

Asma ocupacional na indústria da cortiça. À procura de uma etiologia.

Prof. Dr. L Delgado¹, Dr. JC Winck², Eng.^a R Murta³, Dr.^a M Vanzeller⁴

¹ Serviço de Imunologia, Faculdade de Medicina da Universidade do Porto
(Director: Prof. Dr. Fleming Torrinha)

² Serviço de Pneumologia, Faculdade de Medicina da Universidade do Porto
(Director: Prof. Dr. Agostinho Marques)

³ Amerlab, Portugal

⁴ Consulta de Doenças Pulmonares de Causa Inalatória, Centro Hospitalar de Gaia
(Director: Dr. José Manuel Sapage)

Resumo

A Suberose é uma doença ocupacional dos trabalhadores da indústria de transformação da cortiça, associada à exposição repetida a poeiras de cortiça bolorenta, apresentando-se habitualmente como uma doença do interstício pulmonar (Alveolite Alérgica Extrínseca). Contudo, o envolvimento das vias aéreas, presente nalguns casos, torna a abordagem diagnóstica complexa. Neste contexto, a monitorização dos débitos expiratórios máximos instantâneos (DEMI) e o estudo dos perfis celulares do líquido de lavagem broncoalveolar (LLBA) podem ser úteis para caracterizar a asma ocupacional. Tal como noutras formas de asma ocupacional, a sensibilização a fungos pode ter um papel na etiopatogenia da asma brônquica dos corticeiros.

Objectivos: estudar doentes com sintomas de asma brônquica relacionados com a exposição na indústria da cortiça, avaliando os registos de DEMI seriados e a inflamação broncoalveolar. Além disso, nos doentes com o diagnóstico de asma ocupacional, investigámos a presença de atopia e a possível sensibilização IgE à *Chrysonilia sitophila*, *Penicillium glabrum*, e *Thricoderma longibrachiatum*, os fungos que mais frequentemente colonizam a cortiça durante o seu processamento industrial.

Doentes e métodos: estudámos 14 corticeiros com sintomas de asma brônquica, agravando no local de trabalho, através da realização de registo de DEMI seriado e análise dos perfis celulares do LLBA. De acordo com a inspecção visual do registo de DEMI, os doentes foram classificados como asma ocupacional (AO) e asma não ocupacional (ANO) comparando-se a inflamação broncoalveolar, atopia e a sensibilização a fungos entre os dois grupos. Os testes cutâneos de tipo «prick» (CBF Letí) incluíram uma bateria de alérgenos ambientais comuns (ácaros domésticos, pólenes, epitélios e ácaros de armazenamento) e extractos glicero-salinos de culturas fúngicas obtidas do ambiente industrial. Como grupo controlo para os testes cutâneos «prick» também foram estudados 18 doentes com asma e/ou rinite sem exposição na indústria da cortiça. Foram pesquisados anticorpos específicos IgE e IgG4 para os 3 tipos de fungos por *immunoblotting* (AlaSTAT-AlaBlot System, DPC).

Resultados: registos de DEMI positivos ocorreram em 7 casos (AO), enquanto 7 registos de DEMI foram negativos (ANO). Não houve diferenças na idade, função pulmonar (Volume Expiratório Máximo no 1º Segundo %, Volume residual %), hiperreactividade brônquica inespecífica,

tempo de exposição e atopia entre os dois grupos de doentes. Contudo os doentes com asma ocupacional tinham maior eosinofilia do LLBA que os doentes com ANO ($1.9\pm 2.6\%$ versus $0.2\pm 0.3\%$; $p < 0.05$, teste de Wilcoxon). Testes cutâneos positivos (diâmetro médio da pápula ³ histamina) a alérgenos ambientais comuns estavam presentes em 2/10 doentes com exposição ocupacional e 7/18 do grupo controlo. Além disso 2/5 dos doentes com AO e 7/18 dos controlos tinham sensibilização a ácaros de armazenamento. Enquanto um doente atópico do grupo controlo tinha testes cutâneos positivos para dois dos fungos testados, todos os doentes com AO e ANO tinham testes negativos. Os resultados do *imunoblotting* confirmaram a ausência de sensibilização IgE a estes fungos nos doentes com asma brônquica e exposição ocupacional, mesmo naqueles que mostraram alguma resposta no isotipo IgG4.

Conclusões: A asma ocupacional dos trabalhadores da indústria da cortiça, demonstrada por oscilações significativas do DEMI, está associada a inflamação pulmonar eosinofílica, tal como tem sido descrito noutras formas de asma ocupacional. A atopia não parece caracterizar a asma brônquica dos corticeiros, mas nalguns casos a sensibilização a ácaros de armazenamento pode estar implicada. Apesar de neste ambiente ocupacional ocorrer exposição prolongada a esporos fúngicos não encontramos sensibilização IgE aos três fungos mais prevalentes, quer por métodos *in vivo* quer *in vitro*.

Palavras-chave: Asma Ocupacional, Suberose, DEMI, Alergia a Fungos, Lavagem Broncoalveolar

Abstract

Suberosis is an occupational lung disease of cork workers associated with repeated exposure to mouldy cork dust in the cork industry, usually presenting as an interstitial lung disorder (Extrinsic Allergic Alveolitis). However, airway involvement, present in some cases, makes the diagnostic approach complex. In this setting, serial Peak Expiratory Flow (PEF) measurements and bronchoalveolar fluid cellular profiles may be useful to characterize occupational asthma. Like other forms of occupational asthma, fungal sensitization can play a role in cork worker's asthma pathogenesis.

Aims: *to investigate patients with cork work-related asthma, evaluating serial PEF rates and bronchoalveolar inflammation. Furthermore, in patients with the diagnosis of occupational asthma, to investigate the presence of atopy and IgE sensitization to Chrysonilia sitophila, Penicillium glabrum, and Thricoderma longibrachiatum, the most predominant moulds colonizing cork during its industrial processing.*

Patients and methods: *we studied 14 cork workers with asthma symptoms, which worsened at work, by serial PEF rates monitoring and bronchoalveolar fluid cellular profiles. After visual analysis of PEF recordings patients were classified as occupational (OA) and non-occupational asthma (NOA) and compared for bronchoalveolar inflammation, atopy and mould sensitization. Skin «prick» tests (CBF Leti) were performed with a battery of common allergens (house dust mites, pollens, epithelia and storage mites) and with glycerol-saline extracts of isolated fungal cultures of moulds obtained in the industrial environment. As a control group for skin prick tests we also studied 18 unexposed patients with asthma and/or rhinitis. Specific IgE and IgG4 antibodies for the three different moulds were also searched by immunoblotting (AlaSTAT-AlaBlot System, DPC).*

Results: *positive PEF monitoring occurred in 7 cases (OA), and in another 7 PEF records were negative (NOA). There were no differences in age, lung function (Forced Expiratory Volume 1%, Residual Volume %), bronchial hyperresponsiveness, years of exposure, and atopy between the two patients groups. However, patients with work-related asthma had higher BAL eosinophil counts than NOA ($1.9\pm 2.6\%$ versus $0.2\pm 0.3\%$, $p < 0.05$, Wilcoxon test). Positive skin «prick» tests (mean diameter of the wheal and flare ³ histamine) to common allergens were present in 2/10 patients with occupational exposure and 7/18 of the control group. Moreover 2/5 of patients with OA and 7/18 of controls had sensitization to storage mites. While one atopic patient from the control group had positive skin «prick» tests in two of the tested fungi, all patients with OA and NOA had negative tests. Immunoblot-*

ting results confirmed the absence of IgE sensitization to these moulds in patients with asthma and occupational exposure, even in patients that showed an antibody response in the IgG4 isotype.

Conclusions: cork worker's occupational asthma, demonstrated by work related changes in serial PEF recordings, is associated with eosinophilic lung inflammation as described in other forms of occupational asthma. Atopy does not seem to characterize cork worker's asthma but in some cases sensitization to storage mites may be implicated. In spite of a long standing exposure to mould spores in this occupational environment, we could not find evidence of IgE sensitization to the three most prevalent fungi by both in vivo and in vitro methods.

Key words: occupational asthma, Suberosis, PEF, mould allergy, bronchoalveolar lavage

O trabalho na indústria da cortiça apresenta um risco particular de doença pulmonar ocupacional (Suberose) devido à exposição e inalação crónica de partículas de cortiça bolorenta. Habitualmente manifesta-se como uma patologia pulmonar intersticial¹ - Alveolite Alérgica Extrínseca (AAE) — com uma alveolite linfocítica no líquido de lavagem broncoalveolar (LLBA)² e a presença, quer no soro quer no LLBA, de anticorpos IgG específicos para o *Penicillium glabrum* (inicialmente designado *Penicillium frequentans*), um fungo que frequentemente coloniza a cortiça³.

No entanto, é também possível observar alguns trabalhadores com queixas de asma brônquica, referindo agravamento no trabalho¹, aparentemente sem evidência de sensibilização alérgica ao *Penicillium glabrum*, quando estudados por métodos laboratoriais^{3,4}. Nestes casos, a avaliação dos registos seriados dos débitos expiratórios máximos instantâneos (DEMI), em trabalho e em afastamento, é um método valioso para a identificação da natureza ocupacional da asma⁵. Apesar de assim ser possível objectivar e reconhecer a asma ocupacional dos corticeiros, a sua etiopatogenia não está ainda cabalmente esclarecida.

Descrições recentes de casos de asma brônquica em ambientes tradicionalmente associados às

AAE, como os criadores de aves e os fazendeiros^{6,7}, realçam a importância de uma melhor caracterização do envolvimento das vias aéreas nestes doentes. Além disso, provas inalatórias realizadas com extractos de *Penicillium*, descritas nas publicações iniciais da Suberose, revelaram respostas brônquicas e intersticiais nos mesmos doentes, tornando o diagnóstico de asma ocupacional difícil de estabelecer por esse método⁸. A estas dificuldades acrescem as inerentes à normalização do material antigénico para essas provocações inalatórias. A lavagem broncoalveolar é um instrumento importante no diagnóstico diferencial das doenças pulmonares intersticiais (2,9) e tem sido também largamente utilizada para investigar os mecanismos etiopatogénicos da asma brônquica¹⁰. De facto, estudos do LLBA nas asma ocupacional por isocianatos e pelo cedro vermelho, têm revelado um componente inflamatório semelhante ao da asma alérgica^{11,12}.

Trabalhos recentes têm revelado que a *Crysonilia sitophila* é um dos fungos que frequentemente contaminam a matéria prima utilizada nesta indústria¹³ e, curiosamente, este fungo tem sido também implicado nalguns casos de asma ocupacional na indústria das madeiras^{14,15}.

Assim, no sentido de clarificar a etiopatogenia

da asma ocupacional na indústria da cortiça, fomos investigar a resposta inflamatória pulmonar nestes doentes, bem como a sua possível relação com uma sensibilização alérgica mediada pela IgE, designadamente aos fungos que mais frequentemente colonizam a cortiça durante o seu processamento industrial — a *Chrysonilia sitophila*, o *Penicillium glabrum* e o *Thricoderma longibrachiatum*.

DOENTES E MÉTODOS

Estudamos catorze trabalhadores da indústria da cortiça (média de idade $42,1 \pm 8,1$ anos, 8 sexo masculino / 6 feminino), referenciados por sintomas de asma brônquica que se relacionavam com o local de trabalho.

Estudo funcional respiratório

Todos os doentes realizaram espirometria, pletismografia corporal e difusão de CO (*Erich Jaeger*). Considerou-se obstrução reversível sempre que, após um broncodilatador inalado, houvesse melhoria do VEMS superior a 15 % e excedendo 200 ml. A hiperreactividade brônquica foi medida pela histamina, usando o protocolo de *Cockroft et al*¹⁶, nos doentes com provas funcionais normais.

Para o registo seriado dos DEMI cada doente recebeu um *mini-Wright peak flow meter* com instruções detalhadas para a sua utilização. Os doentes mediram o DEMI cada duas horas, registando a melhor de três tentativas, durante pelo menos 10 dias a trabalhar e 10 dias afastados do trabalho. Os valores mínimo, máximo e médio diário foram registados num gráfico e este analisado visualmente. O registo foi considerado positivo quando pelo menos dois de três observadores experientes consideraram, sem conhecer a identificação do doente, que o gráfico de DEMI era compatível com um agravamento no trabalho⁵.

Broncofibroscopia e lavagem broncoalveolar (LBA)

A LBA foi realizado de acordo com as recomendações do *European Society of Pneumology Task Group on BAL*¹⁷. Resumidamente, após verificar a estabilidade do doente, foi ministrado oxigénio com monitorização por oximetria de pulso. A lavagem consistiu na instilação no lobo médio de quatro alíquotas de 50ml de solução salina esterilizada (a 37°C), seguida de aspiração suave com a seringa de instilação, após cada lavagem. No líquido recuperado (LLBA) foi calculado o número total de células (na câmara de *Neubauer*) e a viabilidade celular (exclusão do azul de *trypan*). As contagens diferenciais foram obtidas a partir da contagem de 500 células em preparações de citocentrífuga coradas pelo *May-Grünwald-Giemsa*. Após o LBA todos os doentes foram mantidos em vigilância cuidada para avaliar sinais de obstrução brônquica.

Testes cutâneos

Realizaram-se testes cutâneos «prick» (*CBF Leti, Madrid, Spain*) com um painel de alérgenos comuns, ácaros de armazenamento e extractos glicero-salinos de culturas de fungos isolados do meio ambiente industrial (gentilmente fornecidos pela Sr.^a Dr.^a V. San Romão, ref^a 13). Os alérgenos testados foram: *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, *Dactylis glomerata*, epitélio de gato, *Acarus Siro*, *Lepidoglyphus Destructor*, *Euroglyphus Maynei*, *Blomia Tropicalis*, *Dermatophagoides Microceras*, *Tyrophagus Putrescenciae*, *Chrysonilia sitophila*, *Penicillium glabrum* e *Thricoderma longibrachiatum*. Para estes três últimos alérgenos a preparação do extracto foi feita a partir de material liofilizado de culturas isoladas, reconstituído a uma concentração final de 2mg/ml.

Um controlo negativo (glicero-salino) e um positivo (0,1 % histamina) foram também testados. Os resultados foram considerados positivos sempre que o diâmetro médio da pápula (em mm) foi \geq controlo positivo. Para os testes cutâneos, utilizaram-se como controlos 18 doentes com asma e/ou rinite, sem exposição na indústria da cortiça e observados consecutivamente numa consulta de Imunoalergologia.

Immunoblotting

Os extractos dos fungos *Chrysonilia sitophila*, *Penicillium glabrum* e *Thricoderma longibrachiatum* foram separados, com base no seu peso molecular, por electroforese de gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e, posteriormente, transferidos para membranas de nitrocelulose. Estas membranas foram cortadas em forma de tiras, por forma a obterem-se suportes individuais de *immunoblotting* (*AlaBLOT*). A fórmula que correlaciona a distância percorrida por cada proteína na electroforese e o respectivo peso molecular é determinada pelo fabricante (*DPC - Los Angeles*), utilizando marcadores moleculares com pesos compreendidos entre 6 a 250 kDa. As tiras de *immunoblotting* de cada um dos fungos foram utilizadas para determinar o perfil de especificidade antigénica da IgE e IgG4 dos soros. Para tal, as tiras relativas a cada antígeno foram incubadas com 500 μ l de soro diluído 1:10 durante 2h. Após o período de incubação, aspirou-se o soro diluído e lavaram-se as tiras com 3 x 1 ml de solução lavagem. A cada uma foi adicionado 500 μ l de enzima marcado com um anticorpo monoclonal anti-IgE (ou anti-IgG4) que se incubou durante 30 min, com agitação à temperatura ambiente. Após este período, aspirou-se o anticorpo conjugado e lavaram-se novamente as tiras com 3 x 1 ml solução lavagem. Por último, foram incubadas com 500 μ l de substrato, durante 15 min com agitação à temperatura ambiente. Após este período, aspirou-se o substrato e lavaram-se as tiras com 3x 1 ml de

água destilada. Finalmente, secaram-se as tiras em papel absorvente e procedeu-se à leitura das mesmas por densitometria. A leitura foi efectuada com o auxílio de um *scanner* e do *software Quantiscan* (*Biosoft*) o que permite determinar o peso molecular e a intensidade das diferentes bandas antigénicas reconhecidas pelos anticorpos de cada doente. Como controlo positivo utilizou-se uma mistura de quatro soros com valores elevados de IgE específica para fungos (> 17.5 kU/L, classe 4, num painel alargado de fungos e determinada por microelisa — *AlaSTAT*) e confirmada por *AlaBLOT* pelo número de bandas elevado e de grande intensidade.

Os dados são apresentados pela média \pm desvio padrão, excepto se assinalado. Foi utilizado o teste não paramétrico de *Wilcoxon* e considerado significativo um valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Este grupo de doentes que avaliámos tinham uma história de exposição na indústria da cortiça relativamente longa (24 ± 9 anos) e em todos os sintomas se tinha desenvolvido após um período de latência igualmente longo (17 ± 2 anos). A maioria (60 %) trabalhava em brocagem ou escolha de rolhas. Quatro doentes tinham obstrução brônquica ligeira a moderada enquanto que uma hiperreactividade brônquica inespecífica significativa (PC20 histamina < 16 mg/ml) foi observada em 9 de 10 doentes testados. A capacidade de difusão foi normal em todos.

De acordo com os registos de DEMI, 7 doentes, com alterações típicas relacionadas com o trabalho, foram classificados como asma ocupacional (AO) e outros 7 como tendo asma não-ocupacional (ANO) (Fig. 1). Não encontramos diferenças significativas na idade, tempo de exposição, função pulmonar (VEMS %, VR %) e na hiperreactividade brônquica, entre asmáticos com registos de DEMI positivos ou negativos (Quadro I).

Quadro I – Características gerais, função pulmonar e hiperreactividade brônquica (HRB) nos dois grupos estudados.

	Asma ocupacional (n=7)	Asma não-ocupacional (n=7)	p
Idade	40,9 ± 8,6	44,9 ± 8,9	0,55
Exposição	20,0 ± 9,0	23,4 ± 8,9	0,35
VEMS%	99,1 ± 31,5	81,7 ± 23,6	0,89
VR%	118,6 ± 23,7	125,9 ± 52,9	0,75
HRB	5/5	4/5	n.s.

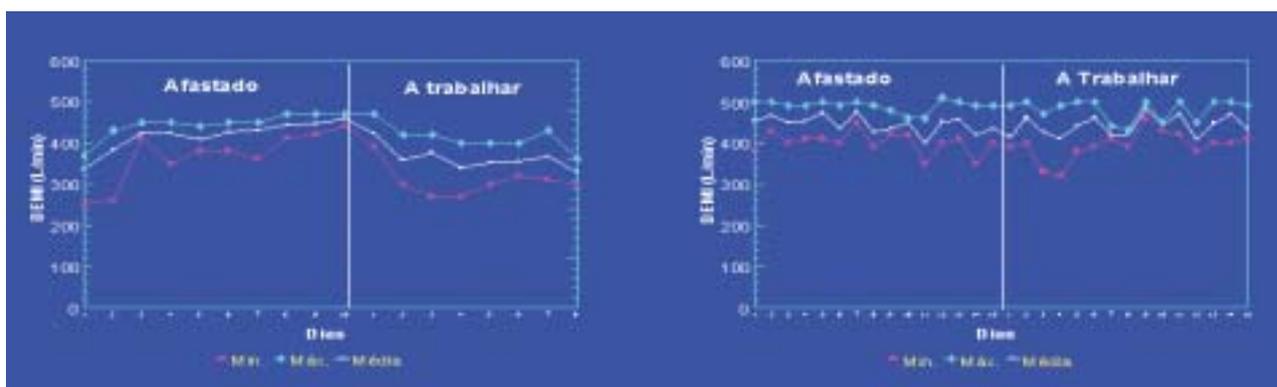


Figura 1 — Registo de DEMI seriado (valores mínimos, máximos e médios diários) . À esquerda padrão típico de Asma Ocupacional e à direita registo negativo.

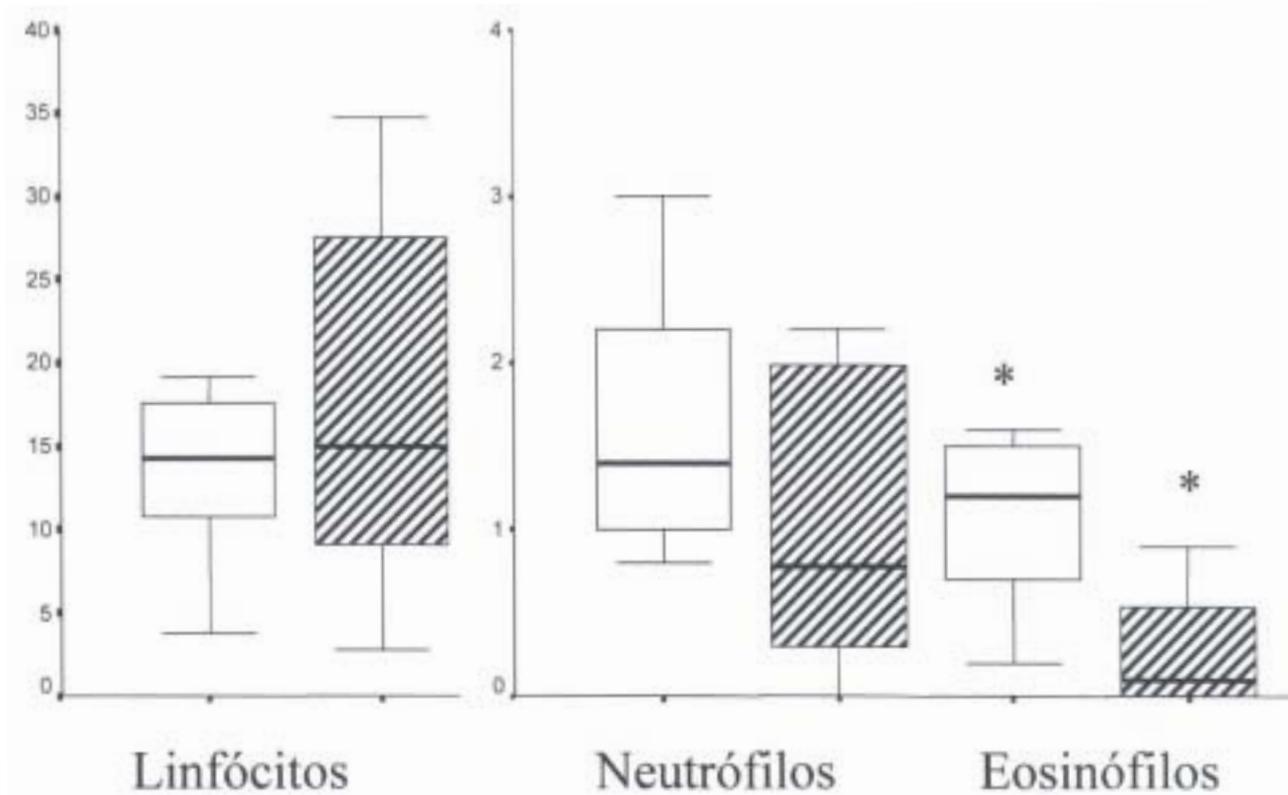


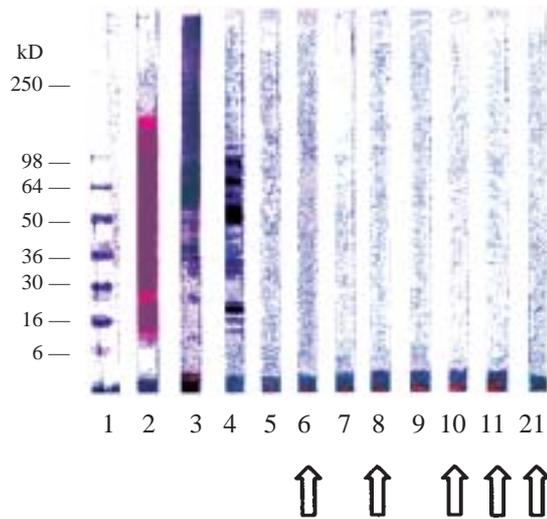
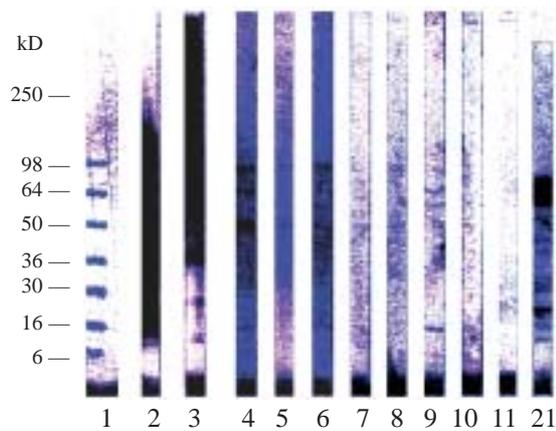
Figura 2 — Percentagem de linfócitos, neutrófilos e eosinófilos no líquido de lavagem broncoalveolar de doentes com asma ocupacional (barras brancas) e asma não ocupacional (barras listadas), * $p < 0,05$.

A broncofibroscopia foi bem tolerada por todos os doentes não tendo surgido complicações em nenhum caso. No LLBA não foram encontradas diferenças significativas na celularidade total ($1,5 \pm 1,0 \times 10^5$ cell/ml na AO e $2,3 \pm 1,0 \times 10^5$ cell/ml na ANO), sendo os macrófagos alveolares o tipo celular predominante em ambos os grupos ($79 \pm 13\%$ na AO versus $74 \pm 24\%$). A proporção de neutrófilos e de linfócitos foi também semelhante entre os dois grupos. Contudo, os doentes com asma ocupacional apresentaram no LLBA contagens de eosinófilos significativamente superiores ($1,9 \pm 2,6\%$ versus $0,2 \pm 0,3\%$, $p < 0,05$) (Fig. 2).

Testes positivos para alérgenos ambientais comuns foram encontrados em 2/10 doentes com

exposição ocupacional e em 7/18 do grupo controlo (Quadro II). Além disso 2/5 dos doentes com AO e 7/18 dos controlos estavam sensibilizados aos ácaros de armazenamento. Um doente asmático do grupo controlo, polissensibilizado, apresentou testes «prick» positivos a dois dos três fungos testados (*Chrysonilia sitophila* e *Penicillium glabrum*) que, no entanto, se revelaram negativos em todos os doentes expostos testados, quer com AO ou ANO (Quadro II)

Os resultados do *immunoblotting* confirmaram a ausência de reactividade IgE para qualquer dos três diferentes fungos e em todos os soros testados (Fig. 3). Quanto à IgG4 específica foi possível encontrar, para cada um dos três fungos, bandas de

IgE específica para *Chysonilia sitophila*IgG4 específica para *Chysonilia sitophila*

- | |
|---------------------------------|
| 1. Padrões de Peso Molecular |
| 2. Coloração Proteica |
| 3. Coloração de Carbo-hidratos |
| 4. Controlo Positivo |
| 5-21 Doentes com Asma Brônquica |
| ↑ Casos com Asma Ocupacional |

Figura 3 — Immunoblotting para pesquisa de anticorpos séricos IgE e IgG4 específicos para os fungos do ambiente ocupacional (*AlaSTAT-AlaBlot System, DPC*). Apresentam-se os resultados para a *Chrysonilia sitophila*. Ausência de sensibilização IgE nos doentes estudados, mesmo naqueles que mostraram alguma resposta IgG4.

Quadro II — Resultados dos testes cutâneos «prick». Estão assinalados o número de testes positivos (diâmetro médio, em mm, da pápula \geq ao controlo positivo) em relação ao número total testado.

	Asma Ocupacional	Asma não ocupacional	Controlos
Ácaros domésticos:			
<i>D. farinae</i>	1/5	0/5	5/18
<i>D. pteronyssinus</i>	1/5	0/5	7/18
Total:	2/5	0/5	7/18
Ácaros de armazém:			
<i>A. Siro</i>	2/5	0/5	3/18
<i>L. Destructor</i>	1/5	0/5	7/18
<i>E. Maynei</i>	1/5	0/5	6/18
<i>B. Tropicalis</i>	1/5	0/5	1/18
<i>D. Microceras</i>	1/5	0/5	5/18
<i>T. Putrescenciae</i>	2/5	0/5	3/18
Total:	2/5	0/5	7/18
Fungos:			
<i>P. Glabrum</i>	0/5	0/5	1/18
<i>C. Sitophila</i>	0/5	0/5	1/18
<i>T. Longibrachiatum</i>	0/5	0/5	0/18
Total:	0/5	0/5	1/18

reactividade em alguns doentes, quer em doentes com ou sem asma ocupacional, mas sem nenhum padrão distintivo entre eles.

DISCUSSÃO

Os trabalhadores da indústria da cortiça estão expostos à inalação de poeiras orgânicas de que

pode resultar o desenvolvimento de patologia pulmonar ocupacional — a Suberose^{1,2}. Classicamente, como noutras situações com o mesmo tipo de risco ambiental (p.ex. os criadores de aves e os fazendeiros) esta exposição leva ao aparecimento de uma doença pulmonar intersticial — a alveolite alérgica extrínseca. Contudo, tem sido cada vez mais frequente a descrição de casos de asma brônquica no mesmo tipo de ambientes ocupacionais e o seu es-

clarecimento etiológico tem levado à procura de novos antigénios, potencialmente sensibilizantes, nesses ambientes^{18,19,20}.

Neste estudo procurámos caracterizar a asma ocupacional relacionada com a exposição à poeira industrial da cortiça. Encontrámos um aumento significativo de eosinófilos no líquido de lavagem broncoalveolar, em doentes com um típico agravamento dos registos de DEMI com o trabalho. Estes achados são consistentes com outras observações na asma ocupacional, onde um aumento dos eosinófilos tem sido descrito quer no LLBA¹¹, quer no esputo induzido²¹ e mucosa brônquica^{11,22}. Estudos do LLBA e biópsias brônquicas sugerem que a inflamação eosinofílica que se associa à asma ocupacional é semelhante à da asma atópica^{11,22}.

Uma vez que a LBA recolhe células inflamatórias quer das vias aéreas quer das unidades alveolares a origem exacta do número aumentado de eosinófilos que observámos nos nossos doentes é difícil de estabelecer. No entanto, sendo a mucosa brônquica considerada o principal terreno da inflamação na asma²³, dados recentes apontam igualmente para o envolvimento da parede alveolar e das pequenas vias aéreas^{24, 25}.

Assim, a asma ocupacional dos corticeiros associa-se a inflamação eosinofílica pulmonar, tal como descrito noutras formas de asma ocupacional de diferente etiologia. Para além das diferenças no perfil celular do LLBA, não encontrámos diferenças na hiperreactividade brônquica e na atopia quando comparámos estes doentes com outros corticeiros com asma mas sem agravamento ocupacional.

A inalação de esporos fúngicos tem sido relacionada com o aparecimento de asma brônquica e hipersensibilidade mediada pela IgE^{26,27}. Os alergénios fúngicos estão também implicados como uma possível causa de asma ocupacional na indústria das madeiras^{14, 15}. Para além do *Penicillium glabrum* — o principal fungo identificado nas descrições iniciais da Suberose — a *Chrysonilia*

sitophila tem sido também isolada ao longo de todo o processo de manufactura da cortiça¹³ e, assim, tal como nas serrações que lidam com madeiras humedecidas¹⁴, poderia ser uma das causas de asma ocupacional na indústria da cortiça. Tanto mais que os esporos da *Chrysonilia sitophila* são de maiores dimensões que os do *Penicillium glabrum* (V. San Romão, comunicação pessoal), o que poderia também suportar a hipótese de estarem na origem de doença pulmonar das vias aéreas, em contraste com a doença intersticial associada à inalação e sensibilização aos esporos mais pequenos do *Penicillium glabrum*.

No entanto, neste estudo, utilizando testes sensíveis (*prick* e *immunoblotting*) para a detecção de anticorpos IgE específicos para a *Chrysonilia sitophila*, *Penicillium glabrum* e o *Thricoderma longibrachiatum*, não encontrámos evidência de sensibilização alérgica nos doentes com asma ocupacional na indústria da cortiça. Apesar do número limitado de doentes que estudámos, estes resultados estão de acordo com resultados anteriores que não revelaram a presença de IgE para o *Penicillium glabrum* por outro método laboratorial³, sugerindo que a alergia a fungos mediada pela IgE não é um factor etiológico na asma dos corticeiros. Apesar de alguns doentes apresentarem IgG4 específica para alguns antigénios fúngicos, a presença destes anticorpos não permitiu igualmente diferenciar as duas populações (AO e ANO) e estará possivelmente relacionada com uma longa exposição a esses antigénios.

O achado de dois casos de asma ocupacional com testes cutâneos positivos ao ácaros de armazenamento (*Acarus Siro* e *Tirophagus Putrescenciae*) sugere que esta sensibilização pode participar no desencadear de sintomas brônquicos nalguns destes doentes, como acontece aliás noutras formas de asma ocupacional^{20, 26,27}. De facto, condições de humidade²⁸ nas fábricas de cortiça poderão favorecer o crescimento destes ácaros e facilitar a sensibilização destes trabalhadores, o que deverá ser ava-

liado em estudos mais alargados de indivíduos expostos. No entanto, estes dois doentes estavam também sensibilizados aos ácaros comuns do pó da casa (um ao *Dermatophagoides pteronyssinus* e outro ao *Dermatophagoides farinae*) pelo que alguma da resposta cutânea poderá ser devida a reactividade alérgica cruzada entre as diferentes espécies de ácaros^{28, 29}. De facto, no grupo controlo que utilizámos para os testes cutâneos, a sensibilização simultânea aos ácaros de armazenamento e domésticos foi também igualmente elevada (37 %).

A etiologia da asma ocupacional dos corticeiros permanece incerta, mas há agora alguma evidência que a sensibilização IgE não é um elemento determinante na maior parte dos doentes. Os mecanismos do recrutamento eosinofílico às vias aéreas em situações de asma ocupacional não-IgE mediada, tem sido atribuída à presença de linfócitos T activados com um padrão de produção de citocinas de tipo Th2^{21,30,31}. Um aumento ligeiro do número de linfócitos no LBA verifica-se na maior parte dos nossos doentes com asma (17,0+13,1 %), podendo estudos futuros mais detalhados desta população celular contribuir para esclarecer o seu envolvimento.

A ausência de sensibilização IgE para os fungos que colonizarem longamente as placas de cortiça durante o seu processamento industrial, sugere a procura de outros agentes potencialmente sensibilizantes. De facto, os efeitos biológicos da poeira de cortiça deverão ser cuidadosamente estudados, tendo como exemplo a alergia ao cedro vermelho (haptização pelo ácido plicático)³⁰ e a asma à madeira de carvalho³². A suberina, um componente *major* da cortiça, é um biopolímero lipofílico cuja constituição química está a começar a ser definida³³ e deverá ser considerada nesta análise. Além disso, o crescimento microbiano na cortiça origina metabolitos voláteis que podem também induzir efeitos adversos no aparelho respiratório³⁴.

Em conclusão, o nosso estudo revelou que a asma ocupacional dos trabalhadores da indústria da

cortiça, demonstrada por alterações do registo seriado dos débitos expiratórios (DEMI) no trabalho, se associa a inflamação eosinofílica broncopulmonar. Apesar da exposição prolongada a numerosos esporos fúngicos na indústria da cortiça, que originam sensibilização imunológica (p.ex. IgG4) nos indivíduos expostos, não encontramos, através de métodos sensíveis, evidência da sensibilização IgE aos fungos mais prevalentes no ambiente de trabalho dos doentes asmáticos estudados. Como referimos, os trabalhadores da indústria da cortiça estão expostos a uma grande diversidade de substâncias com capacidade imunogénica, adjuvante e/ou irritativa, pelo que novos estudos para desvendar a etiologia da asma ocupacional dos corticeiros devem seguir essas hipóteses.

BIBLIOGRAFIA

1. Pimentel JC, Avila R. Respiratory Disease in worker's in the cork industry (Suberosis): new trends and diagnostic possibilities. *Thorax* 1973; 28, 409-32.
2. Delgado L, Winck JC, Sapage JM, Torres S, Ribeiro JI, Sa JM. Respiratory disease in cork worker's: characterization of Suberosis alveolitis by bronchoalveolar lavage. *Eur Respir J* 1992 ;5: 503s-4s.
3. Delgado L, Winck JC, Sapage JM, Torres S, Moura e Sá J, Torrinha JAF. Antibodies to *Penicillium frequentans* in cork worker's respiratory disease (Suberosis). Application of the ImmunoCAP IgG RAST in sera and bronchoalveolar lavage (BALF) measurements. Proceedings of the XVI European Congress of Allergology and Clinical Immunology-Ed A Basaomba and MD Hernandez F de Rojas, 1995, 209-214.
4. Winck JC, Sapage JM, Torres S, Vanzeller M, Palmares MC, Delgado JL. Work-related changes in peak expiratory flow in cork worker's respiratory disease (Suberosis). *J Allergy Clin Immunol* 1999;103(1, Pt2): 848.
5. Winck JC, Delgado L, M Vanzeller, T. Guimarães, S Torres, JM Sapage. Monitoring of Peak Expiratory Flow rates in cork worker's occupational asthma. *Journal of Asthma* 2001; 38(4): 357-62.
6. Arlian LG, Vyszeski-Moher DL, Johansson SG, van Hage-Hamsten M. Allergenic characterization of *Thyrophagus putrescentiae* using sera from occupationally exposed farmers. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1997; 79: 525-9.
7. Colloff MJ, Merrett TG, Merrett J, McSharry C, Boyd G. Feather mites are potentially an important source of allergens for pigeon and budgerigar keepers. *Clin Exp Allergy* 1997; 27: 60-7.
8. Ávila R , Lacey J. The role of *Penicillium frequentans* in suberosis (Respiratory disease in cork workers). *Clinical Allergy* 1974; 4: 109-17.
9. Hunninghake GW, Gadek JE, Kawanami O, Ferrans VJ, Crystal RG. Inflammatory and Immune processes in the Human Lung in Health and disease: evaluation by bronchoalveolar lavage. *Am J Pathol* 1979; 97 (1): 149-98.

10. Kavaru MS, Duveik RA, Thomassen MJ. Role of Bronchoscopy in asthma research. *Clin Chest Med* 1999; 20 (1): 153-189.
11. Frew AJ, Chan H, Lam S, Chan-Yeung M. Bronchial inflammation in occupational asthma due to western red cedar. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: 340-4.
12. Fabbri LM, Boschetto P, Zocca E, Milani G, Pivrotto M, Plebiani M, Burlina A, Licata B, Mapp CE. Bronchoalveolar neutrophilia during late asthmatic reactions induced by toluene diisocyanate. *Am Rev Respir Dis* 1987; 136: 36-42.
13. Danesh P, Velez Caldas FM, Figueiredo Marques JJ, San Romão MV. Mycobiota in Portuguese 'normal' and 'green' cork throughout the manufacturing process of stoppers. *J Appl Microbiol* 1997; 82:689-94.
14. Tarlo S, Wai Y, Dolovich J, Summerbell R. Occupational asthma induced by *Chrysonilia sitophila* in the logging industry. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 97:1409-13.
15. Côté J, Chan H, Brochu G, Chan-Yeung M. Occupational asthma caused by exposure to *Neurospora* in a plywood factory worker. *Br J Ind Med* 1991; 48: 279-82.
16. Cockcroft DW, Kilhan DN, Mellon GJA. Bronchial Reactivity to Inhaled histamine, a method and clinical survey. *Clin Allergy* 1977; 7: 235-43.
17. Klech H, Pohl W, ed. Technical recommendations and guidelines for bronchoalveolar lavage (BAL). Report of the European Society of Pneumology Task Group on BAL. *Eur Respir J* 1989; 2: 561-85.
18. Colloff MJ, Merrett TG, Merrett J, McSharry C, Boyd G. Feather mites are potentially an important source of allergens for pigeon and budgerigar keepers. *Clin Exp Allergy* 1997; 27: 60-4.
19. Arlian LG, Vyszeski-Moher DL, Johansson SG, van Hage-Hamsten M. Allergenic characterization of *Thyrophagus putrescentiae* using sera from occupationally exposed farmers. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1997; 79: 525-9.
20. Blainey AD, Topping MD, Ollier S, Davies RJ. Allergic respiratory disease in grain workers: the role of storage mites. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 84(3): 296-303.
21. Lemiére C, Chaboilliez S, Trudeau C, Taha R, Maghni K, Martin JG, Hamid Q. Characterization of airway inflammation after repeated exposures to occupational agents. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106: 1163-70.
22. Bentley AM, Durham SR, Kay AB. Comparison of the immunopathology of extrinsic, intrinsic and occupational asthma. *J Invest Allergol Clin Immunol* 1994; 4(5): 222-32.
23. Boulet L-P, Boutet M, Laviolette M, Dugas. Milot J, Leblanc C, Paquette L, Côté J, Cartier A, Malo J-L. Airway inflammation after removal from causal agent in occupational asthma due to high and low molecular weight agents. *Eur Respir J* 1994; 7: 1567-75.
24. Kraft M, Djukanovic R, Wilson S, Holgate ST, Martin R. Alveolar Tissue Inflammation in Asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: 1505-10.
25. Hamid Q, Song Y, Kotsimbos TC, Minshall E, Bai TR, Hegele RG, Hogg JC. Inflammation of small airways in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 100: 44-51.
26. Alvarez MJ, Castillo R, Rey A, Ortega N, Blanco C, Carrillo. Occupational asthma in a grain worker due to *Lepidoglyphus destructor*, assessed by bronchial provocation test and induced sputum. *Allergy* 1999; 54: 884-9.
27. Warren CPW, Holford-Strevens V, Sinha RN. Sensitization in a grain handler to the storage mite *Lepidoglyphus destructor* (Schränk). *Ann Allergy* 1985; 50:30-4.
28. Fernández-Caldas E. Mite species of allergologic importance in Europe. *Allergy* 1997; 52:383-7.
29. Luczynska CM, Griffin P, Davies RJ, Topping MD. Prevalence of specific IgE to storage mites (*A siro*, *L destructor* and *T longior*) in an urban population and crossreactivity with house dust mite (*D pteronyssinus*). *Clin Exp Allergy* 1990; 20(4): 403-6.
30. Frew A, Chang JH, Chan H, Quirce S, Noertjojo K, Keown P, Chan-Yeung M. Lymphocyte responses to plicatic acid-human serum albumin conjugate in occupational asthma caused by western red cedar. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 101: 841-7.
31. Bentley AM, Maestrelli P, Saetta M, Fabbri LM, Robinson DS, Bradley BL, Jeffery PK, Durham SR, Kay AB. Activated lymphocytes and eosinophils in the bronchial mucosa in isocyanate-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 89: 821-9.
32. Malo J-L, Cartier A, Desjardins A, Weyer RV, Vandenplas O. Occupational asthma caused by oak wood dust. *Chest* 1995; 108: 856-8.
33. Rocha SM, Goodfellow BJ, Delgadillo I, Neto CP, Gil AM. Enzymatic isolation and structural characterization of polymeric suberin of cork from *Quercus suber* L. *Int J Biol Macromol* 2001; 28 (2): 107-19.
34. Rocha S, Delgadillo I, Ferrer Correia AJ. GC-MS study of volatiles of normal and microbiologically attacked cork from *Quercus suber* L. *J Agric Food Chem* 1996; 44: 865-71.