), que ativa fatores de transcrição, tais como: fator nuclear Kappa B (NF-kB) e a proteína ativadora 1 (AP-1)^{1,9,18,19}.

Um estudo descreve que os receptores TLRs são capazes de atuar no reconhecimento de antígenos e desencadear a resposta inflamatória por meio de mudanças eficientes e rápidas na expressão de genes que codificam citocinas e moléculas inflamatórias, porém os receptores TLR2 e TLR4 são os que vêm sendo relatados com uma melhor resposta imunitária diante de fungos, leveduras e bolores³⁰.

O receptor TLR5 está associado principalmente com o reconhecimento de flagelinas bacterianas, entretanto estudos realizados descreveram que tal receptor, presente na parede celular de monócitos pode reconhecer conídios de *Aspergillus* spp., ou seja, o mesmo também atua na defesa imunitária contra o fungo^{11,31}.

1.2.2 Receptores Dectina-1

Estudos destacaram a importância do receptor Dectina-1 em humanos contra o *Aspergillus* spp.²⁸. Este receptor é membro da família dos receptores lectina do tipo C, que reconhece o betaglucano presente na parede celular de fungos patogênicos. Ele é expressado principalmente por células de linhagem mieloide, como: neutrófilos, macrófagos e células dendríticas³².

O receptor Dectina-1 pode atuar sozinho ou de modo sinérgico com outros RRP, como os receptores TLR2. Este também pode gerar sinais ao receptor TLR4 promovendo assim respostas do tipo TH1 e TH17 que ativam consequentemente a defesa do hospedeiro à ação antifúngica. A falha deste receptor diminui a resposta inflamatória e consequentemente a carga fúngica aumenta^{8,12,28,32}. Em um estudo, foi observado que a taxa de mortalidade em ratos que apresentavam a falta do receptor Dectina-1 foi maior e a produção de citocinas diminuída, ocasionando um acúmulo de fungos patogênicos no local da infecção³³.

A Dectina-1 induz a produção de diversas citocinas durante a infecção por *Aspergillus* spp., e a principal descrita é a Interleucina 17 (IL-17 ou IL-17A) que atua como mediador crucial na defesa do hospedeiro regulando positivamente o número de citocinas e quimiocinas, que conduzem o recrutamento dos neutrófilos para o local da inflamação³⁴⁻³⁶.

Apesar do papel do receptor Dectina-1 associado à imunidade antifúngica ser evidente, tanto em camundongos quanto em humanos, os mecanismos de sinalização pelo qual este receptor contribui para a resposta imune inata, ainda não foram completamente esclarecidos⁸.

1.3 Diagnóstico da Aspergilose Invasiva

O método de diagnóstico para a AI com maior confiabilidade é a biópsia de tecido, mas tal procedimento se torna inviável em pacientes que apresentam plaquetopenia prolongada por ser um procedimento invasivo. Assim, uma metodologia não invasiva foi desenvolvida por meio da detecção da galactomanana (GM)^{3,18}.

Por apresentar baixa invasibilidade, a detecção da GM se tornou a principal forma de diagnosticar a AI¹⁸. Esta molécula é um componente polissacarídeo que compõem a parede celular de diversas plantas, líquens e fungos e a liberação da mesma, no gênero *Aspergillus*

spp., ocorre no momento da replicação celular através do crescimento das hifas quando presentes no tecido do hospedeiro^{15,18,21}. É composta por uma estrutura ramificada, e constituída por uma cadeia de α -manana e de cadeias curtas de $\beta(1,5)$ galactofuranose. Esta molécula pode ser detectada em amostras de sangue, lavado broncoalveolar (LBA), líquor e urina¹⁸.

De acordo com a EORTC/MSG, o diagnóstico da AI é classificado como provado, provável e possível. O diagnóstico é comprovado somente quando houver invasão tecidual e a mesma for comprovada por meio do cultivo positivo do fungo. Já, a doença pode ser dita provável com a comprovação microbiológica em pacientes com elevado risco de ter a AI. Quando não houver a confirmação microbiológica, podemos dizer apenas que o paciente tem um possível diagnóstico de AI⁶.

1.3.1 ELISA sanduíche

Consiste em um ensaio imunoenzimático, o qual detecta a GM circulante. Este teste apresenta como característica um rápido diagnóstico, o qual dura cerca de 4 horas. A utilização deste método é indicada apenas para amostras de soro em pacientes que se encontram neutropênicos. No caso de pacientes não neutropênicos, indica-se a detecção da GM no LBA, devido a baixa sensibilidade do teste^{3,18}. Esta sensibilidade, de acordo com uma meta-análise realizada com vários estudos, é de 71% e a especificidade de 89%²⁰. Porém, de acordo com outro estudo a sensibilidade pode variar de 66 a 77% e a especificidade pode chegar a 98%⁵.

A antigenia seriada com GM atua contribuindo na facilidade do diagnóstico e ajuda na avaliação da resposta terapêutica, ou seja, a duração do tratamento pode ser estabelecida de acordo com a normalização da antigenia no paciente⁵.

O teste de detecção de galactomanana por ELISA é considerado positivo quando os índices forem $\geq 0,5$ ^{3,18}. No entanto, a sensibilidade do teste pode ser baixa quando realizado em pacientes que receberam tratamento antifúngico, além de ser possível a observação de valores falso-positivos em pacientes que foram medicados com antibióticos de origem fúngica (piperacilina-tazobactam e amoxicilina com ácido clavulônico), antibióticos beta-lactâmicos, fluidos intravenosos que contenham gluconato, pacientes submetidos a agentes citotóxicos,

anticorpos autorreativos, em casos de enfermidade do enxerto versus hospedeiro, transfusões, contaminação da amostra e infecções causadas por outros fungos (*Penicillium*, *Paecilomyces* e *Histoplasma capsulatum*)^{3,19,21}.

O monitoramento de GM de modo contínuo antecede o diagnóstico da patologia em um intervalo de 6 a 14 dias, antes mesmo dos sinais clínicos, como febre, tosse, dor pleurítica, expectoração, hemoptise, insuficiência respiratória, choque, dispneia e insuficiência renal^{3,18}.

O ELISA sanduíche é um teste disponível comercialmente denominado Platelia® Aspergillus EIA – BioRad. É um imunoenensaio que reconhece os epítomos $\beta(1,5)$ -galactofuranose da molécula de galactomanana através de anticorpos monoclonais de ratos (EB-A2). Para que haja esse reconhecimento, é necessário a presença de no mínimo quatro epítomos livres para que a ligação forme o complexo antígeno-anticorpo¹⁸.

O teste é validado para amostras séricas de pacientes neutropênicos e o resultado é dado através de um índice, calculado pela comparação com o controle do ponto de corte (0,5)¹⁸.

Em virtude do antígeno apresentar uma liberação intervalada, a realização do teste deve ocorrer ao menos duas vezes por semana e a confirmação do diagnóstico é dada ao exibir resultados positivos em no mínimo duas amostras consecutivas³.

1.3.2 Cultura

O diagnóstico de AI através de cultura é utilizado na maioria dos casos para diferenciar a patologia de infecções causadas por outros fungos filamentosos, como por exemplo, o *Fusarium* spp. e *Scedosporium* spp. O *Aspergillus* spp. pode ser isolado tanto de amostras de líquido, LBA, líquido peritoneal, líquido pleural, quanto de biópsias dos seios nasais e órgãos internos. Devido o método apresentar pouca sensibilidade, sua análise deve sempre ser realizada em conjunto com outros meios diagnósticos³.

Para a realização da cultura deve-se primeiramente realizar o isolamento do material estéril e para este processo recomenda-se o uso de ágar Sabouraud em estufa de 25°C e ágar *Brain heart infusion* (BHI) a 35°C durante cinco dias. Quando o material não se apresentar estéril recomenda-se realizar a cultura em ágar Sabouraud com cloranfenicol a 25°C por

cerca de três a cinco dias. Outros meios também podem ser utilizados, como o meio Czapeck-Dox e Caldo extrato de Malte^{3,37}.

1.3.3 Tomografia computadorizada (TC)

É um método não invasivo, que pode ser utilizado para o diagnóstico precoce da AI em pacientes que se encontram neutropênicos a cerca de 10 a 14 dias^{3,19}.

O primeiro sinal radiológico observado na TC é denominada de sinal de halo, o qual é definido como um nódulo rodeado por um perímetro de vidro fosco que corresponde a uma hemorragia alveolar. Esta hemorragia é consequência da trombose e necrose acarretada pela ação do fungo nos vasos^{3,19,36}.

O encontro deste sinal nas TC realizadas em pacientes neutropênicos com AI, é superior a 90% quando realizada no início da doença. Já em estágios mais tardios, ou seja, de cronicidade da doença, é observado áreas de sequestro necrótico presente no tecido pulmonar e consolidação do mesmo, sendo observado o sinal crescente aéreo^{6,17,39}.

No entanto, este método diagnóstico encontra limitações já que outros fungos e bactérias são capazes de promover angioinvasão tecidual e, conseqüentemente, produzir uma lesão com aparência similar (Exemplos: *Pseudomonas aeruginosa*, *Zygomycetos*, *Fusarium* spp. *Scedosporium* spp. e *Nocardia* spp.)^{3,40}.

De acordo com um estudo, a TC deve ser realizada em conjunto com a antigenia, promovendo diagnóstico e tratamento mais precoces, além de resultados mais fidedignos⁵.

1.3.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O diagnóstico de doenças causadas por fungos invasivos através da PCR é considerado promissor, mas atualmente ainda se encontra em fase de investigação. Apresenta vantagens como a rapidez, baixo custo e a capacidade de promover um método diagnóstico a nível

molecular. As desvantagens desse método estão relacionadas com a escassez de padronização para a sua realização e a elevada contaminação com DNA de outros fungos¹⁹.

Um estudo relata que a sensibilidade da técnica varia de 50 a 100% em pacientes que apresentam alto risco de ter AI³⁵. Resultados satisfatórios são encontrados quando as amostras utilizadas são o soro e LBA, apresentando uma sensibilidade de 79 a 100% e especificidade de 81 a 100%³.

1.4 Tratamento

Na terapia primária para a AI, o medicamento crucial utilizado é o Voriconazol^{17,21}. Conforme um estudo, este apresentou eficácia superior ao desoxicolato de anfotericina B (ANF-B), sendo associado com uma melhora significativa da sobrevida⁴². O fármaco também apresenta uma ação *in vitro* sobre espécies de *Aspergillus* spp. superior ao antifúngico itraconazol⁴².

O voriconazol é um triazol de largo espectro, ativado *in vitro* contra diversos fungos filamentosos e leveduras, incluindo espécies de *Aspergillus* spp.^{41,42}. Esse fármaco bloqueia fortemente a síntese de ergosterol de fungos filamentosos, promovendo a formação de uma membrana com propriedades alteradas e conseqüentemente o patógeno não desempenhará as funções básicas para o seu desenvolvimento⁴².

É administrado por via oral, e em casos com maior gravidade, por via endovenosa⁵. O seu uso deve ser evitado por provocar efeitos adversos graves, como hepatotoxicidade e efeitos sobre o sistema nervoso central⁴³.

Em casos de hepatopatia ou quando o voriconazol é contraindicado, a ANF-B é o medicamento de escolha. Este fármaco apresenta formulações lipídicas, conferindo ao mesmo uma grande efetividade e baixa toxicidade⁵. Porém, devido ser amplamente utilizado em pacientes imunodeprimidos, a ação da ANF-B sobre as células imunológicas requer uma maior atenção. Este medicamento pode atuar inibindo a quimiotaxia de leucócitos e interfere na produção de anticorpos e nas propriedades funcionais dos leucócitos polimorfonucleares⁴¹.

A duração do tratamento, de modo geral, ainda não é bem definida, podendo variar de 6 a 12 semanas, e em pacientes que se encontram imunodeprimidos, é recomendado manter o medicamento até a melhora da imunossupressão⁵.

A combinação medicamentosa não é usualmente recomendada, exceto em casos de intolerância ou refratariedade⁵.

1.5 Polimorfismos genéticos de base única (SNP) associados à AI

Polimorfismos são alterações genéticas que se diferenciam das mutações devido a sua frequência, que é superior a 1%. A grande maioria dos SNPs apresentam dois alelos, os quais estão representados por uma substituição de uma base por outra. Essas alterações, conforme a literatura, ocorrem uma vez a cada 200 pares de bases no genoma humano, desse modo, é esperado a presença de aproximadamente 6.000.000 de SNPs no genoma⁴⁴. Polimorfismos podem ocorrer em regiões codificantes e causar alterações em aminoácidos e, portanto, serem associados a diversas patologias⁴⁵.

De acordo com a localização no genoma os SNPs são classificados em: iSNP quando estão localizados em regiões intrônicas, rSNP em regiões reguladoras, gSNP localizados em regiões intergenômicas e cSNP quando encontram-se em regiões codificantes. Este último pode apresentar-se de duas maneiras: SNPs sinônimos (sSNP) e não sinônimos (nsSNP) (Figura 2)⁴⁵⁻⁴⁷.

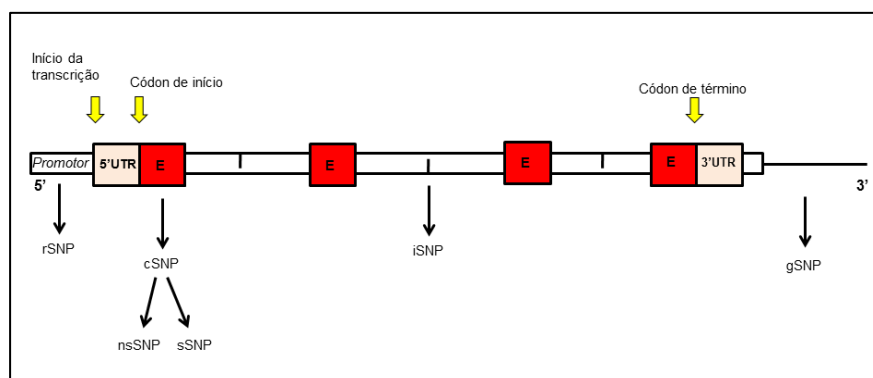


Figura 2. Classificação dos SNPs de acordo com a sua localização no genoma. Adaptado de Caratachea (2007).

Os SNPs denominados de sinônimos ou silenciosos não promovem alterações na conformação do gene, embora na literatura seja descrito que tais polimorfismos podem ter causar consequências funcionais aos genes nos quais estão localizados, porém o mecanismo ainda é desconhecido^{44,45}.

O polimorfismo Y238X (rs16910526), no gene *CLEC7A*, que codifica o receptor Dectina-1, recentemente, foi associado à AI, sendo localizado na região cromossômica 12p13.2, o qual gera um códon de parada precoce, resultando na perda dos 10 últimos aminoácidos da extremidade⁴⁵. Com isso, os indivíduos que apresentam esta alteração exibem uma expressão diminuída do receptor, tornando-se incapaz de se ligar ao betaglucano presente na parede do fungo e conseqüentemente exprimem uma produção defeituosa de citocinas pró-inflamatórias².

Os polimorfismos nos genes que codificam os receptores do tipo *Toll* (TLR) também vêm sendo associados a uma maior probabilidade do indivíduo desenvolver diversas infecções⁴⁶. Os receptores TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 e TLR9 são receptores cruciais na regulação da via inflamatória e os genes que codificam estes receptores estão localizados nas regiões cromossômicas 4p14, 4q31.3, 9q32-q33, 1q41 e 3p21.3, respectivamente^{9,46}.

De acordo com Pamer³¹, a constatação de que polimorfismos nos genes *TLR4*, que afetam a susceptibilidade à AI, pode ser considerado surpreendente, já que este receptor está relacionado principalmente ao reconhecimento de lipopolissacarídeos bacterianos. Uma explicação para tal associação seria o reconhecimento de outras moléculas como o betaglucano presente na parede celular do fungo, já que o mesmo não produz lipopolissacarídeos.

O TLR5 é um receptor crucial na regulação da via inflamatória⁴⁷. O polimorfismo Arg392Ter (rs5744168) codifica um códon de parada (*stop codon*), resultando numa resposta similar a do polimorfismo do gene *CLEC7A* descrito anteriormente. Desta forma, este confere ao paciente uma expressão diminuída do receptor TLR5, presente na membrana dos monócitos e que reconhecem conídios fúngicos^{11,48}. Estudos, sugerem a importância deste receptor na defesa do indivíduo contra o *Aspergillus spp.* Aparentemente indivíduos com alterações genômicas nestes genes apresentam um fator de risco adicional para o desenvolvimento da Aspergilose^{11,23}.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral:

Traçar o perfil epidemiológico de pacientes que realizaram teste de galactomanana por ELISA com suspeita de Aspergilose Invasiva atendidos em um hospital de referência de Goiânia, Goiás, Brasil.

2.2 Específicos:

- Avaliar a frequência de Aspergilose Invasiva em um serviço de Hematologia em indivíduos;
- Determinar os principais fatores que contribuem para a instalação e desenvolvimento da Aspergilose Invasiva;
- Identificar por meio de estudos científicos publicados, a associação de polimorfismos genéticos com à maior predisposição do indivíduo desenvolver a AI.

3 METODOLOGIA

A presente dissertação foi construída na modalidade de artigos científicos, sendo constituída por dois artigos.

O primeiro, intitulado por “Associação entre polimorfismos dos genes que codificam os receptores celulares Dectina-1 e *Toll-like* e susceptibilidade à Aspergilose Invasiva” trata-se de uma revisão sistemática da literatura, a qual descreve a associação entre SNPS dos genes que codificam os receptores celulares Dectina-1 e *Toll-like* e susceptibilidade à AI. Para a realização da mesma foi desenvolvida uma pesquisa onde as informações foram obtidas por meio de busca ativa nas bases de dados da PubMed e PMC do NCBI (*National Center for Biotechnology Information, USA*). Desse modo buscou-se realizar a pesquisa bibliográfica sobre os dois temas principais que compõem o artigo: a associação do polimorfismo do gene que codifica o receptor Dectina-1 e os receptores *Toll-like* com a maior suscetibilidade à AI.

Já o segundo, consiste em um estudo epidemiológico de caráter transversal, onde o desenho metodológico será descrito a seguir.

3.1 Aspectos Éticos

O presente estudo atendeu os critérios éticos da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, sendo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (Protocolo n° 45376215.0.0000.0037/2015) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Associação de Combate ao Câncer em Goiás (ACCG) (Protocolo n° 45376215.0.3001.0031/2015) (ANEXO 1).

3.2 Local do Estudo e Amostra

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Oncogenética e Radiobiologia do Hospital Araújo Jorge (HAJ), da Associação de Combate ao Câncer em Goiás (ACCG), a qual é uma

instituição privada de caráter filantrópico, ou seja, sem fins lucrativos, que se dedica ao combate ao câncer, sendo fundada em 1956.

Todos os dados utilizados referentes aos fatores de riscos dos pacientes incluídos neste estudo, como tipo de doença hematológica, neutropenia, medicamentos utilizados, dados hematológicos, entre outros, foram registrados conforme informações retiradas dos prontuários do HAJ.

Para a realização do presente estudo foram incluídos pacientes submetidos à detecção de galactomanana pelo método de ELISA no Laboratório de Transplante de Medula Óssea do setor de Hematologia do HAJ, entre 2013 e 2015 e pacientes que possuíam dados clínicos em prontuários médicos. Foram excluídos os pacientes tratados no setor de hematologia antes de 2013 e após 2015 e pacientes com perda de seguimento neste hospital.

3.3 Instrumento para a Coleta dos Dados

A abordagem epidemiológica dos pacientes incluídos na pesquisa foi avaliada através de um questionário (ANEXO 2), desenvolvido pelos autores da presente pesquisa, no qual apresenta variáveis necessárias para descrever o perfil epidemiológico dos indivíduos avaliados, contendo dados como: idade, sexo, doença hematológica, neutropenia, dados hematológicos, antifúngicos e antibióticos utilizados, resultados quantitativos e qualitativos para galactomanana, exames de tomografia computadorizada e de cultura, realização de TMO e o tipo de transplante, entre outros.

3.3.1 Neutropenia

A neutropenia dos pacientes que apresentavam baixos índices de neutrófilos no sangue foram classificadas como neutropenia leve ($1000-1500 \text{ mm}^3$), neutropenia moderada ($500-999 \text{ mm}^3$) e neutropenia grave ($<500 \text{ mm}^3$), de acordo com os dados coletados a partir de informações contidas no hemograma realizado em data igual ou próxima ao exame de GM.

3.3.2 Resultados de Galactomana quantitativos e qualitativos

Considerou-se positivo, todo teste de ELISA para detecção de GM, realizado a partir do soro do paciente com resultado $\leq 0,5$ por dois exames consecutivos.

3.3.3 Diagnóstico para AI

A definição do diagnóstico para AI, foi realizada de acordo com a EORTC/MSG, a qual o classifica em comprovado, provável e possível. Considerou-se o diagnóstico comprovado quando o paciente apresentava resultado do exame de cultura positivo para *Aspergillus* spp; diagnóstico provável quando a paciente possuía exame de TC do tórax com presença de infiltrados pulmonares e detecção de GM no soro por ELISA positivo; e diagnóstico possível quando observou-se resultados com infiltrados pulmonares visualizados em TC de tórax, porém GM negativo.

3.4 Organização e Análise dos Dados

Os dados foram organizados e preparados em tabelas do software *Microsoft Office Excel*[®] versão 2010, para posterior análise em programa estatístico BioEstat[®] versão 3.0, sendo processadas as análises estatísticas descritivas e inferenciais. Foram calculadas as frequências absoluta e relativa percentual para as variáveis categóricas e média, desvio padrão (DP) e valores mínimo e máximo para as variáveis contínuas. Os dados foram estratificados para o índice de GM e o diagnóstico de Aspergilose Invasiva. Os testes estatísticos utilizados para a comparação dos grupos estratificados foram o Teste G e o teste do Qui-quadrado (χ^2) para tabelas de contingência LxC. Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando o p-valor foi menor que 0,05.

4 PRODUÇÕES

4.1 ARTIGO 1

ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS DOS GENES QUE CODIFICAM OS RECEPTORES CELULARES DECTINA-1 E TOLL-LIKE E SUSCEPTIBILIDADE À ASPERGILOSE INVASIVA

ASSOCIATION BETWEEN POLYMORPHISMS OF GENES THAT ENCODE CELLULAR RECEPTORS DECTIN-1 AND TOLL-LIKE AND SUSCEPTIBILITY TO INVASIVE ASPERGILLOSIS

RESUMO

Introdução: A Aspergilose Invasiva é uma infecção fúngica prevalente em indivíduos imunocomprometidos. Alguns estudos mostraram que polimorfismos dos genes dos receptores Dectina-1 e *Toll-like* poderiam alterar as vias de sinalização, aumentando a susceptibilidade do indivíduo de desenvolver a Aspergilose Invasiva. **Objetivo:** Investigar na literatura especializada se os polimorfismos nos genes que codificam os receptores Dectina-1 e *Toll-like* aumenta a susceptibilidade a Aspergilose Invasiva. **Metodologia:** Este estudo utilizou como base metodológica uma revisão sistemática da literatura e como base de dados a PubMed e PMC do NCBI. As palavras-chaves utilizadas foram: *Invasive aspergillosis, polymorphism, Dectin-1 e Toll-like*. A partir desta busca, 415 estudos foram encontrados e de acordo com os critérios de inclusão e exclusão 8 estudos foram selecionados. **Resultados:** Vários são os estudos que descrevem os polimorfismos de base única com uma maior susceptibilidade à Aspergilose Invasiva. Os principais são os de genes que codificam os receptores *Toll-like* e os de genes que codificam citocinas e quimiocinas (Dectina-1). Neste estudo, resumimos em detalhes o conhecimento atual sobre os principais marcadores genéticos correlacionados com a patologia. **Conclusão:** Constatou-se que, de acordo com estudos já realizados, há uma associação significativa de polimorfismos genéticos com a Aspergilose Invasiva, porém maiores estudos devem ser realizados para se obter resultados mais fidedignos.

Palavras-Chave: Aspergilose Invasiva; polimorfismo genético; Dectina-1; *Toll-like*; susceptibilidade.

ABSTRACT

Introduction: Invasive Aspergillosis is a common fungal infection in immunocompromised individuals. Some studies have shown that Dectin-1 and Toll-like receptor gene polymorphisms could alter signaling pathways, increasing the individual's susceptibility to developing Invasive Aspergillosis. **Objective:** To investigate in the specialized literature whether the polymorphisms in the genes encoding the Dectin-1 and Toll-like receptors increase the susceptibility to Aspergillosis Invasive. **Methodology:** This study used as a methodological basis a systematic review of the literature and as a database to PubMed and PMC of NCBI. The keywords used were: Invasive aspergillosis, polymorphism, Dectin-1 and Toll-like. From this search, 415 studies were found and according to the inclusion and exclusion criteria 8 studies were selected. **Results:** Several studies describe single-base polymorphisms with a greater susceptibility to invasive aspergillosis. The main

ones are the genes that encode the Toll-like receptors and the genes that encode cytokines and chemokines (Dectin-1). In this study, we summarize in detail the current knowledge about the main genetic markers correlated with the pathology. **Conclusion:** It has been found that, according to studies already performed, there is a significant association of genetic polymorphisms with Aspergillosis Invasive, but more studies should be performed to obtain more reliable results.

Keywords: Invasive Aspergillosis; Genetic polymorphism; Dectin-1; *Toll-like*; susceptibility.

1 INTRODUÇÃO

A Aspergilose Invasiva (AI) é causada por espécies de *Aspergillus* spp., sendo considerada uma infecção fúngica oportunista. Existem mais de 800 espécies do fungo, porém apenas algumas são capazes de desenvolver a doença. A porta de entrada mais comum desses fungos é através da inalação de esporos nos seios nasais e no trato respiratório. Uma vez inalados, na ausência de defesas apropriadas do hospedeiro, os esporos aumentam, germinam e se disseminam hematogenicamente por invasão vascular. Indivíduos com uma defesa normal raramente desenvolvem a doença^{1,2,3}.

As infecções invasivas causadas por esse fungo, estão principalmente associadas a elevadas taxas de morbidade e mortalidade. A doença desenvolve-se principalmente em pacientes com neoplasias malignas hematológicas, neutropenia, pacientes tratados com corticosteroides, drogas imunossupressoras ou submetidos a transplantes de medula óssea ou órgãos sólidos^{1,2}.

Dentre os fatores citados, o fator de risco mais importante para o desenvolvimento da AI tem sido a neutropenia^{3,4}. Porém, devido alguns pacientes com níveis similares de imunodepressão desenvolverem a doença e outros não, tal associação não é clara⁵.

Estudos epidemiológicos apontaram a relação de vários fatores associados a probabilidade do indivíduo de desenvolver a AI, e um destes fatores é o genético⁶. Apesar das diferentes variações genômicas que podem ocorrer, as patologias geralmente encontram-se associadas à presença de polimorfismos gênicos⁷.

O reconhecimento inicial de diversos patógenos se dá por receptores celulares presentes em células da imunidade inata, designados de receptores de reconhecimento padrão (PRR). Esses receptores reconhecem partículas características presentes na parede celular do fungo (PAMPs, do inglês, *Pathogen-associated Molecular Patterns*) e passam a produzir

citocinas e quimiocinas que estimulam o recrutamento de neutrófilos e conseqüentemente ocorre a imunidade específica para o antígeno^{8,9}.

Partindo deste princípio, alguns estudos já descreveram a associação entre a AI e polimorfismos dos genes que codificam os receptores Dectina-1 e *Toll-like*¹⁰⁻¹². Esses polimorfismos podem alterar as vias de sinalização, aumentando a susceptibilidade do indivíduo de desenvolver a doença¹¹.

Os polimorfismos nos genes que codificam os receptores Dectina-1 e *Toll-like* geram um códon de parada precoce, resultando na perda dos 10 últimos aminoácidos da extremidade¹². Com isso, os indivíduos que apresentam estas alteração exibem uma expressão diminuída dos receptores, tornando-se incapaz de se ligar ao betaglucano presente na parede do fungo e conseqüentemente exprimem uma produção defeituosa de citocinas pró-inflamatória¹³⁻²¹.

Desse modo, este estudo objetivou investigar se os polimorfismos nos genes que codificam os receptores Dectina-1 e *Toll-like*, aumentam a susceptibilidade a AI de acordo com estudos publicados na literatura especializada.

2 METODOLOGIA

Trata-se de um estudo do tipo revisão sistemática. Para a realização da mesma foi desenvolvida uma pesquisa onde as informações foram obtidas por meio de busca ativa nas bases de dados da PubMed e PMC do NCBI (*National Center for Biotechnology Information, USA*). Os descritores utilizados foram as seguintes: *Aspergillosis*, *polymorphism*, *Dectin-1* e *Toll-like*. A escolha pelos bancos de dados PubMed e PMC se deram devido serem abrangentes e internacionalmente utilizadas na área da saúde.

Procurou-se realizar a pesquisa bibliográfica sobre os dois temas principais que compõem este trabalho: a associação do polimorfismo do gene que codifica o receptor Dectina-1 e os receptores *Toll-like* com a maior suscetibilidade à AI. O total de artigos encontrados a partir desta busca, de acordo com as palavras-chave utilizadas para ambas as bases de dados, está descrito na Tabela 1.

Tabela 1. Referências bibliográficas identificadas de acordo com as palavras-chave e bases de dados utilizadas.

Palavras-chave	Banco de dados	Referências Identificadas
<i>Aspergillosis, polymorphism, Dectin-1</i>	NCBI PubMed	7
<i>Aspergillosis, polymorphism, Toll-like</i>	NCBI PubMed	21
<i>Aspergillosis, polymorphism, Dectin-1</i>	NCBI PMC	127
<i>Aspergillosis, polymorphism, Toll-like</i>	NCBI PMC	260
	TOTAL	415

A partir do total de 415 artigos encontrados através das buscas, foram selecionados após a leitura dos títulos, um total de 38 estudos para a leitura dos resumos. Os critérios utilizados para a definição daqueles que seriam selecionados foram: artigos intimamente relacionados com o tema, disponibilidade do artigo na íntegra e de forma gratuita e artigos publicados nos últimos 10 anos. Atendendo a esses critérios um total de 8 artigos foram selecionados.

As principais informações dos estudos utilizados estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2. Dados dos artigos selecionados.

Autores	Ano	Título	Tipo de Estudo	Local do Estudo
Carvalho et al ¹⁴	2008	<i>Polymorphisms in Toll-Like Receptor Genes and Susceptibility to pulmonary Aspergillosis</i>	Estudo de coorte	Reino Unido
Cunha et al ¹	2010	<i>Dectin-1 Y238X polymorphism associates with susceptibility to invasive aspergillosis in hematopoietic transplantation through impairment of both recipient and donor dependent mechanisms of antifungal immunity</i>	Caso Controle	Itália
Boer et al ¹⁹	2011	<i>Influence of Polymorphisms in Innate Immunity Genes on Susceptibility to Invasive Aspergillosis after Stem Cell Transplantation</i>	Estudo de coorte	Holanda
Chai et al ¹⁸	2011	<i>The Y238X Stop Codon Polymorphism in the Human b-Glucan Receptor Dectin-1 and Susceptibility to Invasive Aspergillosis</i>	Caso Controle	Bélgica
Carvalho et al ²⁰	2012	<i>TLR3 essentially promotes protective class I-restricted memory CD8_T-cell responses to Aspergillus fumigatus in hematopoietic transplanted patients</i>	Estudo de coorte retrospectivo	Itália
Sainz et al ¹¹	2012	<i>Dectin-1 and DC-SIGN Polymorphisms Associated with Invasive Pulmonary Aspergillosis Infection</i>	Estudo de coorte prospectivo	Inglaterra
Grube et al ¹³	2013	<i>TLR5 stop codon polymorphism is associated with invasive aspergillosis after allogeneic stem cell transplantation</i>	Caso Controle	Alemanha
Smith et al ²¹	2014	<i>Reduced expression of TLR3, TLR10 and TREM1 by human macrophages in Chronic cavitary pulmonary aspergillosis, and novel associations of VEGFA, DENND1B and PLAT</i>	Caso Controle	Itália

3 RESULTADOS

Os principais resultados dos oito artigos incluídos nesta revisão sistemática estão apresentados nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3. Resumo da associação genética dos genes que codificam os receptores *Toll-like* com susceptibilidade à Aspergilose estudada nos últimos anos.

Gene	SNP(s)	Localização Cromossômica	Troca de Nucleotídeo/Aminoácido	Local	Casos	Controles	OR (IC 95%)	p-valor	Ref.
<i>TLR1</i>	rs4833095	4p14	239G>C	Itália	112	277	0,58 (0,36-0,95)	0,029	Smith et al., (2014) ²¹
<i>TLR1</i>	rs4833095	4q14	239G>C	Holanda	43	61	1,02 (0,53-1,96)	0,096	Boer et al., (2011) ¹⁹
<i>TLR1</i>	rs5743611	4q14	743A>G	Holanda	42	59	1,10 (0,39-3,08)	0,860	Boer et al., (2011) ¹⁹
<i>TLR2</i>	rs5743708	4q31.3	Arg753Gln	Reino Unido	40	80	0,795(0,151-4,150)	1,000	Carvalho et al., (2008) ¹⁴
<i>TLR2</i>	rs5743708	4q31.3	Arg753Gln	Alemanha	41	109	-	0,160	Grube et al., (2013) ¹³
<i>TLR3</i>	rs3775296	4q35.1	95C/A	Itália	42	147	2,41(1,27-4,58)	0,007	Carvalho et al., (2012) ²⁰
<i>TLR4</i>	rs4986790	9q33.1	Asp299Gly	Reino Unido	40	80	3,462(1,477-8,110)	0,030	Carvalho et al., (2008) ¹⁴
<i>TLR4</i>	rs4986790	9q33.1	Asp299Gly	Alemanha	41	107	-	0,130	Grube et al., (2013) ¹³
<i>TLR4</i>	rs4986791	9q33.1	Thr399Ile	Alemanha	41	109	-	0,150	Grube et al., (2013) ¹³
<i>TLR4</i>	rs4986791	9q33.1	1363C>T	Holanda	42	61	2,81 (0,91-8,70)	0,060	Boer et al., (2011) ¹⁹
<i>TLR4</i>	rs4986790	9q33.1	1063A>G	Holanda	43	61	4,33(1,33-14,1)	0,010	Boer et al., (2011) ¹⁹
<i>TLR5</i>	rs5744168	1q41	Arg392Ter	Alemanha	41	109	3,285 (1,20-8,99)	0,007	Grube et al., (2013) ¹³
<i>TLR6</i>	rs5743810	4p14	745C>T	Holanda	42	59	1,14 (0,65-2,00)	0,670	Boer et al., (2011) ¹⁹
<i>TLR9</i>	rs5743836	3q21.2	T-123C	Reino Unido	40	80	0,927(0,362-2,373)	0,430	Carvalho et al., (2008) ¹⁴
<i>TLR9</i>	rs352140	3q21.2	1635G >A	Alemanha	41	110	-	0,190	Grube et al., (2013) ¹³

Legenda: SNP: Polimorfismos de base única (do inglês *single nucleotide polymorphism*), Ref: Referências, IC: Intervalo de Confiança.

Tabela 4. Resumo da associação genética dos genes *CLEC7A* com susceptibilidade à Aspergilose estudada nos últimos anos.

Gene	SNP(s)	Localização Cromossômica	Troca de Nucleotídeo/Aminoácido	Local	Casos	Controles	OR (IC 95%)	Valor <i>p</i>	Ref.
<i>CLEC7A</i>	rs16910526	12p13.2	aY238X	Itália	39	166	3,39(1,5-10,0) (D+R) 2,5(1,0-6,5) (D)	0,005 (D+R) 0,05(D)	Cunha et al., (2010) ¹
<i>CLEC7A</i>	rs16910526	12p13.2	aY238X	Bélgica	71	108	1,79(0,77-4,19)	0,017	Chai et al., (2011) ¹⁸
<i>CLEC7A</i>	rs7309123	12p13.2	-	Inglaterra	57	125	4,91(1,52-15,89)	0,05	Sainz et al., (2012) ¹¹
<i>CLEC7A</i>	rs7309123	12p13.2	-	Espanha	112	279	0,59(0,35-0,99)	0,046	Smith et al., (2014) ²¹
<i>CLEC7A</i>	rs3901533	12p13.2	-	Inglaterra	57	125	5,59(1,37-22,77)	0,012	Sainz et al., (2012) ¹¹

Legenda: SNP: Polimorfismos de base única (do inglês *single nucleotide polymorphism*), Ref: Referências, IC: Intervalo de Confiança; D: Doador; R: Receptor.

4 DISCUSSÃO

A AI vem sendo alvo de diversos estudos de imunogenética, pois afeta pacientes com doenças hematológicas e que se encontram imunodeprimidos. Deste modo, vários estudos foram realizados para buscar identificar o papel de polimorfismos genéticos com o desenvolvimento da patologia¹⁰⁻¹².

Conforme Grube et al.¹³, os genes *TLRs* têm sido associados com um aumento de susceptibilidade à AI, onde sua participação é observada principalmente em pacientes que realizaram transplante de medula óssea autólogo. Porém, um estudo que avaliou 127 pacientes que foram submetidos ao transplante de células-tronco alogênico, onde 22 apresentavam a AI e 105 eram casos-controles foi encontrada uma associação significativa para os polimorfismos do gene *TLR1* 239 C/G (rs5743611) e 743 A/G (rs4833095) com a Aspergilose Invasiva (OR= 1,30; IC95%=1,13-1,50; $p<0,001$)¹⁴.

No estudo realizado por Grube et al.¹³, onde foram avaliados os SNPS tanto de indivíduos receptores, quanto de doadores de transplante de medula óssea do tipo alogênico, não foi observado relevância estatística para os genes *TLR2*, *TLR4*, *TLR9* e *TLR5* em pacientes doadores.

Carvalho et al.¹⁴ também desenvolveram estudo onde buscou avaliar a associação da AI com os genes *TLR2*, *TLR4* e *TLR9*. Neste estudo, em concordância com o desenvolvido por Grube et al.¹³, não foi encontrado dados estatisticamente relevantes que associassem o polimorfismo do gene *TLR2* com a doença, porém os autores relataram que devido ao número limitado de pacientes utilizados no estudo, a importância do SNP no gene *TLR2* em pacientes com AI não deveria ser descartada.

Já o polimorfismo do gene *TLR4* (rs4986790) foi associado com o aumento da susceptibilidade à patologia¹⁴. O estudo avaliou 120 indivíduos, sendo 40 controles positivos e 80 controles negativos, onde observou-se tal associação (OR=3,5; IC95%=1,5-8,1; $p=0,003$)¹⁴. Isso se justifica, pois o receptor *TLR4* encontra-se entre os principais receptores envolvidos no reconhecimento de fungos patogênicos e com a resposta inflamatória¹⁶. Porém, de acordo com Pamer¹⁷, a constatação de que polimorfismos nos genes *TLR4* que afetam a susceptibilidade a essa infecção pode ser considerado surpreendente, já que este receptor está relacionado principalmente ao reconhecimento de lipopolissacarídeos bacterianos. Uma

explicação para tal associação seria o reconhecimento de outras moléculas como o betaglucano presente na parede celular do fungo, já que o mesmo não produz lipopolissacarrídeos.

Um risco aumentado do desenvolvimento a AI tem sido associado também com polimorfismos dos genes *TLR5* (rs5744168) e *TLR9* (rs5743836) (OR=3,2; IC95%=1,20-8,99; $p=0,02$) (OR=2,5; IC95%=1,0-6,2; $p=0,043$), respectivamente^{13,14}.

Conforme Grube et al.¹³ o fato do polimorfismo no gene *TLR5* ter sido associado ao desenvolvimento da AI sugere fortemente que as lesões epiteliais brônquicas ou pulmonares são as principais responsáveis pela resposta imune desregulada por *Aspergillus* spp. Além disso, a homeostase das células epiteliais pode ser defeituosa devido ao aumento da apoptose epitelial, comprometendo assim a linha de defesa do fungo.

O polimorfismo (rs5744168) do gene *TLR5* já foi associado com uma maior susceptibilidade à pneumonia, onde o receptor reconhece a flagelina da bactéria *Legionella pneumophilla*. Outro estudo realizado em uma população judaica, relatou que o *stop códon* confere proteção contra a doença de Crohn¹⁹. Vários estudos também ligaram o polimorfismo do gene *TLR9* com diversas patologias como câncer de colo de útero, nefrite lúpica e malária cerebral. Porém poucos são os estudos que descrevem a associação dos polimorfismos dos genes com a AI, sendo necessário, deste modo, a realização de estudos maiores para a confirmação de tais associações¹⁹.

Já com relação ao receptor Dectina-1 de acordo com estudos, o funcionamento defeituoso deste receptor, resultante de um polimorfismo *stop códon*, pode potencialmente aumentar a susceptibilidade à AI^{1,11,18,20,21}.

Cunha et al.¹ confirmaram tal achado ao avaliar tanto doadores quanto receptores de transplante de medula óssea (OR=1,5; IC95%=0,5-5,0; $p=0,005$), revelando que a deficiência do receptor Dectina-1 é um fator predisponente para a AI em pacientes com alto risco e confirma a suspeita de que tal receptor tem o papel de controlar a resistência e a tolerância imunitária ao *Aspergillus* spp.

Outro estudo que confirma tal hipótese foi realizado por Sainz et al.,¹¹ porém o SNP utilizado foi o rs7309123, onde o nível de significância da associação encontrada foi semelhante ao estudo anterior (OR=4,91; IC95%=1,52-15,9; $p=0,005$), sendo observado

juntamente um aumento de positividade para pesquisa de galactomanana em pacientes com o polimorfismo.

Esta associação não foi encontrada no estudo de Chai et al.¹⁸ (OR=1,79; IC95%= 0,77-4,19; $p=0,17$), o qual descreveu que o polimorfismo estudado apresentava uma influência limitada quando associado com uma maior susceptibilidade de desenvolvimento da AI. Já, no estudo realizado por Smith et al.²¹, se avaliou a associação genética em 112 pacientes biologicamente plausíveis que apresentavam AI e em 279 controles saudáveis, onde investigou-se a expressão de genes em monócitos provenientes de macrófagos de pacientes casos e controles no início e durante a estimulação realizada com o fungo *Aspergillus fumigatus*. A partir dos testes realizados, foi observado associação do SNP rs7309123 no gene *CLEC7A* com a AI. Porém, conforme os autores, devido a população utilizada ter sido apenas caucasiana, há uma limitação do estudo, tornando-se necessário a realização de mais trabalhos em outros grupos étnicos, determinando assim a susceptibilidade de forma mais generalizada.

Vários polimorfismos nos genes que codificam componentes da imunidade inata tem sido relatados recentemente por aumentar a susceptibilidade a infecções por *Aspergillus*^{11-14,19-21}. Conforme Chai et al.¹⁸ não deve ser desconsiderado a possibilidade de um paciente apresentar mais de um polimorfismo e conseqüentemente possuir elevada susceptibilidade para o desenvolvimento da AI.

5 CONCLUSÃO

Concluimos que de acordo com estudos já publicados há uma associação significativa de polimorfismos genéticos com a AI. Porém, estudos mais amplos e em maior número, visando cada um dos SNPS apresentados, devem ser realizados para uma melhor avaliação e conseqüentemente a obtenção de resultados mais fidedignos.

Estudos neste sentido são extremamente importantes, pois com a maior identificação dos polimorfismos genéticos, associados com a AI, será possível identificar os pacientes com o risco elevado de desenvolver a patologia. Adicionalmente, será possível a individualização de procedimentos diagnósticos utilizando a técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), por exemplo, além da utilização de meios profiláticos contra a doença e a individualização terapêutica.

6 REFERÊNCIAS

1. Cunha C, Di Ianni M, Bozza S, Giovannini G, Zagarella S, Zelante T, et al. Dectin-1 Y238X polymorphism associates with susceptibility to invasive aspergillosis in hematopoietic transplantation through impairment of both recipient- and donor-dependent mechanisms of antifungal immunity. *Blood*. 2010;116:5394–402.
2. Neofytos D, Treadway S, Ostrander D, Alonso CD, Dierberg KL, Nussenblatt V. Epidemiology, outcomes, and mortality predictors of invasive mold infections among transplant recipients: a 10-year, single-center experience. *Transpl Infect Dis*. 2013;15(3):233–42.
3. Garcia-Vidal C, Upton A, Kirby KA, Marr KA. Epidemiology of Invasive Mold Infections in Allogeneic Stem Cell Transplant Recipients: Biological Risk Factors for Infection According to Time after Transplantation. *Clin Infect Dis*. 2008;47(8):1041–50.
4. Ok M, Einsele H, Loeffler J. Genetic susceptibility to *Aspergillus fumigatus* infections. *Int J Med Microbiol* [Internet]. Elsevier GmbH.; 2011;301(5):445–52.
5. Cunha C, Rodrigues F, Zelante T, Aversa F, Romani L, Carvalho A. Genetic susceptibility to aspergillosis in allogeneic stem-cell transplantation. *Med Mycol* [Internet]. 2011;49 Suppl 1:S137–43.
6. Sales PU. Aspergilose: do diagnóstico ao tratamento. *J Bras Pneumol*. 2009;35(12):1238–44.
7. Pauw B De, Thomas J, Walsh, Donnelly JP, Stevens D a., Edwards JE, Calandra T, et al. Revised Definitions of Invasive Fungal Disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive. *Clin Infect Dis*. 2008;46(12):1813–21.
8. Lamoth F, Bochud P. [Preventing invasive aspergillosis in hematopoietic stem cells transplant recipients]. *Med Sci (Paris)* [Internet]. 2009;25:669–72.
9. Sherif R, Segal BH. Pulmonary Aspergillosis: clinical presentation, diagnostic tests, management and complications. *Curr Opin Pulm Med*. 2010;16(3):242–50.
10. Bochud P-Y, Jason W, Chien MD, Kieren A, Marr MD, Wendy M, Leisenring SD, Arlo Upton MD, Marta Janer PD, et al. Toll-like Receptor 4 Polymorphisms and

- Aspergillosis in Stem- Cell Transplantation. *N Engl J Med*. 2009;359(17):1766–77.
11. Sainz J, Lupiáñez CB, Segura-Catena J, Vazquez L, Ríos R, Oyonarte S, et al. Dectin-1 and DC-SIGN polymorphisms associated with invasive pulmonary aspergillosis infection. *PLoS One*. 2012;7(2):1–10.
 12. Cunha C, Aversa F, Lacerda JF, Busca A, Kurzai O, Grube M, et al. Genetic PTX3 deficiency and aspergillosis in stem-cell transplantation. *N Engl J Med* [Internet]. 2014;370:421–32.
 13. Grube M, Loeffler F, Mezger M, Krüger K, Echtenacher B, Hoffmann P, et al. TLR5 stop codon polymorphism is associated with invasive aspergillosis after allogeneic stem cell transplantation. *Med Mycol*. 2013;51(8):818–25.
 14. Carvalho A, Pasqualotto AC, Pitzurra L, Romani L, Denning DW, Rodrigues F. Polymorphisms in toll-like receptor genes and susceptibility to pulmonary aspergillosis. *J Infect Dis*. 2008;197:618–21.
 15. Rødland EK, Ager-Wick E, Halvorsen B, Müller F, Frøland SS. Toll like receptor 5 (TLR5) may be involved in the immunological response to *Aspergillus fumigatus* in vitro. *Med Mycol*. 2011;49(May):375–9.
 16. Lin Y-T, Verma A, Hodgkinson CP. Toll-like receptors and human disease: lessons from single nucleotide polymorphisms. *Curr Genomics* [Internet]. 2012;13:633–45.
 17. Pamer EG. TLR polymorphisms and the risk of invasive fungal infections. *N Engl J Med* [Internet]. 2008;359(17):1836–8.
 18. Chai LY a, De Boer MGJ, Van Der Velden WJFM, Plantinga TS, Van Spruiel AB, Jacobs C, et al. The Y238X stop codon polymorphism in the human b-glucan receptor dectin-1 and susceptibility to invasive aspergillosis. *J Infect Dis*. 2011;203:736–43.
 19. Boer MGJ, Jolink H, Halkes CJM, van der Heiden PLJ, Kremer D, Falkenburg JHF, et al. Influence of polymorphisms in innate immunity genes on susceptibility to invasive aspergillosis after stem cell transplantation. *PLoS One*. 2011;6(4):2–7.
 20. Carvalho A, Luca A De, Bozza S, Cunha C, Angelo CD, Perruccio K, et al. T-cell responses to *Aspergillus fumigatus* in hematopoietic transplanted patients TLR3

- essentially promotes protective class I – restricted memory CD8 γ T-cell responses to *Aspergillus fumigatus* in hematopoietic transplanted patients. 2012;119(4):967–77.
21. Smith NLD, Hankinson J, Simpson A, Denning DW, Bowyer P. Reduced expression of TLR3, TLR10 and TREM1 by human macrophages in Chronic cavitary pulmonary aspergillosis, and novel associations of VEGFA, DENND1B and PLAT. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. European Society of Clinical Infectious Diseases; 2014;20(11):O960–8.

4.2 ARTIGO 2

AVALIAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DE PACIENTES SUBMETIDOS AO TESTE DE GALACTOMANANA SÉRICA COM SUSPEITA DE ASPERGILOSE INVASIVA

EPIDEMIOLOGICAL EVALUATION OF PATIENTS SUBMITTED TO THE SERIOUS GALACTOMANANA TEST WITH SUSPICIOUS INVASIVE ASPERGYLOSIS

RESUMO

Introdução: A frequência da Aspergilose Invasiva varia de 5 a 15% em indivíduos que foram submetidos ao transplante de medula óssea. O prognóstico da doença depende principalmente da precocidade com que o diagnóstico é realizado. **Objetivo:** Traçar o perfil epidemiológico de pacientes que realizaram teste de galactomanana por ELISA com suspeita de Aspergilose Invasiva e determinar os principais fatores que contribuem para o desenvolvimento da doença. **Metodologia:** Foram avaliados 264 pacientes que realizaram teste de galactomanana por ELISA com suspeita de Aspergilose Invasiva no período de 2013 a 2015, e foram excluídos pacientes que não possuíam dados clínicos em prontuários e com perda de seguimento no hospital. As características clínico-epidemiológicas foram determinadas por meio de estatística descritiva e as variáveis foram avaliadas usando os testes de qui-quadrado (χ^2) e teste G, com *p*-valor considerado significativo abaixo de 0,05. **Resultados:** De acordo com a classificação para Aspergilose Invasiva, conforme a *European Organization for Research and Treatment of Cancer*, a doença foi interpretada como comprovada em 7,3%, definida por cultura positiva para o fungo, 6,4% como provável pela detecção de galactomanana no sangue e presença de infiltrados pulmonares e 5,1% como possível por alterações radiológicas sugestivas de Aspergilose Invasiva e galactomanana negativo. A taxa de mortalidade para Aspergilose Invasiva comprovada/provável/possível foi de 61,3% e mostrou que a doença estava significativamente associada com o risco de morte ($p < 0,0001$). **Conclusão:** Ao considerarmos a alta taxa de mortalidade causada pelo desenvolvimento da Aspergilose Invasiva e que a realização de uma terapia precoce promove significativa melhora do prognóstico dos pacientes, concluímos conforme os resultados do presente estudo que a detecção de galactomanana, realizada como acompanhamento dos pacientes com alto risco de desenvolver a doença, pode ser considerada um método eficaz para auxiliar na identificação de Aspergilose Invasiva.

Palavras-Chave: Aspergilose Invasiva; Galactomanana; ELISA-GM; Neutropenia.

ABSTRACT

Introduction: The frequency of invasive aspergillosis varies from 5 to 15% in individuals who have undergone bone marrow transplantation. The prognosis of the disease depends mainly on the precocity with which the diagnosis is made. **Objective:** To trace the epidemiological profile of patients who underwent galactomannan test by ELISA with suspected Invasive Aspergillosis and to determine the main factors that contribute to the development of the disease. **Methodology:** We evaluated 264 patients who underwent galactomannan test by ELISA with suspicion of Invasive Aspergillosis from 2013 to 2015, and were excluded patients who did not have clinical data in medical records and with loss of follow-up in the hospital. The clinical-epidemiological characteristics were determined using descriptive statistics and the variables were evaluated using the chi-square test (χ^2) and the G-test, with *p*-value considered significant below 0.05. **Results:** According to the classification for Aspergillosis

Invasive, according to the European Organization for Research and Treatment of Cancer, the disease was interpreted as proven in 7.3%, defined by culture positive for the fungus, 6.4% as likely by detection Of galactomannan in the blood and presence of pulmonary infiltrates and 5.1% as possible by radiological alterations suggestive of Invasive Aspergillosis and galactomannan negative. The estimated / probable / probable Aspergillosis Invasive mortality rate was 61.3% and showed that the disease was significantly associated with the risk of death ($p < 0.0001$). **Conclusion:** When considering the high mortality rate caused by the development of Aspergillosis Invasive and the fact that an early therapy promotes a significant improvement in the prognosis of patients, we conclude according to the results of the present study that the detection of galactomannan, High risk of developing the disease, can be considered an effective method to aid in the identification of Invasive Aspergillosis.

Keywords: Invasive Aspergillosis; Galactomannan; ELISA-GM; Neutropenia.

1 INTRODUÇÃO

A Aspergilose Invasiva (AI) é causada por espécies de *Aspergillus* spp., sendo considerada uma infecção fúngica oportunista. Existem mais de 800 espécies do fungo, porém apenas algumas são capazes de desenvolver a doença. A porta de entrada mais comum desses fungos é através da inalação de esporos nos seios nasais e no trato respiratório. Uma vez inalados, na ausência de defesas apropriadas do hospedeiro, os esporos aumentam, germinam e se disseminam hematogenicamente por invasão vascular. Indivíduos com uma defesa normal raramente desenvolvem a doença¹⁻³.

A AI é considerada uma das infecções fúngicas mais prevalentes em indivíduos imunocomprometidos. A morbidade e a mortalidade destes indivíduos estão fortemente associadas a esta infecção, que é causada por fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* spp.¹⁻³.

A frequência da doença varia de 5 a 15% em indivíduos que foram submetidos ao transplante de medula óssea (TMO). Já em indivíduos neutropênicos por cerca de um mês, com qualquer doença maligna hematológica, a incidência pode chegar a 70%. As taxas de mortalidade dos indivíduos infectados são superiores a 90% e estão associadas a dificuldade do diagnóstico precoce, fundamental para um melhor prognóstico, e as terapias antifúngicas com início tardio⁴⁻⁶.

A AI em pacientes que foram submetidos ao TMO alogênico apresenta uma frequência de 15,1% e em pacientes que realizaram TMO autólogo, esta frequência é de 2%^{7,8}. Junto a este fator estão incluídos no grupo de risco, aqueles que apresentam leucemias agudas, doença granulomatosa crônica, doença pulmonar crônica, transplantados de órgãos

sólidos (5 a 15%), usuários de anticorpos monoclonais, pacientes neutropênicos e com monocitopenia, pacientes que realizam terapias com corticosteroides e imunossupressores em doses elevadas e fatores genéticos^{1,7-9}.

O prognóstico da patologia depende principalmente da precocidade com que o diagnóstico é realizado. De acordo com um estudo, realizado em Taiwan, a mortalidade em pacientes que apresentavam tal doença teve um aumento de 40% para 90% quando o diagnóstico foi realizado dentro de 10 dias ou a partir do 11º dia da doença¹⁰.

Em pacientes imunocompetentes, o sistema imune inato geralmente atua de maneira eficiente. Tal fato evita a forma angioinvasiva do patógeno, onde o epitélio respiratório atua de modo primário como uma barreira mecânica por meio das células ciliadas e mucosas. Estas células são responsáveis pela produção de derivados oxidativos e outras moléculas que apresentam toxicidade direta ao fungo^{11,12}.

De acordo com a *European Organization for Research and Treatment of Cancer* (EORTC/MSG), o diagnóstico da AI é classificado como comprovado, provável e possível⁶. O diagnóstico é comprovado somente quando houver invasão tecidual e a mesma for confirmada por meio do cultivo positivo do fungo. Já, a doença pode ser dita provável com a constatação microbiológica em pacientes com elevado risco de ter a AI. Quando não houver a comprovação microbiológica, e o paciente apresentar infiltrados pulmonares observados na tomografia computadorizada (TC) de tórax e galactomanana (GM) quantificada por teste de ELISA negativo, dizemos que o paciente tem um possível diagnóstico de AI¹³.

A GM é um componente polissacarídeo presente na parede celular do *Aspergillus* spp., podendo ser detectado no líquido broncoalveolar (LBA) e no sangue. O teste de ELISA utilizado para detecção é comercialmente denominado Platelia® *Aspergillus* EIA – Biorad, considerado como fundamental para o diagnóstico de AI pela EORTC/MSG¹⁴.

O tratamento antifúngico de início precoce é recomendado em pacientes de alto risco para AI, que apresentam febre persistente após 4-7 dias e nenhuma infecção identificada¹⁰.

Desse modo, o objetivo deste estudo foi traçar o perfil epidemiológico de pacientes que realizaram teste de galactomanana por ELISA com suspeita de Aspergilose Invasiva atendidos em um hospital de referência de Goiânia, Goiás, Brasil, e determinar os principais fatores que contribuem para o desenvolvimento da doença.

2 METODOLOGIA

O estudo foi do tipo epidemiológico descritivo, e a população utilizada foram pacientes que realizaram teste de galactomanana no Laboratório de Transplante de Medula Óssea no Hospital Araújo do Hospital Araújo Jorge (HAJ), da Associação de Combate ao Câncer em Goiás (ACCG), tratados no Setor de hematologia na cidade de Goiânia, Goiás, Brasil.

No presente estudo avaliou-se 264 pacientes com suspeita de AI. Foram incluídos pacientes que realizaram teste galactomanana por ELISA no período de 2013 a 2015 e aqueles que possuíam dados clínicos em prontuários médicos no hospital. Foram excluídos indivíduos tratados no setor de hematologia antes de 2013 ou após 2015 e com perda de seguimento no hospital.

Para a elaboração do banco de dados preencheu-se um formulário que continha informações como: características gerais e clínicas de cada paciente, incluído as variáveis como neutropenia, uso de antifúngicos e/ou antibióticos, diagnóstico de AI classificado de acordo com a EORTC/MSG, evolução ao óbito, realização de TMO, qual o tipo de transplante, resultado quantitativo e qualitativo, entre outros. O formulário foi desenvolvido com a finalidade de coletar informações necessárias para a avaliação de possíveis interferentes no teste de ELISA para detecção de galactomanana e fatores que podem estar associados com o desenvolvimento da AI na população avaliada.

O estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC de Goiás) e da Associação de Combate ao Câncer em Goiás (ACCG).

As características clínico-epidemiológicas foram determinadas por meio de estatística descritiva. As relações entre o desenvolvimento da AI com a realização do TMO e o tipo de transplante, ou com a neutropenia encontrada nos pacientes e outros parâmetros avaliados, como idade, sexo, tipo de doença hematológica, uso ou não de antifúngicos e antibióticos, foram avaliadas usando os testes do qui-quadrado (χ^2) e G, com nível de significância de 95%, portanto com *p-valor* considerado significativo abaixo de 0,05.

3 RESULTADOS

As características epidemiológicas e clínicas dos pacientes estão apresentadas na Tabela 1. Os pacientes analisados apresentavam média de idade de 43,7 ($\pm 19,3$) anos e a grande maioria estava dentro da faixa etária entre 30 a 59 anos. Entre os pacientes, 130 (55,5%) eram do sexo masculino e 74 (31,6%) evoluíram ao óbito. Com relação à realização do TMO, 133 (56,8%) haviam sido submetidos ao transplante, sendo 91 (38,9%) do tipo autólogo e 42 (17,9%), alogênico.

Dos pacientes avaliados, 225 (96,2%) apresentavam doenças hematológicas malignas e um total de 110 (47,0%) encontrava-se neutropênico, sendo 14 (6,0%) com neutropenia leve, 16 (6,8%) com neutropenia moderada e 80 (34,2%) com neutropenia grave.

De acordo com os dados coletados, presentes nos prontuários dos pacientes, 175 (74,8%) utilizavam antifúngicos, 197 (84,2%) faziam uso de algum antibiótico e/ou antiviral, 108 (46,2%) drogas imunossupressoras e 7 (3,0%) haviam utilizado corticosteroides por um período prolongado. Outra variável avaliada foi a presença de HIV, onde, dentre os 234 pacientes avaliados, 2 (0,9%) apresentavam o vírus, sendo um do sexo masculino e o outro do sexo feminino.

Ao avaliar os dados referentes aos índices quantitativos de galactomanana presentes no soro dos pacientes, observou-se uma média de 308,1 ng/mL para os resultados e com relação aos dados qualitativos, 45 (19,2%) pacientes apresentaram resultados positivos, ou seja, maior que 0,5 ng/mL.

Os diagnósticos de AI de acordo com a EORTC/MSG, classificados como possível, provável e comprovado apresentaram as seguintes porcentagens: 12 casos possíveis (5,1%), 15 casos prováveis (6,4%) e 17 casos comprovados (7,3%).

Tabela 1. Características epidemiológicas e clínicas dos pacientes, Goiânia/GO, 2017.

Variáveis	Feminino (n=104)		Masculino (n=130)		Total (n=234)		p-valor
	N	f(%)	n	f(%)	N	f(%)	
Idade (anos)							
Média (DP)	42.9 (18.8)		44.2 (19.7)		43.7 (19.3)		
Mínimo – Máximo	5 90		2 85		2 90		
Idade (anos)							
< 30	31	29,8	31	23,8	62	26,5	
30 a 59	50	48,1	63	48,5	113	48,3	
≥ 60	23	22,1	36	27,7	59	25,2	0,475
Amostra Seriada							
Média (DP)	3.4 (3.6)		3.8 (3.7)		3.6 (3.6)		
Mínimo – Máximo	1 24		1 20		1 24		
Resultado Quantitativo							
Média (DP)	264.7 (--)		342.8 (--)		308.1 (--)		
Mínimo – Máximo	0,170 7813,0		0,153 10965,0		0,153 10965,0		
Resultado Qualitativo							
Negativo	87	83,7	102	78,5	189	80,8	
Positivo	17	16,3	28	21,5	45	19,2	0,404
Neutropenia							
Não	51	49,0	73	56,2	124	53,0	
Sim	53	51,0	57	43,8	110	47,0	0,341
Leve	8	7,7	6	4,6	14	6,0	
Moderada	8	7,7	8	6,2	16	6,8	
Grave	37	35,6	43	33,1	80	34,2	0,744
Antifúngico							
Não	29	27,9	30	23,1	59	25,2	
Sim	75	72,1	100	76,9	175	74,8	0,490
Antibiótico e Antiviral							
Não	22	21,2	15	11,5	37	15,8	
Sim	82	78,8	115	88,5	197	84,2	0,068
Doença Hematológica Maligna							
Não	5	4,8	4	3,1	9	3,8	
Sim	99	95,2	126	96,9	225	96,2	0,732
Transplante							
Não	42	40,4	59	45,4	101	43,2	
Sim	62	59,6	71	54,6	133	56,8	0,526
Autólogo	43	41,3	48	36,9	91	38,9	
Alogênico	19	18,3	23	17,7	42	17,9	0,976
Drogas Imunossupressoras							
Não	52	50,0	74	56,9	126	53,8	
Sim	52	50,0	56	43,1	108	46,2	0,356
Corticóide Prolongado							
Não	101	97,1	126	96,9	227	97,0	
Sim	3	2,9	4	3,1	7	3,0	0,764
HIV Positivo							
Não	103	99,0	129	99,2	232	99,1	
Sim	1	1,0	1	0,8	2	0,9	0,578
Óbito							
Não	71	68,3	89	68,5	160	68,4	
Sim	33	31,7	41	31,5	74	31,6	0,912
Diagnóstico de AI							
Negativo	88	84,6	102	78,5	190	81,2	
Possível	5	4,8	7	5,4	12	5,1	
Provável	3	2,9	12	9,2	15	6,4	
Comprovado	8	7,7	9	6,9	17	7,3	0,263

Ao associarmos as variáveis estudadas no presente estudo com o índice de GM (Tabela 2), observou-se que 28 (68,8%; $p= 0,404$) dos resultados positivos para o teste eram de pacientes do sexo masculino. Já ao avaliarmos a positividade do teste com a idade dos pacientes, encontrou-se resultado estatisticamente relevante, quando associou-se o resultado de GM positivo com pacientes com idade $>$ que 50 anos ($p= 0,043$).

Tabela 2. Variáveis associadas ao índice de galactomanana sérica, Goiânia/GO, 2017.

Variáveis	Índice de Galactomanana Sérica				p-valor
	Negativo $< 0,50$ (n=189)		Positivo $\geq 0,50$ (n=45)		
	n	f(%)	n	f(%)	
Sexo					
Feminino	87	46,0	17	37,8	0,404
Masculino	102	54,0	28	62,2	
Idade (anos)					
≤ 20	20	10,6	11	24,4	0,043
21 a 50	92	48,7	20	44,4	
> 50	77	40,7	14	31,1	
TMO					
Alogênico	31	16,4	10	22,2	0,243
Autólogo	78	41,3	13	28,9	
Não	80	42,3	22	48,9	
Bilirrubina					
$\leq 1,0$ mg/Dl	93	49,2	16	35,6	0,062
$> 1,0$ mg/Dl	41	21,7	16	35,6	
NR	55	29,1	13	28,9	
Neutropenia					
Leve (>1000)	12	6,3	1	2,2	0,420
Moderada (500-1000)	13	6,9	3	6,7	
Severa (<500)	62	32,8	18	40,0	
Sem neutropenia	102	54,0	23	51,1	
Antifúngico					
Não	50	26,5	9	20,0	0,474
Sim	139	73,5	36	80,0	
Antibiótico + Antiviral					
Não	31	16,4	6	13,3	0,778
Sim	158	83,6	39	86,7	

Outra variável onde se analisou associação com o resultado do teste de GM é o índice de bilirrubina. Considerou-se pacientes com bilirrubina positiva aqueles com resultados $> 1,0$ mg/dL e negativo $\leq 1,0$ mg/dL. De acordo com os dados estatísticos encontrados, observou-se $p=0,062$ para a associação descrita, desse modo, podemos relatar um resultado tendencioso para pacientes com GM positivos que apresentaram índices de bilirrubina maiores que os normais.

Avaliando a neutropenia dos pacientes com o índice de galactomana sérica, 18 (40,0%; $p=0,420$) dos 45 pacientes com resultado positivo para GM apresentavam neutropenia grave.

Com relação aos fármacos utilizados, 36 (80,0%; $p= 0,474$) faziam uso de antifúngicos e 39 (86,7%; $p=0,778$) uso de antibióticos e/ou antivirais de algum tipo e tiveram resultados maiores que 0,5 ng/mL para o teste de GM.

Ao analisarmos a associação de variáveis com o diagnóstico possível, provável e comprovado de AI, encontrou-se associação significativa ($p=0,024$) quando se refere aos indivíduos com idade maior que 50 anos com algum resultado de AI, sendo ele provável, possível ou comprovado (Tabela 3). Com relação a neutropenia desses pacientes, 6 (35,3%) apresentaram algum tipo de neutropenia para diagnóstico de AI comprovado e 10 (66,7%) para o diagnóstico provável.

No que diz respeito aos medicamentos neste estudo avaliados, ao associarmos com o diagnóstico de AI, 14 (82,4%) faziam uso de algum antifúngico e apresentaram diagnóstico comprovado e 15 (88,2%), dos 17 pacientes, com diagnóstico comprovado, utilizavam algum antibiótico e/ou antiviral.

Ao realizarmos uma associação entre os pacientes que desenvolveram a doença e a taxa de mortalidade, encontramos resultados bastante significativos, onde dos 44 pacientes que apresentaram algum diagnóstico de AI, 27 evoluíram ao óbito (61,3%; $p<0,0001$).

Tabela 3. Variáveis associadas ao diagnóstico de Aspergilose Invasiva de acordo com EORTC/MSG, Goiânia/GO, 2017.

Variáveis	Diagnóstico da Aspergilose Invasiva								p-valor
	Negativo (n=190)		Possível (n=12)		Provável (n=15)		Comprovado (n=17)		
	n	f(%)	n	f(%)	n	f(%)	n	f(%)	
Sexo									
Feminino	88	46,3	5	41,7	3	20,0	8	47,1	0,244
Masculino	102	53,7	7	58,3	12	80,0	9	52,9	
Idade (anos)									
≤ 20	18	9,5	3	25,0	3	20,0	7	41,2	0,024
21 a 50	99	52,1	3	25,0	5	33,3	5	29,4	
> 50	73	38,4	6	50,0	7	46,7	5	29,4	
TMO									
Alogênico	33	17,4	2	16,7	2	13,3	4	23,5	0,224
Autólogo	81	42,6	2	16,7	3	20,0	5	29,4	
Não	76	40,0	8	66,7	10	66,7	8	47,1	
Bilirrubina									
≤ 1,0 mg/Dl	92	48,4	4	33,3	5	33,3	8	47,1	0,389
> 1,0 mg/Dl	44	23,2	4	33,3	6	40,0	3	17,6	
NR	54	28,4	4	33,3	4	26,7	6	35,3	
Neutropenia									
Leve (>1000)	11	5,8	2	16,7	0	0,0	0	0,0	0,253
Moderada (500-1000)	14	7,4	0	0,0	1	6,7	1	5,9	
Severa (<500)	64	33,7	2	16,7	9	60,0	5	29,4	
Sem neutropenia	101	53,2	8	66,7	5	33,3	11	64,7	
Antifúngico									
Não	50	26,3	2	16,7	4	26,7	3	17,6	0,766
Sim	140	73,7	10	83,3	11	73,3	14	82,4	
Antibiótico + Antiviral									
Não	32	16,8	2	16,7	1	6,7	2	11,8	0,698
Sim	158	83,2	10	83,3	14	93,3	15	88,2	
Óbito									
Não	143	75,3	7	58,3	4	26,7	6	35,3	<0,0001
Sim	41	24,7	5	41,7	11	73,3	11	64,7	

4 DISCUSSÃO

A AI aumentou grandemente nos anos 1980 e 1990 nos Estados Unidos e Europa de acordo com relatórios de autópsia realizadas nestes períodos¹³. Na população deste trabalho, com relação a idade dos pacientes, foi observada frequência similar entre homens e mulheres, sendo o sexo masculino um pouco mais frequente. Já a média das idades encontrada foi de 43,7 anos. Resultado similar foi identificado no estudo realizado por Bhayat et al.,¹⁴ onde os mesmos relatam que a frequência com relação ao sexo masculino e feminino foi aproximada, porém o sexo masculino apresentou frequência 5% maior.

A AI tem sido tradicionalmente associada a pacientes imunocomprometidos, mas sua incidência em pacientes imunocompetentes está aumentando. Tal fato se dá, de acordo com uma revisão sistemática retrospectiva de 10 casos de AI realizada na Índia no período de 2013 a 2015, devido ao uso generalizado de tratamentos imunossupressores, esteroides e o uso frequente e pouco criterioso de antibióticos¹⁵.

Conforme Garcia-Vidal et al.,¹⁶ e Ok et al.,¹⁷ a vulnerabilidade dos pacientes transplantados a AI pode ser considerada multifatorial, abrangendo tanto fatores de riscos clínicos, como idade avançada, quanto fatores de riscos biológicos, como deficiência em múltiplas linhagens celulares e sobrecarga de ferro. Parte dessas informações é observada em nosso estudo, pois ao avaliarmos a associação de pacientes com idade maior que 50 anos, com o diagnóstico de AI, encontramos resultados estatisticamente significativos ($p=0,024$).

A taxa de mortalidade em pacientes que desenvolvem a AI pode ultrapassar uma frequência de 90%, sendo considerada a principal causa de morbidade e mortalidade com doenças hematológicas⁸. Em nosso estudo, a porcentagem de pacientes de modo geral que evoluíram ao óbito foi de 31,6%, e ao realizarmos uma associação entre os pacientes que desenvolveram a doença e a taxa de mortalidade, encontramos resultados extremamente significativos, onde dos 44 pacientes que apresentaram algum diagnóstico de AI, 27 evoluíram ao óbito (61,3%; $p<0,0001$), lembrando que a sobrevida dos mesmos, conforme estudos, encontra-se intimamente associada ao diagnóstico realizado de modo precoce e da terapia imediata^{8,9,11,18}.

Porém, conforme uma revisão sistemática realizada atualmente, a sobrevida dos pacientes com AI aumentou nos últimos anos devido aos avanços no diagnóstico e à liberação de drogas antifúngicas mais recentes. Mas apesar dos avanços, muito ainda deve ser

melhorado (a mortalidade atribuível é 42-64%) principalmente em pacientes que realizaram TMO alogênico, idade avançada ou em casos de envolvimento extrapulmonar¹⁹.

Já com relação aos pacientes que realizaram TMO, a doença ocorre em 15,1% dos que realizaram TMO do tipo alogênico e em 2,0% naqueles que realizaram TMO autólogo⁸. Ao analisarmos a população estudada, onde a frequência de pacientes que realizaram TMO alôgenico (17,9%) foi menor que a frequência daqueles que realizaram TMO autólogo (38,9%), podemos descrever que conforme esses índices, os pacientes estudados possuíam menor probabilidade de desenvolver AI, se considerarmos somente o tipo de transplante realizado. Tal situação pode ser confirmada, quando associamos os dados referentes a realização do TMO e o tipo de transplante realizado com o diagnóstico de AI, onde dos 91 pacientes que realizaram TMO do tipo autólogo, 81 apresentaram resultado negativo para AI.

De acordo com os dados encontrados neste trabalho, 47,0% dos pacientes examinados apresentavam algum grau de neutropenia, sendo que 34,2% continham neutropenia grave. Em contrapartida aos altos índices de neutropenia encontrados, Garcia-Vidal et al.,¹⁶ relata que a linfopenia, neutropenia e/ou monocitopenia eram observadas como fortes fatores de riscos para a AI, porém embora estas citopenias tenham sido consistentemente identificadas na grande maioria dos pacientes acometidos com a doença, as defesas antifúngicas envolvem mais do que a morte de neutrófilos, onde por exemplo, as repostas de células T CD4+ específicas para o *Aspergillus* spp. têm sido reconhecidas como fundamentais na regulação da inflamação pulmonar.

Conforme Pfeiffer et al.¹¹, a população que possui maior risco de desenvolvimento da AI é aquela que apresenta neutropenia prolongada, infecção pelo vírus HIV e imunodeficiência hereditária. Em nosso estudo, 2 pacientes apresentavam infecção pelo vírus, porém ambos não desenvolveram a AI, desse modo é importante ressaltar que devido ao número pequeno de pacientes com HIV, não foi possível descrever qualquer correlação a respeito do vírus com a *Aspergilose* Invasiva em nosso estudo.

Com relação aos resultados qualitativos para detecção de GM por teste de ELISA verificados, 18,8% exibiram positividade para GM. Essa porcentagem pode estar associada à baixa sensibilidade do teste, onde, de acordo com um estudo realizado, é de 67,9% e a especificidade de 93,5% quando o material utilizado é o soro¹³.

De acordo com uma meta-análise, a utilização do teste de ELISA para detecção de GM foi consideravelmente útil para a vigilância da AI em pacientes com doenças hematológicas malignas (DHM) ou pacientes receptores de transplantes hematológicos. Porém, em casos de transplantados de órgãos sólidos, o teste apresentou baixa sensibilidade e especificidade¹¹. Desse modo, a utilização do teste, ao avaliarmos a alta frequência de pacientes do presente estudo com DHM (96,9%) e de pacientes receptores de transplantes hematológicos (56,8%) como forma de auxiliar no prognóstico, diagnóstico e terapêutica preventiva, cujo os fatores tornam o paciente altamente susceptível à aspergilose, fazem do teste crucial para o monitoramento dos pacientes.

Em contrapartida, a detecção de GM sérica pode apresentar influência do tratamento antifúngico realizado, além de ser possível a observação de valores falso-positivos em pacientes que foram medicados com antibióticos de origem fúngica (piperacilina-tazobactam e amoxicilina com ácido clavulônico), antibióticos beta-lactâmicos, fluidos intravenosos que contenham gluconato, pacientes submetidos à agentes citotóxicos, anticorpos autorreativos, em casos de enfermidade do enxerto versus hospedeiro, transfusões, contaminação da amostra e infecções causadas por outros fungos (*Penicillium*, *Paecilomyces* e *Histoplasma capsulatum*)^{3,10,18}. Perante essas informações, a possibilidade de possíveis casos falso positivos na população deste estudo não deve ser descartada, pois cerca de 84,2% dos pacientes envolvidos na pesquisa utilizaram em datas próximas ou faziam uso na data do exame para GM de antibióticos de algum tipo e 74,8% faziam uso de antifúngicos. Adicionalmente, ao avaliarmos estatisticamente a associação de resultados positivos para GM e a porcentagem de pacientes que faziam uso de algum antibiótico e/ou antiviral encontramos os seguintes resultados: 39 pacientes dos 46 que apresentaram resultado positivo utilizavam os medicamentos, assim reforça-se a possibilidade de casos falso-positivos.

Pacientes que se encontram ictericos também podem apresentar resultado falso-positivo, isso se dá devido a interferência do pigmento bilirrubina na leitura óptica do teste de ELISA para GM⁹. Em nosso estudo, ao associarmos os índices de bilirrubina sérica com o resultado quantitativo de galactomanana, encontramos um $p=0,062$. Sendo assim, podemos relatar um resultado tendencioso para tal associação.

Em um estudo, realizado na Turquia, foi investigado o desempenho de um dispositivo denominado Aspergillus de fluxo lateral (LFD) como um teste de rápido atendimento para o diagnóstico de AI. Este teste é um imunoenensaio que se baseia na detecção do antígeno de

Aspergillus liberado durante a invasão de hifas por anticorpos monoclonais IgG²⁰. Apesar de não apresentar a necessidade de equipamentos específicos para a realização do teste e o resultado está disponível em 15 minutos, a sensibilidade do mesmo como teste de ponta é baixa e a comercialização ainda não se encontra disponível^{19,20}.

Com relação ao tratamento dos pacientes do presente estudo a maioria (74,8%) faziam uso de algum antifúngico, onde de acordo com os prontuários dos mesmos o medicamento de escolha era o voriconazol, anfotericina B ou ambos. Em uma revisão, que descreve o uso de um medicamento denominado isavuconazol, o qual é um triazol de segunda geração com atividade contra um amplo espectro de fungos clinicamente importantes foi relatado que tal fármaco quando comparado ao voriconazol, apresenta menos efeitos adversos do tratamento relacionados ao medicamento de escolha, do que o voriconazol. Os autores ainda relatam que vários são os atributos que tornam o isavuconazol uma nova opção de tratamento útil para a AI, incluindo farmacocinética previsível, excelente biodisponibilidade, nenhum efeito alimentar com a formulação oral e a sua potencial utilidade em doentes com insuficiência renal, dada a ausência de ciclodextrina, componente presente na composição do voriconazol, o que o torna nefrotóxico²¹.

5 CONCLUSÃO

Desse modo, ao considerarmos a alta taxa de mortalidade causada pelo desenvolvimento da AI e que a realização de uma terapia precoce promove uma significativa melhora do prognóstico dos paciente, os resultados encontrados nesse estudo nos permite propor que a detecção de GM realizada como acompanhamento de pacientes com alto risco de desenvolver a doença como forma preventiva, pode ser considerado um método eficaz para auxiliar na identificação de Aspergilose Invasiva.

6 REFERÊNCIAS

1. Lamoth F, Rubino I, Bochud P-Y. Immunogenetics of invasive aspergillosis. *Med Mycol.* 2011;49 Suppl 1(April):S125–36.
2. Van der Velden WJFM, Blijlevens NM a., Donnelly JP. Genetic variants and the risk

- for invasive mould disease in immunocompromised hematology patients. *Curr Opin Infect Dis.* 2011;24:554–63.
3. Mota FB. Diagnóstico da Aspergilose Invasiva: uma Revisão da Bibliografia. 2014;(16):58–67.
 4. Batista D, Freitas DA, Piovesan AC, Szarf G. Surto de aspergilose pulmonar invasiva em enfermaria de transplante de medula óssea: achados tomográficos. *J Bras Pneumol.* 2009;35(9):931–6.
 5. Sales PU. Aspergilose: do diagnóstico ao tratamento. *J Bras Pneumol.* 2009;35(12):1238–44.
 6. Pauw B De, Thomas J, Walsh, Donnelly JP, Stevens D a., Edwards JE, Calandra T, et al. Revised Definitions of Invasive Fungal Disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive. *Clin Infect Dis.* 2008;46(12):1813–21.
 7. Chai LY a, De Boer MGJ, Van Der Velden WJFM, Plantinga TS, Van Spruiel AB, Jacobs C, et al. The Y238X stop codon polymorphism in the human b-glucan receptor dectin-1 and susceptibility to invasive aspergillosis. *J Infect Dis.* 2011;203:736–43.
 8. Badiee P, Alborzi A. Detection of *Aspergillus* species in bone marrow transplant patients. *J Infect Dev Ctries.* 2010;4(8):6–11.
 9. Xavier MO, Aquino VR, Severo LC, Pasqualotto AC. Galactomanana no diagnóstico de aspergilose invasiva. *Rev Bras Oncol Clínica.* 2011;7(23):41–50.
 10. Sun K-S, Tsai C-F, Chen SC-C, Chen Y-Y, Huang W-C. Galactomannan Testing and the Incidence of Invasive Pulmonary Aspergillosis: A 10-Year Nationwide Population-Based Study in Taiwan. *PLoS One [Internet].* 2016;11(2):e0149964.
 11. Pfeiffer CD, Fine JP, Safdar N. Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a meta-analysis. *ClinInfectDis [Internet].* 2006;42(1537-6591 (Electronic)):1417–27. Available from: C:\KARSTEN\PDFs\Mykologie-PDFs\Myk-2006\Pfeiffer et al.-Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay- a meta-analysis.pdf
 12. Naaraayan A, Kavian R, Lederman J, Basak P, Jesmajian S. Invasive pulmonary

- aspergillosis - case report and review of literature. *J Community Hosp Intern Med Perspect*. 2015;1:3–6.
13. Zhang S, Wang S, Wan Z, Li R, Yu J. The Diagnosis of Invasive and Noninvasive Pulmonary Aspergillosis by Serum and Bronchoalveolar Lavage Fluid Galactomannan Assay. *Biomed Res Int* [Internet]. Hindawi Publishing Corporation; 2015;2015:1–5.
 14. Bhayat F, Das-Gupta E, Hubbard R. Bone marrow transplantation in AML, and socioeconomic class: a UK population-based cohort study. *BMC Cancer* [Internet]. 2010;10:514.
 15. Shah SR, Keshri A, Patadia S, Marak RSK, Behari S. Invasive Aspergillosis of Anterior Skull Base in the Immunocompetent Host: Outcomes with a Combined Treatment Modality – An Institutional Experience. *Orig Artic*. 2017;78:89–95.
 16. Garcia-Vidal C, Upton A, Kirby KA, Marr KA. Epidemiology of Invasive Mold Infections in Allogeneic Stem Cell Transplant Recipients: Biological Risk Factors for Infection According to Time after Transplantation. *Clin Infect Dis*. 2008;47(8):1041–50.
 17. Ok M, Einsele H, Loeffler J. Genetic susceptibility to *Aspergillus fumigatus* infections. *Int J Med Microbiol* [Internet]. Elsevier GmbH.; 2011;301(5):445–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2011.04.013>
 18. Sherif R, Segal BH. Pulmonary Aspergillosis: clinical presentation, diagnostic tests, management and complications. *Curr Opin Pulm Med*. 2010;16(3):242–50.
 19. Bassetti M, Garnacho-Montero J, Calandra T, Kullberg B, Dimopoulos G, Azoulay E, et al. Intensive care medicine research agenda on invasive fungal infection in critically ill patients. *Intensive Care Med* [Internet]. Springer Berlin Heidelberg; 2017;
 20. Metan G, Keklik M, Dinç G, Pala Ç, Yıldırım A, Saraymen B, et al. Performance of Galactomannan Antigen, Beta-d-Glucan, and *Aspergillus*-Lateral-Flow Device for the Diagnosis of Invasive Aspergillosis. *Indian J Hematol Blood Transfus*. 2016;1–6.
 21. Chen K, Wang Q, Pleasants RA, Ge L, Liu W, Peng K, et al. Empiric treatment against invasive fungal diseases in febrile neutropenic patients: a systematic review and network meta-analysis. *BMC Infect Dis* [Internet]. BMC Infectious Diseases; 2017;17(1):159.

CONCLUSÃO

Ao considerarmos a alta taxa de mortalidade causada pelo desenvolvimento da AI e que a realização de uma terapia precoce promove uma significativa melhora do prognóstico dos paciente, os resultados encontrados nesse trabalho nos permite propor que a detecção de GM realizada como acompanhamento de pacientes com alto risco de desenvolver a doença como forma preventiva, pode ser considerada um método eficaz para auxiliar na identificação de Aspergilose Invasiva.

Além disso, de acordo com estudos já publicados há uma associação significativa de polimorfismos genéticos com a AI. Porém, estudos mais amplos e em maior número, visando cada um dos SNPs apresentados, devem ser realizados para uma melhor avaliação e consequentemente a obtenção de resultados mais fidedignos.

De modo geral, a realização deste estudo se faz de extrema importância auxiliando na busca de maiores conhecimentos que envolvem a gênese da Aspergilose, porém mais estudos como este, no serviço de hematologia do Hospital Araújo Jorge, no estado de Goiás e região, são necessários para o enriquecimento dos dados epidemiológicos da AI utilizando o imunoensaio de detecção de galactomanana ou também a realização, nesta população, de ensaios moleculares que contribuiriam com conhecimentos genéticos a cerca doença, já que não foi encontrado nenhum trabalho na literatura que relate a associação entre polimorfismos genéticos e a susceptibilidade à AI, no Brasil. Uma vez que a população brasileira é bastante heterogênea, estudos desse tipo se fazem necessários para que se possa comparar os resultados obtidos com os resultados de estudos já realizados em outros países e aplicar tal conhecimento em nossa população, de acordo com suas características genéticas.

REFERÊNCIAS

1. Lamoth F, Rubino I, Bochud P-Y. Immunogenetics of invasive aspergillosis. *Med Mycol*. 2011;49 Suppl 1(April):S125–36.
2. Van der Velden WJFM, Blijlevens NM a., Donnelly JP. Genetic variants and the risk for invasive mould disease in immunocompromised hematology patients. *Curr Opin Infect Dis*. 2011;24:554–63.
3. Mota FB. Diagnóstico da Aspergilose Invasiva: uma Revisão da Bibliografia. *NewsLab*. 2014;(16):58–67.
4. Batista D, Freitas DA, Piovesan AC, Szarf G. Surto de aspergilose pulmonar invasiva em enfermaria de transplante de medula óssea: achados tomográficos. *J Bras Pneumol*. 2009;35(9):931–6.
5. Sales PU. Aspergilose: do diagnóstico ao tratamento. *J Bras Pneumol*. 2009;35(12):1238–44.
6. Pauw B De, Thomas J, Walsh, Donnelly JP, Stevens D a., Edwards JE, Calandra T, et al. Revised Definitions of Invasive Fungal Disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive. *Clin Infect Dis*. 2008;46(12):1813–21.
7. Smith NLD, Hankinson J, Simpson A, Denning DW, Bowyer P. Reduced expression of TLR3, TLR10 and TREM1 by human macrophages in Chronic cavitary pulmonary aspergillosis, and novel associations of VEGFA, DENND1B and PLAT. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. European Society of Clinical Infectious Diseases; 2014;20(11):O960–8.
8. Carvalho A, Luca A De, Bozza S, Cunha C, Angelo CD, Perruccio K, et al. T-cell responses to *Aspergillus fumigatus* in hematopoietic transplanted patients TLR3 essentially promotes protective class I – restricted memory CD8 2 T-cell responses to *Aspergillus fumigatus* in hematopoietic transplanted patients. 2012;119(4):967–77.
9. Carvalho A, Pasqualotto AC, Pitzurra L, Romani L, Denning DW, Rodrigues F. Polymorphisms in toll-like receptor genes and susceptibility to pulmonary aspergillosis. *J Infect Dis*. 2008;197:618–21.

10. de Boer MGJ, Jolink H, Halkes CJM, van der Heiden PLJ, Kremer D, Falkenburg JHF, et al. Influence of polymorphisms in innate immunity genes on susceptibility to invasive aspergillosis after stem cell transplantation. *PLoS One*. 2011;6(4):2–7.
11. Grube M, Loeffler F, Mezger M, Krüger K, Echtenacher B, Hoffmann P, et al. TLR5 stop codon polymorphism is associated with invasive aspergillosis after allogeneic stem cell transplantation. *Med Mycol*. 2013;51(8):818–25.
12. Cunha C, Di Ianni M, Bozza S, Giovannini G, Zagarella S, Zelante T, et al. Dectin-1 Y238X polymorphism associates with susceptibility to invasive aspergillosis in hematopoietic transplantation through impairment of both recipient- and donor-dependent mechanisms of antifungal immunity. *Blood*. 2010;116:5394–402.
13. Chai LY a, De Boer MGJ, Van Der Velden WJFM, Plantinga TS, Van Sriel AB, Jacobs C, et al. The Y238X stop codon polymorphism in the human b-glucan receptor dectin-1 and susceptibility to invasive aspergillosis. *J Infect Dis*. 2011;203:736–43.
14. Sainz J, Lupiáñez CB, Segura-Catena J, Vazquez L, Ríos R, Oyonarte S, et al. Dectin-1 and DC-SIGN polymorphisms associated with invasive pulmonary aspergillosis infection. *PLoS One*. 2012;7(2):1–10.
15. Zhang S, Wang S, Wan Z, Li R, Yu J. The Diagnosis of Invasive and Noninvasive Pulmonary Aspergillosis by Serum and Bronchoalveolar Lavage Fluid Galactomannan Assay. *Biomed Res Int [Internet]*. Hindawi Publishing Corporation; 2015;2015:1–5.
16. Obeng AO, Egelund EF, Alsultan A, Peloquin C a., Johnson J a. CYP2C19 polymorphisms and therapeutic drug monitoring of voriconazole: Are we ready for clinical implementation of pharmacogenomics? *Pharmacotherapy*. 2014;34(7):703–18.
17. Badiee P, Alborzi A. Detection of *Aspergillus* species in bone marrow transplant patients. *J Infect Dev Ctries*. 2010;4(8):6–11.
18. Xavier MO, Aquino VR, Severo LC, Pasqualotto AC. Galactomanana no diagnóstico de aspergilose invasiva. *Rev Bras Oncol Clínica*. 2011;7(23):41–50.
19. Sherif R, Segal BH. Pulmonary Aspergillosis: clinical presentation, diagnostic tests, management and complications. *Curr Opin Pulm Med*. 2010;16(3):242–50.

20. Pfeiffer CD, Fine JP, Safdar N. Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a meta-analysis. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2006;42(1537-6591 (Electronic)):1417–27. Available from: C:\KARSTEN\PDFs\Mykologie-PDFs\Myk-2006\Pfeiffer et al.-Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay- a meta-analysis.pdf
21. Sun K-S, Tsai C-F, Chen SC-C, Chen Y-Y, Huang W-C. Galactomannan Testing and the Incidence of Invasive Pulmonary Aspergillosis: A 10-Year Nationwide Population-Based Study in Taiwan. *PLoS One* [Internet]. 2016;11(2):e0149964.
22. Naaraayan A, Kavian R, Lederman J, Basak P, Jesmajian S. Invasive pulmonary aspergillosis - case report and review of literature. *J Community Hosp Intern Med Perspect*. 2015;1:3–6.
23. Frédéric L, Pierre-yves B. Aspergillose invasive Perspectives en infectiologie préventive. *Nouvelles*. 2009;25(8-9):669–72.
24. Park SJ, Mehrad B. Innate immunity to *Aspergillus* species. *Clin Microbiol Rev*. 2009;22(4):535–51.
25. Steele C, Rapaka RR, Metz A, Pop SM, Williams DL, Gordon S, et al. The beta-glucan receptor dectin-1 recognizes specific morphologies of *aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathog*. 2005;1(4):0323–34.
26. Lamoth F, Bochud P. [Preventing invasive aspergillosis in hematopoietic stem cells transplant recipients]. *Med Sci (Paris)* [Internet]. 2009;25:669–72.
27. Cunha C, Rodrigues F, Zelante T, Aversa F, Romani L, Carvalho A. Genetic susceptibility to aspergillosis in allogeneic stem-cell transplantation. *Med Mycol* [Internet]. 2011;49 Suppl 1:S137–43.
28. Mezger M, Einsele H, Loeffler J. Genetic susceptibility to infections with *Aspergillus fumigatus*. *Crit Rev Microbiol*. 2010;36(December 2009):168–77.
29. Kumagai Y, Akira S. Identification and functions of pattern-recognition receptors. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2010;125(5):985–92.
30. Takeuchi O, Akira S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* [Internet]. Elsevier Inc.; 2010;140(6):805–20.

31. Pamer EG. TLR polymorphisms and the risk of invasive fungal infections. *N Engl J Med* [Internet]. 2008;359(17):1836–8.
32. Ferwerda B, Ferwerda G, Platinga TS, Wilment JA, Spriel AB van, Venselaar H, et al. Human Dectin-1 Deficiency and Mucocutaneous Fungal Infections. *N Engl J Med*. 2009;361(18):1760–7.
33. Werner JL, Metz AE, Horn D, Schoeb TR, Hewitt MM, Schwiebert LM, et al. Requisite role for the dectin-1 beta-glucan receptor in pulmonary defense against *Aspergillus fumigatus*. *J Immunol*. 2009;182(8):4938–46.
34. Gessner M a., Werner JL, Lilly LM, Nelson MP, Metz AE, Dunaway CW, et al. Dectin-1-dependent interleukin-22 contributes to early innate lung defense against *aspergillus fumigatus*. *Infect Immun*. 2012;80(1):410–7.
35. Taylor PR, Roy S, Jr SML, Sun Y, Howell SJ, Brian A, et al. Autocrine IL-17A–IL-17RC neutrophil activation in fungal infections is regulated by IL-6, IL-23, ROR γ t and Dectin-2. *NAt Immunol*. 2014;15(2):143–51.
36. Werner JL, Gessner M a., Lilly LM, Nelson MP, Metz AE, Horn D, et al. Neutrophils produce interleukin 17A (IL-17A) in a Dectin-1- and IL-23-dependent manner during invasive fungal infection. *Infect Immun*. 2011;79(10):3966–77.
37. Muñoz P, Guinea J, Bouza E. Update on invasive aspergillosis: clinical and diagnostic aspects. *ClinMicrobiolInfect* [Internet]. 2006;12(7):24–39.
38. Godet C, Laurent F, Bergeron A, Ingrand P, Beigelman-Aubry C, Camara B, et al. Computed Tomography Assessment of Response to Treatment in Chronic Pulmonary Aspergillosis. *Chest* [Internet]. 2016;
39. Walsh TJ, Anaissie EJ, Denning DW, Herbrecht R, Kontoyiannis DP, Marr K a., et al. Treatment of aspergillosis: Clinical practice guidelines of the infectious diseases society of America. *Clin Infect Dis*. 2008;46(3):327–60.
40. Chen K, Wang Q, Pleasants RA, Ge L, Liu W, Peng K, et al. Empiric treatment against invasive fungal diseases in febrile neutropenic patients: a systematic review and network meta-analysis. *BMC Infect Dis* [Internet]. *BMC Infectious Diseases*; 2017;17(1):159.
41. Pigatto MC, De F, Uchoa T, Dalla Costa T. Farmacocinética dos novos antifúngicos de

- uso sistêmico utilizados em pacientes imunocomprometidos Pharmacokinetics of new systemic antifungal drugs used in immunocompromised patients. *Rev Bras Farm.* 2009;90(901):86–94.
42. Caratachea MAC. Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones. *Rev del Inst Nac Enfermedades Respir.* 2007;20(3):213–21.
 43. Collins FS, Guyer MS, Chakravarti A. Variations on a theme: cataloging human DNA sequence variation. *Science* (80-) [Internet]. 1997;278(November):1580–1.
 44. Cargill M, Altshuler D, Ireland J, Sklar P, Ardlie K, Patil N, et al. Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nat Genet.* 1999;22(3):231–8.
 45. Botstein D, Risch N. Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. *Nat Genet* [Internet]. 2003;33 Suppl(march):228–37.
 46. Lin Y-T, Verma A, Hodgkinson CP. Toll-like receptors and human disease: lessons from single nucleotide polymorphisms. *Curr Genomics* [Internet]. 2012;13:633–45.

ANEXOS

Anexo 1 Parecer do Comitê de Ética



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Associação entre polimorfismos de base única (SNP) dos genes que codificam os receptores celulares Dectina-1 e TLR5 e suscetibilidade à aspergilose invasiva

Pesquisador: Antonio Márcio Cordeiro

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 45376215.0.0000.0037

Instituição Proponente: Pontifícia Universidade Católica de Goiás - PUC/Goiás

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.254.527

Apresentação do Projeto:

Trata-se de emenda com a finalidade de acrescentar membros a equipe de pesquisa.

Objetivo da Pesquisa:

Trata-se de emenda com a finalidade de acrescentar membros a equipe de pesquisa.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Trata-se de emenda com a finalidade de acrescentar membros a equipe de pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de emenda com a finalidade de acrescentar membros a equipe de pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Trata-se de emenda com a finalidade de acrescentar membros a equipe de pesquisa.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Emenda aprovada.

Considerações Finais a critério do CEP:

A aprovação deste, conferida pelo CEP, não isenta o Pesquisador de prestar satisfação sobre sua Pesquisa em casos de alteração de amostra ou centros de coparticipação. O pesquisador

Endereço: Av. Universitária, N.º 1.069
Bairro: Setor Universitário **CEP:** 74.605-010
UF: GO **Município:** GOIANIA
Telefone: (62)3946-1512 **Fax:** (62)3946-1070 **E-mail:** cep@pucgoias.edu.br



Continuação do Parecer: 1.254.527

responsável deverá encaminhar ao CEP/PUC Goiás, via Plataforma Brasil, relatórios semestrais do andamento do protocolo aprovado, quando do encerramento, as conclusões e publicações.

O CEP PUC Goiás poderá realizar escolhas aleatórias de protocolos de pesquisa aprovados para verificar o cumprimento da Resolução CNS 466/12 e complementares.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_599756 E1.pdf	30/09/2015 16:15:02		Aceito
Outros	Curriculo_Mariana_de_Oliveira_Inocente Aidar.pdf	30/09/2015 16:10:14	Antonio Márcio Cordeiro	Aceito
Outros	Curriculo_Laura_Pazinato_Ritter.pdf	30/09/2015 16:09:04	Antonio Márcio Cordeiro	Aceito
Outros	RESPOSTAS AS PENDÊNCIAS.pdf	17/06/2015 16:42:21		Aceito
Outros	TERMO DE ASSENTIMENTO- III.pdf	17/06/2015 16:41:42		Aceito
Outros	TERMO DE ASSENTIMENTO- II.pdf	17/06/2015 16:41:21		Aceito
Outros	TERMO DE ASSENTIMENTO- I.pdf	17/06/2015 16:41:00		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.pdf	17/06/2015 16:40:40		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO- RESPONSÁVEL.pdf	17/06/2015 16:39:59		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto Detalhado.pdf	17/06/2015 16:39:29		Aceito
Folha de Rosto	Folha de Rosto.pdf	22/05/2015 10:02:10		Aceito
Outros	Informações sobre a finalidade da pesquisa.pdf	22/05/2015 09:57:28		Aceito
Outros	Informações sobre o TCLE.pdf	22/05/2015 09:57:00		Aceito
Outros	FUNÇÕES ESPECÍFICAS DE CADA PARTICIPANTE DO PROJETO.pdf	22/05/2015 09:56:21		Aceito

Endereço: Av. Universitária, N.º 1.069

Bairro: Setor Universitário

CEP: 74.605-010

UF: GO

Município: GOIANIA

Telefone: (62)3946-1512

Fax: (62)3946-1070

E-mail: cep@pucgoias.edu.br



Continuação do Parecer: 1.254.527

Outros	Currículo do Sistema de Currículos Lattes (Vera Aparecida Saddi).pdf	20/05/2015 10:35:45		Aceito
Outros	Currículo do Sistema de Currículos Lattes (Hellen da Silva Cintra de Paula).pdf	20/05/2015 10:35:30		Aceito
Outros	Currículo do Sistema de Currículos Lattes (Daiane de Oliveira Cunha).pdf	20/05/2015 10:35:18		Aceito
Outros	Currículo do Sistema de Currículos Lattes (Cesar Augusto Sam Tiago Vilanova-Costa).pdf	20/05/2015 10:34:53		Aceito
Outros	Currículo do Sistema de Currículos Lattes (Adriano de Moraes Arantes).pdf	20/05/2015 10:34:39		Aceito
Outros	Currículo do Sistema de Currículos Lattes (Antonio Márcio Teodoro Cordeiro Silva).pdf	20/05/2015 10:34:27		Aceito
Outros	Registro do projeto no IEP.pdf	20/05/2015 10:31:57		Aceito
Outros	Termo de Garantia Assinado.pdf	20/05/2015 10:31:06		Aceito
Outros	Autorização do Diretor Técnico da ACCG.pdf	20/05/2015 10:30:32		Aceito
Outros	Assinatura dos Participantes.pdf	20/05/2015 10:29:34		Aceito
Outros	Autorização Chefia Laboratório de Oncogenética.pdf	20/05/2015 10:28:40		Aceito
Outros	Solicitação de autorização à Chefia do Laboratório de Oncogenética.pdf	20/05/2015 10:28:17		Aceito
Outros	Autorização chefia do setor de Hematologia.pdf	20/05/2015 10:27:38		Aceito
Outros	Solicitação ao chefe da Hematologia.pdf	20/05/2015 10:27:20		Aceito
Outros	Declaração de Compromisso do Pesquisador.pdf	20/05/2015 10:25:25		Aceito
Outros	Declaração do pesquisador se comprometendo a não iniciar a pesquisa antes de parecer do CEP.pdf	20/05/2015 10:25:14		Aceito
Outros	Declaração de Instituição co-participante.pdf	20/05/2015 10:25:01		Aceito
Outros	Carta de Encaminhamento ao CEP ACCG.pdf	20/05/2015 10:24:05		Aceito
Outros	Carta de Solicitação de autorização ao Chefe do Setor de Arquivo.pdf	20/05/2015 10:23:27		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto final.pdf	20/05/2015 10:22:32		Aceito

Endereço: Av. Universitária, N.º 1.069

Bairro: Setor Universitário

CEP: 74.605-010

UF: GO

Município: GOIANIA

Telefone: (62)3946-1512

Fax: (62)3946-1070

E-mail: cep@pucgoias.edu.br



Continuação do Parecer: 1.254.527

Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorização arquivo médico.pdf	20/05/2015 10:21:16		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	20/05/2015 10:20:53		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

GOIANIA, 01 de Outubro de 2015

Assinado por:
NELSON JORGE DA SILVA JR.
(Coordenador)

Endereço: Av. Universitária, N.º 1.069
Bairro: Setor Universitário **CEP:** 74.605-010
UF: GO **Município:** GOIANIA
Telefone: (62)3946-1512 **Fax:** (62)3946-1070 **E-mail:** cep@pucgoias.edu.br

Anexo 2 Formulário dos Pacientes

FORMULÁRIO DO PACIENTE LABORATÓRIO DE ONCOGENÉTICA E RADIOBIOLOGIA DO HOSPITAL ARAÚJO JORGE

1) Dados do Paciente

Nº do Paciente

NOME: _____

PRONTUÁRIO: _____ IDADE: _____ SEXO: _____

DIAGNÓSTICO PRINCIPAL: _____

DATA DE NASCIMENTO: _____ ÓBITO/CAUSA: _____

DATA DO TRANSPLANTE: _____ TIPO DO TRANSPLANTE: _____

DOENÇA HEMATOLÓGICA MALÍGNA: _____ HIV POSITIVO: _____

2) Informações Teste Galactomanana

Nº DA AMOSTRA: _____

AMOSTRA SERIADA: _____ DATA DO EXAME: _____

NEUTROPENIA: LEVE () MODERADA () GRAVE ()

RESULTADO QUANTI: _____ RESULTADO QUALI: _____

Hemograma

Data da Coleta:	Hb:	Gb:	Baso:	Bast:
Seg:	Eos:	Linf:	Mono:	Plaq:

Nº DA AMOSTRA: _____

AMOSTRA SERIADA: _____ DATA DO EXAME: _____

NEUTROPENIA: LEVE () MODERADA () GRAVE ()

RESULTADO QUANTI: _____ RESULTADO QUALI: _____

Hemograma

Data da Coleta:	Hb:	Gb:	Baso:	Bast:
Seg:	Eos:	Linf:	Mono:	Plaq:

N° DA AMOSTRA: _____

AMOSTRA SERIADA: _____ DATA DO EXAME: _____

NEUTROPENIA: LEVE () MODERADA () GRAVE ()

RESULTADO QUANTI: _____ RESULTADO QUALI: _____

Hemograma

Data da Coleta:	Hb:	Gb:	Baso:	Bast:
Seg:	Eos:	Linf:	Mono:	Plaq:

N° DA AMOSTRA: _____

AMOSTRA SERIADA: _____ DATA DO EXAME: _____

NEUTROPENIA: LEVE () MODERADA () GRAVE ()

RESULTADO QUANTI: _____ RESULTADO QUALI: _____

Hemograma

Data da Coleta:	Hb:	Gb:	Baso:	Bast:
Seg:	Eos:	Linf:	Mono:	Plaq:

N° DA AMOSTRA: _____

AMOSTRA SERIADA: _____ DATA DO EXAME: _____

NEUTROPENIA: LEVE () MODERADA () GRAVE ()

RESULTADO QUANTI: _____ RESULTADO QUALI: _____

Hemograma

Data da Coleta:	Hb:	Gb:	Baso:	Bast:
Seg:	Eos:	Linf:	Mono:	Plaq:

3) Exames Complementares

CULTURA:	TOMOGRAGIA DE TÓRAX:
-----------------	-----------------------------

4) Fármacos utilizados

ANTIFÚNGICOS	ANTIBIÓTICOS E ANTIVIRAIS
Fluconazol () Anfotericina B () Voriconazol () Caspofungina () Nenhum () Outros () Qual? _____	Vancomicina () Aciclovir () Bactrim () Cefepime () Meropenem () Nenhum () Outros () Qual? _____
DROGAS IMUNOSSUPRESSORAS SIM () NÃO ()	USO PROLONGADO DE CORTICOSTEROIDES SIM () NÃO ()

5) Informações adicionais
