

## Utilização de alguns marcadores (Enzima Conversora da Angiotensina, Neopterin, Hidroxiprolina e <sup>67</sup>Ga) no estudo da alveolite subclínica dos indivíduos expostos à inalação de asbesto

«Use of some markers (Angiotensin Converting Enzyme, Neopterin, Hydroxyproline and <sup>67</sup>Ga) in the study of subclinical alveolitis in asbestos' exposure.»

BAGANHA M. F. (1); ABREU F. (2); MARQUES M. A. T. (2); MACEDO (2); PÊGO A. (3); LIMA M. A. M. (4); MESQUITA L. (5); ROBALO CORDEIRO C. (2); MOTA PINTO A. (6); FERRER ANTUNES A. L. (7); TEIXEIRA M. L. (8); CHIEIRA L. (2); ALCOBIA C. (2); SOUSA A. (2); LEITE I. (2); AZEVEDO-BERNARDA R. (9); ROSA M. A. S. (10); MORAIS J. C. T. (11); ROBALO CORDEIRO A. J. A. (12)

CENTRO DE PNEUMOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA  
(Director: Prof. Doutor ROBALO CORDEIRO)

### RESUMO

### SUMMARY

**Em publicações anteriores tivemos oportunidade de demonstrar que indivíduos submetidos à inalação profissional de fibras de asbesto podem desenvolver**

*On previous reports we had the opportunity of showing that workers professionally exposed to asbestos fibers might develop a subclinical alveolitis dependent on the parenchymatous*

- 
- (1) Chefe de Serviço de Pneumologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra. Doutoramento em Medicina pela Universidade de Coimbra. Cordenador da Linha de Acção nº 2 e Responsável pelos Projetos de Investigação 1F, 1P, 2B, 2C, 4G e 6B do Centro de Pneumologia da Universidade de Coimbra.
- (2) Assistente Eventual de Pneumologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra.
- (3) Assistente de Pneumologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra.
- (4) Investigador Auxiliar da Faculdade de Medicina de Coimbra.
- (5) Técnico Superior de Laboratório da Faculdade de Medicina de Coimbra.
- (6) Assistente da Faculdade de Medicina de Coimbra.
- (7) Assistente de Medicina Nuclear dos Hospitais da Universidade de Coimbra.
- (8) Assistente de Radiologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra.
- (9) Professor Catedrático da Faculdade de Medicina de Coimbra.
- (10) Professor Associado da Faculdade de Medicina de Coimbra.
- (11) Chefe de Serviço de Radiologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra.
- (12) Professor Catedrático da Faculdade de Medicina de Coimbra. Director do Serviço de Pneumologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra. Secretário do Centro de Pneumologia da Universidade de Coimbra.

uma alveolite subclínica dependente da concentração parenquimatosa deste material expressa através do número de corpos asbestóticos/ml de expectoração e/ou de líquido de lavagem broncoalveolar (LLBA).

Agora, numa amostra mais alargada (15 indivíduos não fumadores, com uma média de idades de  $57,87 \pm 7,62$  anos e um tempo médio de exposição de  $25,87 \pm 7,11$  anos), tentamos estudar esta alveolite através da utilização de alguns marcadores (doseamentos da enzima conversora da angiotensina e da neopterina, tanto no sangue como no LLBA; doseamento da hidroxiprolina na urina de 24 horas; fixação pulmonar do  $^{67}\text{Ga}$ ).

Os resultados obtidos, os quais foram analisados em função do número de corpos asbestóticos / ml de expectoração e/ou de LLBA ( $> 1$  — Grupo I;  $< 1$  — Grupo II), permitiram-nos verificar o seguinte:

— Os níveis séricos da enzima conversora da angiotensina sérica (SACE) encontravam-se normais, tanto individual como globalmente. No entanto, as taxas séricas eram significativamente ( $p < 0.001$ ) mais elevadas no Grupo I ( $34,72 \pm 11,97$ ) em relação ao Grupo II ( $13,5 \pm 2,69$ ); esta diferença, igualmente significativa ( $p > 0.001$ ), acompanhava os valores detectados no LLBA ( $7,66 \pm 2,53 / 1,86 \pm 2,18$ ).

— A neopterina, genericamente elevada ( $8,59 \pm 5,0$  nmol/l), tanto no sangue como no LLBA, apresentava valores séricos particularmente altos no Grupo I ( $12,43 \pm 5,73$  nmol/l) em relação ao Grupo II ( $6,29 \pm 3,09$  nmol/l), enquanto que no LLBA eles eram praticamente sobreponíveis ( $2,47 \pm 0,23 / 2,23 \pm 1,56$  nmol/l).

— Quanto à hidroxiprolina, os respectivos níveis na urina de 24 horas nunca ultrapassaram os limites máximos da normalidade, não existindo entre os dois grupos diferenças estatisticamente significativas ( $13,9 \pm 6,69 / 11,61 \pm 4,32$  mg/24h/m<sup>2</sup>).

— A fixação pulmonar do  $^{67}\text{Ga}$  era normal em 63% dos casos e só em quatro indivíduos (dois de cada grupo) se mostrou alterada: um caso compatível com o grau II e três com o grau III.

Face a estes resultados, e após a sua discussão, os autores concluem que os indivíduos com uma concentração parenquimatosa em fibras de asbesto que se expressa por um número de corpos asbestóticos  $> 1$  / ml de expectoração e/ou de LLBA, podem desenvolver uma alveolite linfocitária com elevação das células CD4 e da relação CD4/CD8 em contraste com o sangue periférico onde o número e a relação destas células permanecem normais.

concentrations of this material expressed by the number of asbestos bodies per ml of sputum and/or bronchoalveolar lavage fluid (BALF).

Now in a group of 15 individuals (non smokers, with an average age of  $57.87 \pm 7.62$  years and a medium exposure time of  $25.87 \pm 7.11$  years), we tried to study this alveolitis using some markers: determination of the Angiotensin Converting Enzyme (ACE) and Neopterin, in the blood and BALF; determination of urinary Hydroxyprolin; pulmonary uptake of  $^{67}\text{Ga}$ . The results were analysed concerning the number of asbestos bodies/ml of sputum and or BALF ( $> 1$  — Group I;  $< 1$  — Group II), allowed us to see:

— Normal seric levels of ACE. However, the seric levels were significantly more elevated in Group I ( $34.72 \pm 11.97$ ) in relation to Group II ( $13.5 \pm 2.69$ ). This difference, equally significant ( $p < 0.001$ ) accompanied the values in BALF ( $7.66 \pm 2.53 / 1.86 \pm 2.18$ ).

— The Neopterin, globally elevated ( $8.59 \pm 5.0$  nmol/l) as in the blood as in the BALF shows seric values higher in Group I ( $12.43 \pm 5.73$  nmol/l) in relation to Group II ( $6.29 \pm 3.09$  nmol/l) meanwhile the values in BALF were practically superposed ( $2.47 \pm 0.23 / 2.23 \pm 1.56$  nmol/l).

— About Hydroxyprolin, the urinary 24 h. levels never surpassed the maximal limits of normality, and so there wasn't any statistically significant differences between the two Groups. ( $13.9 \pm 6.69 / 11.61 \pm 4.32$  mgr/24h./m<sup>2</sup>).

— The pulmonary fixation of  $^{67}\text{Ga}$  was normal in 63.6% of individuals. Only in four (two of each group) were abnormal: one case of degree II and 3 of degree III.

— The authors conclude that individuals with a parenchymatous concentration in asbest fibers  $> 1$  asbesto body/ml of sputum and/or BALF, may developpe a lymphocitary alveolitis with increased numbers of CD4 cells as well as the ratio CD4/CD8 in contrast with peripheral blood in which the numbers and cellular ratio were normal.

The alterations detected in the seric and alveolar levels of ACE and Neopterin, associated with normal values of the urinary excretion of Hydroxyprolin and the small number of abnormal  $^{67}\text{Ga}$  exams seems to suggest the absence of parenchymatous fibrosis in these situations and permit to fit cellular perturbations of the deep lung of this workers in the sphere of the subclinical alveolitis.

As variações detectadas nos níveis séricos e alveolares da enzima conversora da angiotensina sérica e da neopterina, acompanhadas de valores normais da eliminação urinária da hidroxiprolina e do escasso número de indivíduos que fixaram o  $^{67}\text{Ga}$  apontam para a ausência de fibrose parenquimatosa nestas situações ou para a sua existência em quantidades muito diminutas, sem tradução clínica ou radiológica, permitindo enquadrar as perturbações celulares observadas a nível do pulmão profundo destes operários no âmbito das alveolites subclínicas.

uma alveolite subclínica dependente da concentração parenquimatosa deste material expressa através do número de corpos asbestóticos/ml de expectoração e/ou de líquido de lavagem broncoalveolar (LLBA).

Agora, numa amostra mais alargada (15 indivíduos não fumadores, com uma média de idades de  $57,87 \pm 7,62$  anos e um tempo médio de exposição de  $25,87 \pm 7,11$  anos), tentamos estudar esta alveolite através da utilização de alguns marcadores (doseamentos da enzima conversora da angiotensina e da neopterina, tanto no sangue como no LLBA; doseamento da hidroxiprolina na urina de 24 horas; fixação pulmonar do  $^{67}\text{Ga}$ ).

Os resultados obtidos, os quais foram analisados em função do número de corpos asbestóticos / ml de expectoração e/ou de LLBA ( $> 1$  — Grupo I;  $< 1$  — Grupo II), permitiram-nos verificar o seguinte:

— Os níveis séricos da enzima conversora da angiotensina sérica (SACE) encontravam-se normais, tanto individual como globalmente. No entanto, as taxas séricas eram significativamente ( $p < 0.001$ ) mais elevadas no Grupo I ( $34,72 \pm 11,97$ ) em relação ao Grupo II ( $13,5 \pm 2,69$ ); esta diferença, igualmente significativa ( $p > 0.001$ ), acompanhava os valores detectados no LLBA ( $7,66 \pm 2,53 / 1,86 \pm 2,18$ ).

— A neopterina, genericamente elevada ( $8,59 \pm 5,0$  nmol/l), tanto no sangue como no LLBA, apresentava valores séricos particularmente altos no Grupo I ( $12,43 \pm 5,73$  nmol/l) em relação ao Grupo II ( $6,29 \pm 3,09$  nmol/l), enquanto que no LLBA eles eram praticamente sobreponíveis ( $2,47 \pm 0,23 / 2,23 \pm 1,56$  nmol/l).

— Quanto à hidroxiprolina, os respectivos níveis na urina de 24 horas nunca ultrapassaram os limites máximos da normalidade, não existindo entre os dois grupos diferenças estatisticamente significativas ( $13,9 \pm 6,69 / 11,61 \pm 4,32$  mg/24h/m<sup>2</sup>).

— A fixação pulmonar do  $^{67}\text{Ga}$  era normal em 63% dos casos e só em quatro indivíduos (dois de cada grupo) se mostrou alterada: um caso compatível com o grau II e três com o grau III.

Face a estes resultados, e após a sua discussão, os autores concluem que os indivíduos com uma concentração parenquimatosa em fibras de asbesto que se expressa por um número de corpos asbestóticos  $> 1$  / ml de expectoração e/ou de LLBA, podem desenvolver uma alveolite linfocitária com elevação das células CD4 e da relação CD4/CD8 em contraste com o sangue periférico onde o número e a relação destas células permanecem normais.

concentrations of this material expressed by the number of asbestos bodies per ml of sputum and/or bronchoalveolar lavage fluid (BALF).

Now in a group of 15 individuals (non smokers, with an average age of  $57.87 \pm 7.62$  years and a medium exposure time of  $25.87 \pm 7.11$  years), we tried to study this alveolitis using some markers: determination of the Angiotensin Converting Enzyme (ACE) and Neopterin, in the blood and BALF; determination of urinary Hydroxyprolin; pulmonary uptake of  $^{67}\text{Ga}$ . The results were analysed concerning the number of asbestos bodies/ml of sputum and/or BALF ( $> 1$  — Group I;  $< 1$  — Group II), allowed us to see:

— Normal seric levels of ACE. However, the seric levels were significantly more elevated in Group I ( $34.72 \pm 11.97$ ) in relation to Group II ( $13.5 \pm 2.69$ ). This difference, equally significant ( $p < 0.001$ ) accompanied the values in BALF ( $7.66 \pm 2.53 / 1.8 \pm 2.18$ ).

— The Neopterin, globally elevated ( $8.59 \pm 5.0$  nmol/l) as in the blood as in the BALF shows seric values higher in Group I ( $12.43 \pm 5.23$  nmol/l) in relation to Group II ( $6.29 \pm 3.09$  nmol/l) meanwhile the values in BALF were practically superposed ( $2.47 \pm 0.23 / 2.23 \pm 1.56$  nmol/l).

— About Hydroxyprolin, the urinary 24 h. levels never surpassed the maximal limits of normality, and so there wasn't any statistically significant differences between the two Groups. ( $13.9 \pm 6.69 / 11.61 \pm 4.32$  mgr/24h./m<sup>2</sup>).

— The pulmonary fixation of  $^{67}\text{Ga}$  was normal in 63.6% of individuals. Only in four (two of each group) were abnormal: one case of degree II and 3 of degree III.

— The authors conclude that individuals with a parenchymatous concentration in asbest fibers  $> 1$  asbestos body/ml of sputum and/or BALF, may develop a lymphocitary alveolitis with increased numbers of CD4 cells as well as the ratio CD4/CD8 in contrast with peripheral blood in which the numbers and cellular ratio were normal.

The alterations detected in the seric and alveolar levels of ACE and Neopterin, associated with normal values of the urinary excretion of Hydroxyprolin and the small number of abnormal  $^{67}\text{Ga}$  exams seems to suggest the absence of parenchymatous fibrosis in these situations and permit to fit cellular perturbations of the deep lung of this workers in the sphere of the subclinical alveolitis.

As variações detectadas nos níveis séricos e alveolares da enzima conversora da angiotensina sérica e da neopterina, acompanhadas de valores normais da eliminação urinária da hidroxiprolina e do escasso número de indivíduos que fixaram o  $^{67}\text{Ga}$  apontam para a ausência de fibrose parenquimatosa nestas situações ou para a sua existência em quantidades muito diminutas, sem tradução clínica ou radiológica, permitindo enquadrar as perturbações celulares observadas a nível do pulmão profundo destes operários no âmbito das alveolites subclínicas.

## INTRODUÇÃO

Em anteriores publicações [1-3] tivemos oportunidade de demonstrar que alguns dos indivíduos expostos à inalação de fibras de asbesto desenvolviam uma alveolite subclínica dependente da agressão respiratória por este material.

Com efeito, num conjunto de operários clinicamente assintomáticos e com alterações pleurais típicas desta patologia (espessamentos isolados ou associados a placas calcificadas), mas sem sinais radiológicos sugestivos de fibrose parenquimatosa, pudemos verificar [2-3] que aqueles que apresentavam uma análise quantitativa por microfiltração da expectoração e/ou do líquido de lavagem broncoalveolar (LLBA) positiva (n.º de corpos asbestóticos/ml > 1) se encontravam atingidos por uma alveolite linfocitária ( $26,3 \pm 5,6\%$  de linfócitos no LLBA), afastando-se significativamente ( $p < 0,01$ ) daqueles cuja análise quantitativa era negativa (n.º de corpos asbestóticos/ml < 1), nos quais a celularidade do LLBA permanecia inalterada ( $12,2 \pm 3,9\%$  de linfócitos).

Assim, os operários com um grau de empoeiramento expresso na expectoração e/ou no LLBA por um número de corpos asbestótico > 1 revelavam alterações da celularidade do seu pulmão profundo caracterizadas pelo aumento percentual das células CD4 acompanhado de uma significativa ( $p < 0,0001$ ) elevação da relação CD4/CD8, enquanto que estes parâmetros permaneciam normais a nível do sangue periférico [2-3].

Estes resultados, de acordo, aliás, com os obtidos por COSTABEL [4-5] e WALLACE [6] em trabalhos paralelos, sugerem que a asbestose se afasta das outras pneumoconioses, com excepção da berliose, e se aproxima da sarcoidose pelo que diz respeito à dinâmica das células imunocompetentes, tanto a nível do pulmão profundo, como sanguíneo.

Entretanto, o estudo da densidade pulmonar destes indivíduos, efectuado através da análise quantitativa tomodensitométrica, revelaria [2-3] uma ligeira elevação deste parâmetro, nomeadamente no grupo de operários com uma análise por microfiltração positiva ( $- 682,6 \pm 19,5$  U.H.), qual se apresentava particularmente expressiva quando se consideravam apenas os valores correspondentes aos histogramas dos cortes efectuados 2 cm acima das cúpulas diafragmáticas mais elevadas ( $- 651,3 \pm 30,3$  U.H.). Estas perturbações da densidade pulmonar foram interpretadas como uma consequência do processo de alveolite ou de uma evolução fibrogénica ainda numa fase infraradiológica.

Na sequência destes trabalhos os autores apresentam agora os resultados obtidos com a utilização de alguns

marcadores (enzima conversora da angiotensina, neoptertina, hidroxiprolina e  $^{67}\text{Ga}$ ) dirigidos à detecção subclínica dessa alveolite e à sua interpretação patogénica.

A enzima conversora da angiotensina é uma dipeptidil-carboxipeptidase cuja síntese a nível do pulmão profundo depende fundamentalmente do macrófago e da célula endotelial e que "in vivo" exerce duas importantes funções: cataliza a conversão da angiotensina I (um decapeptídeo) em angiotensina II (um octapeptídeo), removendo o dipeptídeo terminal histidileucina; inactiva a bradicinina. O seu interesse neste estudo reside no facto de a elevação dos seus níveis, tanto no soro como no LLBA, constituir um sinal de activação macrofágica.

A neoptertina, reconhecida quimicamente como uma pirazina-pirimidina, é um derivado do trifosfato de guanosina sintetizado exclusivamente no macrófago após estimulação pelo  $\gamma$ -interferon de origem linfocitária e, num grau muito menor, por outros factores como o  $\alpha$ -interferon, o factor de necrose tumoral e os polissacarídeos. Nestas circunstâncias, a neoptertina tem vindo a ser apontada como um excelente marcador do sistema imunológico dado o facto de ela reflectir a activação do eixo linfócito/macrófago.

A hidroxiprolina é, a par de outros aminoácidos como a hidroxilisina e a prolina, um importante constituinte do colagéneo. Ora, quando os fenómenos de proteólise conduzem à degradação desta substância os respectivos metabólitos não são reutilizados na síntese de novas fibras mas sim parcialmente eliminados através da urina. Nestas condições, um aumento da excreção urinária de hidroxiprolina pode reflectir a degradação do tecido conjuntivo que acompanha uma acrescida actividade fibroproliferativa a nível do pulmão profundo, constituindo, por essa via, um reconhecido marcador da fibrose pulmonar.

O  $^{67}\text{Ga}$  é um radionúclido susceptível de se concentrar nas lesões tumorais ou inflamatórias. Para explicar esta captação têm sido invocadas sucessivas e múltiplas teorias entre as quais se destacam a sua ligação a várias proteínas, aos polimorfonucleares neutrófilos, aos siderófilos e a alguns microorganismos. Entretanto, as mais recentes investigações parecem demonstrar que o  $^{67}\text{Ga}$  abandona rapidamente os vasos sanguíneos que se encontram muito permeáveis, juntamente com o plasma, em direcção ao tecido inflamatório e aí se aloja através de uma ligação aos mucopolissacarídeos ácidos.

Por isso o  $^{67}\text{Ga}$  tem sido utilizado como um marcador de diversos processos inflamatórios, nomeadamente daqueles que atingem o pulmão profundo.

## MATERIAL E MÉTODOS

## Material

Foram estudados 15 indivíduos (Quadro I), 14 homens e 1 mulher, não fumadores e submetidos à inalação profissional de fibras de asbesto.

Este conjunto apresentava uma média de idades de  $57,87 \pm 7,62$  anos e um tempo médio de exposição de  $25,87 \pm 7,11$  anos.

O critério de selecção assentou na presença de lesões pleurais benignas típicas da agressão respiratória pelo asbesto (espessamento e/ou calcificação), expressas nos exames teleradiográficos do torax obtidos em incidências postero-anterior e postero-obliqua a  $30^\circ$  mas sem alterações sugestivas de fibrose parenquimatosa.

A sua observação permitiu-nos reconhecer 7 espessamentos pleurais isolados e 8 associados a placas calcificadas (Quadro I). Clinicamente, todos os indivíduos se apresentavam assintomáticos e funcionalmente detectaram-se 6 casos com alterações ventilatórias moderadas — 3 de carácter restritiva, 1 mista e 2 com perturbações isoladas das pequenas vias aéreas — sendo os restantes normais (Quadro I).

A aplicação da análise quantitativa por microfiltração da expectoração e/ou do LLBA, destinada à determinação do número de corpos asbestóticos presentes nestes meios biológicos, permitiu-nos dividir este conjunto em dois grupos: Grupo I ( $n^\circ$  de corpos asbestóticos/ml  $> 1$ ) e Grupo II ( $n^\circ$  de corpos asbestóticos/ml  $< 1$ ), os quais não apresentavam entre si diferenças significativas em relação à idade e ao tempo de exposição (Quadro I).

QUADRO I — Caracterização da Amostra Médica

	CASO	IDADE	EXPOSIÇÃO	HT*	FV**	RX***	CA****
G	1	65	20	NF	SR	CP	+
R	2	53	20	NF	N	EP	+
U	3	67	36	NF	PVA	CP	+
P	4	67	30	NF	N	CP	+
O	5	48	25	NF	N	CP	+
	6	60	37	NF	N	EP	+
I	n = 6	60 ( $\pm 7,95$ )	28,0 ( $\pm 7,66$ )	6 NF	4 N 1 SR 1 PVA	4 CP 2 EP	6 +
	7	54	16	NF	SR	EP	-
	8	58	24	NF	N	EP	-
G	9	40	25	NF	PVA	CP	-
R	10	62	36	NF	SM	EP	-
U	11	64	14	NF	N	CP	-
P	12	59	26	NF	N	EP	-
O	13	52	24	NF	N	CP	-
	14	55	23	NF	SR	EP	-
II	15	64	32	NF	N	CP	-
	n = 9	56,4 ( $\pm 7,52$ )	24,4 ( $\pm 6,86$ )	9 NF	5 N 2 SR 1 SM 1 PVA	4 CP 5 EP	9 -
T							
O							
T	(n = 15)	57,87 ( $\pm 7,62$ )	25,87 ( $\pm 7,11$ )	15 NF	9 N 3 SR 1 SM 2 PVA	8 CP 7 EP	6 + 9 -

\* HT (Hábitos Tabágicos): NF (Não Fumador).

\*\* FV (Função Ventilatória): N (Normal); SR (Síndrome Restritiva); SM (Síndrome Mista); PVA (Alterações das Pequenas Vias Aéreas).

\*\*\* RX (Telerradiografia Torácica): CP (Calcificações Pleurais); EP (Espessamentos Pleurais).

\*\*\*\* CA (Contagem de Corpos Asbestóticos na Expectoração e/ou no LLBA: + (Positiva —  $n^\circ$  CA  $> 1$ /ml); - (Negativa —  $n^\circ$  CA  $< 1$ /ml).

## MÉTODOS

Para o estudo destes marcadores foi protocolada a seguinte metodologia:

— O doseamento da enzima conversora da angiotensina foi efectuado em 10 indivíduos, tanto no soro (SACE) como no LLBA (LACE), no Instituto de Patologia Geral da Faculdade de Medicina de Coimbra, segundo uma técnica espectrofotométrica:

- Realização de uma reacção cinética, levada a cabo num espectrofotómetro "Philips Pye Unicam".

Para obtenção desta reacção foi utilizado o substrato sintético FAPGG ("Furylacryloyl Phenylalanyl Glycyl Glycine") cuja hidrólise em "Furylacryloyl Phenylalanyl" e "Glycyl Glycine" conduz a uma diminuição de absorvância da amostra inicial.

- Como amostras utilizaram-se soros não hemolizado ou lipémico contra calibrador.

Os resultados eram fornecidos em Unidades / Litro (U/l) a 37° C, tendo-se considerado como valores normais os situados entre 8 e 52 U/l.

— A neopterina foi observada em 8 indivíduos através de um processo radioimunológico, de acordo com a seguinte metodologia utilizada no Laboratório de Imunologia da Faculdade de Medicina de Coimbra:

- Preparação das amostras biológicas e respectiva repartição por tubos de poliestireno (50 µl por tubo).

- Adição de um anticorpo específico antineopterina.

- Incubação durante uma hora, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

- Junção do isótopo radioactivo (125 I—Neopterina), distribuído na quantidade de 100 µl por todos os tubos.

- Incubação durante uma hora, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

- Adição de uma suspensão de polietilenoglicol (solução a 6%) na quantidade de 2 ml por tubo.

- Centrifugação imediata dos tubos a 200° G, durante 10 minutos.

- Aspiração do sobrenadante.

- Leitura da radiação  $\gamma$  durante 60 minutos.

- Cálculo dos resultados a partir da relação percentual da radiação de cada amostra/radiação do padrão zero (B/BO).

Os resultados foram expressos em nmol/l, sendo considerado como valor sérico normal a taxa de  $5,11 \pm 1,92$  nmol/l.

— O doseamento da hidroxiprolina foi realizado no Instituto de Patologia Geral da Faculdade de Medicina de Coimbra, tendo sido estudados 13 indivíduos através da seguinte técnica:

- Observação por parte do doente de uma dieta sem colagénico (ausência de ingestão de carne ou derivados,

peixe, gelados, pudins, pastéis, chocolates e quaisquer alimentos que contivessem gelatina) nas 48 horas que antecediam a realização do exame.

- Recolha da urina durante 24 horas sobre tolueno ou antiséptico.

- Separação da hidroxiprolina dos outros componentes urinários por cromatografia de troca de iões.

- Hidrólise ácida dos peptídeos.

- Oxidação da hidroxiprolina até um anel pirrol pela Cloramina T.

- Quantificação do anel pirrol por espectrofotometria na presença do reagente de "Erllich".

Os resultados do doseamento da hidroxiprolina urinária foram calculados em mg/24 h/m<sup>2</sup>, encontrando-se os valores normais dependentes da idade: 100 mg/24 h/m<sup>2</sup> em crianças com idade inferior a um ano; 50 mg/24 h/m<sup>2</sup> até os treze anos; e 12 mg/24 h/m<sup>2</sup> nos adultos.

— O estudo da fixação pulmonar do <sup>67</sup>Ga incidiu sobre 11 indivíduos e foi efectuado no Serviço de Medicina Nuclear dos Hospitais da Universidade de Coimbra segundo a técnica habitualmente utilizada nesse laboratório:

- Injecção de 4 mCi de citrato de <sup>67</sup>Ga

- Recolha, 72 horas após a injecção, de imagens planas do torax através de uma Gama Câmara GE 400 AC/T, com um colimador de energia média e com uma janela de 20% à volta de três "photopeaks" (93,183 e 296 Kev).

Os resultados foram calculados em relação à actividade presente nos tecidos moles do tórax e no fígado, e assim escalonados:

- Grau I — Actividade pulmonar inferior ou igual à dos tecidos moles adjacentes, traduzindo um exame normal.

- Grau II — Actividade pulmonar superior à dos tecidos moles adjacentes mas inferior à do fígado.

- Grau III — Actividade pulmonar igual à do fígado.

- Grau IV — Actividade pulmonar superior à do fígado.

## RESULTADOS

Os níveis séricos da enzima conversora da angiotensina mantiveram-se no âmbito da normalidade, quer individual, quer globalmente (Quadro II).

Assinale-se, no entanto, a presença de valores significativamente ( $p < 0.001$ ) mais elevados nos indivíduos do Grupo I em relação aos do Grupo II ( $34,72 \pm 11,97 / 13,50 \pm 2,69$  U/l). Esta diferenciação em função dos resultados da análise quantitativa por microfiltração

revelou um afastamento ainda mais expressivo em relação ao seu doseamento no LLBA ( $7,66 \pm 2,53 / 1,86 \pm 0,18$  U/l), com diferenças igualmente significativas ( $p < 0.001$ ).

QUADRO II — Doseamento da Enzima Conversora da Angiotensina (U/l)

	SANGUE (SACE)	LLBA (LACE)
GRUPO I (n = 5)	34,72 ( $\pm 11,97$ ) *	7,66 ( $\pm 2,53$ ) *
GRUPO II (n = 5)	13,50 ( $\pm 2,69$ )	1,86 ( $\pm 0,18$ )
TOTAL (n = 10)	28,11 ( $\pm 13,86$ )	4,76 ( $\pm 3,78$ )

\*  $p < 0.001$

Os níveis de neopterinina encontravam-se elevados, tanto no soro como no LLBA (Quadro III), embora com diferentes comportamentos nestes meios biológicos na dependência dos grupos considerados. Assim, enquanto que os seus valores eram praticamente sobreponíveis no LLBA dos dois grupos ( $2,47 \pm 0,23 / 2,23 \pm 1,56$  nmol/l, respectivamente), já no soro se viria a detectar uma diferença entre eles, correspondente a níveis mais altos nos indivíduos do Grupo I em relação ao Grupo II ( $12,43 \pm 5,73 / 6,29 \pm 3,09$  nmol/l, respectivamente).

QUADRO III — Doseamento da Neopterinina (nmol/l)

	SANGUE	LLBA
GRUPO I (n = 3)	12,43 ( $\pm 5,73$ ) n.s.	2,47 ( $\pm 0,23$ ) n.s.
GRUPO II (n = 5)	6,29 ( $\pm 3,09$ )	2,23 ( $\pm 1,56$ )
TOTAL (n = 8)	8,59 ( $\pm 5,0$ )	2,32 ( $\pm 1,19$ )

n.s. - Não significativo

A hidroxiprolina urinária (Quadro IV) apresentava no Grupo I valores muito ligeiramente superiores ao seu máximo normal mas sem diferenças estatisticamente significativas entre os Grupos I e II ( $13,90 \pm 6,69 / 11,61 \pm 4,32$  mg/24h./m<sup>2</sup>, respectivamente).

QUADRO IV — Doseamento da Hidroxiprolina (mg/24h./m<sup>2</sup>)

GRUPO I (n = 6)		GRUPO II (n = 7)	TOTAL (n = 13)
13,90 ( $\pm 6,69$ )	n.s.	11,61 ( $\pm 4,32$ )	12,67 ( $\pm 5,42$ )

n.s. - Não significativo

A fixação pulmonar do <sup>67</sup>Ga não viria a demonstrar um comportamento diferenciado em relação aos indivíduos que integravam os dois grupos (Quadro V). Com efeito, para além do facto de a maioria deles (sete) não fixar este radionúclido, salienta-se a existência de apenas quatro casos em que o <sup>67</sup>Ga se fixou anormalmente no território pulmonar, mas em proporções idênticas para qualquer dos grupos considerados: dois indivíduos no Grupo I, um com uma hiperfixação nas duas bases pulmonares (Fig. 1) e outro nas regiões médio-hilar direita e inferior esquerda; dois casos no Grupo II, correspondentes a uma hiperfixação hilar e a uma localização focal nas áreas pulmonares inferiores (Fig.2).

QUADRO V — Fixação Pulmonar do <sup>67</sup>Ga

	GRUPO I (n = 5)	GRUPO II (n = 6)	TOTAL (n = 11)
GRAU I (Normal)	3	4	7
GRAU II (Anormal)	1	-	1
GRAU III (Anormal)	1	2	3

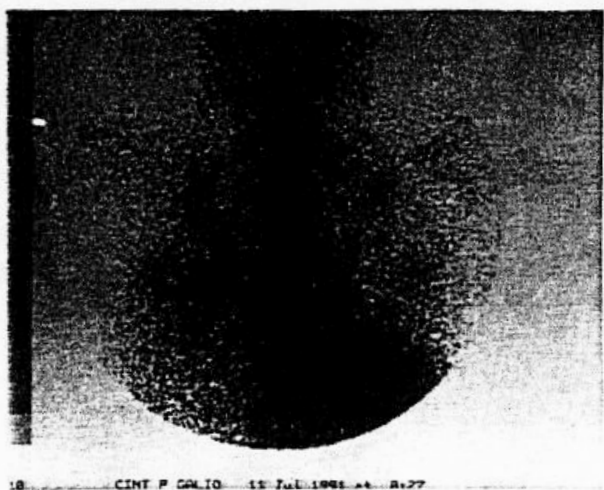


FIG. 1 — Cintigrama pulmonar de J.A.F. em vista posterior, após injeção i.v. de  $^{67}\text{Ga}$ , relevando uma discreta fixação difusa do radionúclido nas áreas inferiores dos campos pulmonares. Essa fixação era superior à dos tecidos moles adjacentes, mas inferior à do fígado (Grau II).

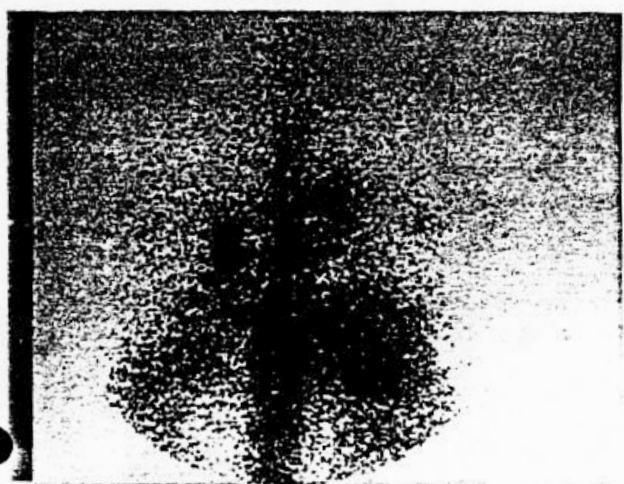


FIG. 2 — Cintigrama pulmonar de J.R.M. em vista posterior, após injeção i.v. de  $^{67}\text{Ga}$ , no qual se podem observar dois focos de fixação do radionúclido situados nas regiões médio-inferiores de cada um dos pulmões. Essa fixação era sobreponível à apresentada pelo fígado (Grau III).

## DISCUSSÃO

O estudo radiológico do torax, mesmo quando associado a uma história de exposição, não permite o diagnóstico de asbestose em todas as situações. De facto, estudos histopatológicos e por TAC de alta resolução demonstraram a presença de fibrose parenquimatosa em indivíduos assintomáticos com exames telerradiográficos do torax normais ou tradutores de lesões isoladas da pleura, típicas da inalação deste material [6-16].

Nestas circunstâncias, alguns autores e nós próprio pudemos verificar a importância assumida pela contagem microscópica, após microfiltração, do número de corpos asbestóticos presentes na expectoração e/ou no LLBA.

Com efeito, a quantidade destas fibras nesses meios biológicos reflecte a sua concentração parenquimatosa por forma a que a um ou mais corpos asbestóticos/ml de expectoração ou de LLBA corresponde uma taxa superior a 1.000/gr. de tecido pulmonar seco [1-3, 17-24]. E, neste contexto, estudos efectuados em tecidos recolhidos cirurgicamente ou durante a autópsia permitiram reconhecer a presença de fibrose, traduzindo uma intensa exposição a esse material.

De acordo com estes achados viríamos ainda a reconhecer, através da análise quantitativa pela TAC, uma densidade pulmonar compatível com um processo de alveolite e/ou de fibrose num grupo de operários expostos e com número de corpos asbestóticos/ml de expectoração e/ou LLBA superior a um, particularmente quando se considerava apenas a densidade correspondente aos cortes efectuados nas regiões pulmonares inferiores [2-3].

Curiosamente, esses indivíduos encontravam-se assintomáticos e a telerradiografia só revelava, de anormal, a existência de lesões pleurais benignas compatíveis com este empoeiramento (espessamentos isolados ou associados a calcificações).

Assim, face às limitações da telerradiografia torácica na detecção das alterações do pulmão profundo numa fase subclínica procuramos avaliar o rendimento fornecido pelo estudo da celularidade desta região através do LLBA e da aplicação de alguns marcadores, nomeadamente da enzima convertora da angiotensina, da neopterinina e da hidroxiprolina e, ainda, da fixação pulmonar do  $^{67}\text{Ga}$ .

- Em publicações anteriores [1-3] tivemos oportunidade de comunicar os resultados do estudo da celularidade do LLBA, os quais traduziam a existência nos operários expostos de uma alveolite linfocitária dependente das células CD4, com uma significativa elevação da relação CD4/CD8 directamente proporcional à concentração parenquimatosa de corpos asbestóticos, já que apenas se encontravam atingidos por esta alteração os indivíduos com um número de corpos asbestóticos na expectoração e/ou no LLBA superior a 1/ml.

Estas perturbações das subpopulações linfocitárias do pulmão profundo, as quais foram igualmente detectadas por outros autores [4-6, 25-26], não se faziam acompanhar por qualquer perturbação da dinâmica linfocitária a nível do sangue periférico, o que parece afastar, sob este ponto de vista, a asbestose pulmonar das



outras pneumoconioses, com excepção da beriliose, sugerindo uma sequestração pulmonar das células imunocompetentes à semelhança do que se verifica na sarcoidose.

Entretanto, os resultados obtidos nestes mesmos indivíduos com os doseamentos da enzima conversora da angiotensina e da neopterinina parecem adquirir, neste contexto, algum significado.

Na verdade, a elevação da SACE e da LACE, assim como da neopterinina, nos operários com maior concentração parenquimatosa de corpos asbestóticos pode contribuir para a interpretação patogénica desta alveolite, traduzindo uma acrescida produção macrofágica destas substâncias, o que testemunha a activação a que a linha celular monócito/macrófago se encontrava submetida.

No entanto, a importância relativa assumida por estes dois marcadores na detecção precoce das perturbações que atingem o pulmão profundo dos indivíduos submetidos à inalação de fibras de asbesto parece ser diferente. Com efeito, os níveis séricos da enzima conversora da angiotensina mantiveram-se, em todos os casos, no âmbito da normalidade, embora se tivessem detectado significativas ( $p < 0.001$ ) diferenças entre os dois grupos considerados, enquanto que os valores da neopterinina no soro ultrapassavam sempre os seus limites normais, atingindo particularmente os indivíduos com maior concentração parenquimatosa de corpos asbestóticos, nos quais as respectivas taxas excediam o dobro do seu valor normal. Acresce que a neopterinina, cuja produção depende exclusivamente do macrófago [27-28], tem sido apontada como excelente marcador da actividade do sistema imunológico, dado o facto de ela reflectir a activação do eixo linfocitário/macrófago. Na verdade, o macrófago humano sintetiza a neopterinina na sequência da sua activação pelo  $\gamma$ -interferon de origem linfocitária, particularmente do linfócito "helper" estimulado pela interleucina-1 [29], e, ainda, mas em proporções muito menores, por outros factores [30].

Assim, as variações dos níveis séricos e do LLBA da enzima conversora da angiotensina, mas muito particularmente as da neopterinina, parecem enquadrar-se nos mecanismos patogénicas adstritos a este tipo de alveolite e constituir, pelo que diz respeito a esta última, um precioso auxiliar na detecção destas perturbações numa fase subclínica.

Em indivíduos expostos com uma taxa de corpos asbestóticos na expectoração e/ou no LLBA superior a 1/ml, aos quais deverá corresponder uma concentração

parenquimatosa que ultrapassa mil corpos asbestóticos/grama de tecido pulmonar seco, alguns autores reconheceram, através de estudos histopatológicos, a presença de fibrose, mesmo nos casos aos quais correspondiam exames radiográficos do torax normais ou com lesões isoladas da pleura [10-14].

Estas situações parecem corresponder às do nosso grupo de indivíduos portadores de uma alveolite linfocitária. Será que esta alveolite conduziu à instalação de uma fibrose parenquimatosa infradiológica? O ligeiro aumento da densidade pulmonar parece apontar nesse sentido [2-3], mas a presença de uma alveolite poderá, só por si, justificar essa alteração tomodensitométrica.

Os resultados obtidos com o doseamento da hidroxiprolina urinária, os quais revelaram, individual e globalmente, valores situados no limite superior da normalidade, e com a exploração pelo  $^{67}\text{Ga}$ , que era normal em 63.6% dos casos estudados, não permitiram reconhecer a existência de fibrose a nível do parênquima pulmonar, o que parece ser confirmado pelo facto de a taxa de eliminação urinária da hidroxiprolina e de a fixação do  $^{67}\text{Ga}$  serem praticamente sobreponíveis nos dois grupos considerados, isto é, sem relação com a concentração parenquimatosa de corpos asbestóticos.

E, neste contexto, permitimo-nos salientar que a elevação dos níveis de excreção urinária de hidroxiprolina constitui um marcador particularmente sensível das desordens metabólicas que num determinado território estão implicadas na instalação da fibrose, reflectindo o seu estado evolutivo e a intensidade das respectivas perturbações [31-33].

Nestas circunstâncias, não se pode deduzir que os indivíduos que apresentavam uma alveolite linfocitária sofriam, igualmente, de fibrose. De facto, se esta existia, a sua reduzida expressão, e uma irrelevante perturbação do "turnover" colagénico, não permitiam a sua tradução clinicoradiológica.

Assim, atendendo a estes resultados e ao longo tempo de exposição dos operários, julgamos poder afirmar que a alveolite subclínica desencadeada pela inalação profissional de fibras de asbesto constitui uma entidade clínica individualizada, com características próprias e sem evolução obrigatória para a fibrose pulmonar. Com efeito, no pulmão profundo destes operários, as desordens celulares pareciam exclusivamente adstritas ao macrófago e às subpopulações linfocitárias T, as quais se activavam mutuamente mas sem mediação e intervenção de outros elementos celulares, particularmente do polimorfonuclear neutrófilo e do

fibroblasto, de acordo, aliás, com a diminuta fixação pulmonar do  $^{67}\text{Ga}$  nesse território [34].

Nestas condições, as alterações da dinâmica celular no pulmão profundo destes indivíduos, aliadas à ausência de sintomatologia e de sinais radioló-

gicos de fibrose, justificam o seu enquadramento no âmbito das alveolites subclínicas, em moldes semelhantes aos descritos por ROBALO CORDEIRO em operários submetidos à inalação profissional de sílica [35].

## BIBLIOGRAFIA

- [1] BAGANHA M.F., ABREU F., ALMEIDA J.R.G., TEIXEIRA M.L., LIMA M. A. M., GASPAR E., MARQUES M.A.T., MACEDO M., PÊGO A., SOUSA A., CHIEIRA L., LEITE I., FERREIRA M., ROSA M.A.S., TEIXEIRA A.M., MORAIS J.C.T., ROBALO CORDEIRO A.J.A. — Aplicação de novas técnicas ao diagnóstico da asbestose pulmonar: análise quantitativa por microfiltração; tomodensitometria; estudo do pulmão profundo — *Via Pneumológica* 1990; 1: 53-65.
- [2] BAGANHA M.F., ABREU F., MACEDO M., MARQUES M.A.T., PÊGO A., TEIXEIRA M.L., LIMA M.A.M., ROSA M.A.S., SOUSA A., LEITE I., FERREIRA J.M., CHIEIRA L., MORAIS J.C.T., ROBALO CORDEIRO A.J.A. — A alveolite subclínica da exposição ao asbesto — *Via Pneumológica* 1991; 1: 27-38.
- [3] BAGANHA M.F., ABREU F., MACEDO M., MARQUES M.A.T., PÊGO A., CORDEIRO C.R., TEIXEIRA M.L., LIMA M.A.M., ROSA M.A.S., SILVA A., MORAIS J.C.T., ROBALO CORDEIRO A.J.A. — Subclinical alveolitis in asbestos exposure (Em publicação).
- [4] COSTABEL U., BROSS Z.K., J. HUCK E., GUYMAN J., MATTHYS H. — Lung and blood lymphocyte subsets in asbestosis and mixed dust pneumoconiosis. *Chest* 1987; 1: 110-112.
- [5] COSTABEL U., TESCHLER H. — Inflammation and immune reactions in interstitial lung disease (IDL) associated with inorganic dust exposure. *Eur. Respir. J.* 1989; 190: 363-364.
- [6] WALLACE J. M., OISHI J.S., BARBERS R.G., BATRA P., ABERLE D.R. — Bronchoalveolar lavage cell and lymphocyte phenotype profiles in healthy asbestos — exposed shipyard workers. *Am. Rev. Resp. Dis.* 1989; 139: 33-38.
- [7] ABERLE D.R., GAMSU G., RAY C.S., FENERSTEIN I.M. — Asbestos — related pleural and parenchymal fibrosis: detection with high-resolution CT. *Radiology* 1988; 166: 729-734.
- [8] ABERLE D.R., GAMSU G., RAY C.S. — High-resolution CT of benign asbestos — related diseases: clinical and radiographic correlation. *A.J.R.* 1988; 151: 883-891.
- [9] FRIEDMAN A.C., FIEL S.B., FISHER M.S., RADECI P.D., CAROLINE D.F. — Asbestos — related pleural diseases and asbestosis: a comparison of CT and chest radiography. *A.J.R.* 1988; 150: 269-275.
- [10] HILLERDAL G., LINGREN A. — Pleural plaques: correlation of autopsy findings to radiographic findings and occupational history. *Eur. J. Resp. Dis.* 1980; 61: 315-319.
- [11] HOURIHANE D.O., LESSOF L., RICHARDSON P.C. — Hyaline and calcified pleural plaques as an index of exposure to asbestos: a study of radiological and pathological features of 100 cases with a consideration of epidemiology. *Br. Med. J.* 1966; 1: 1069-1074.
- [12] SISON R.F., HRUBAN R.H., MOORE G.W., KUHLMAN J.E., WHELLER P., HUTCHINS G.M. — Pulmonary diseases associated with pleural "asbestos" plaques. *Chest* 1989; 95: 831-835.
- [13] EPLER G.R., MCLOUD T.C., GAENSLER E.A. — Normal chest roentgenograms in chronic diffuse infiltration lung disease. *N. Engl. J. Med.* 1978; 298: 934-939.
- [14] KIPEN H.M., LILIS R., SUSUKY Y., VALCYNKAS J.A., SALIKOFF I.J. — Pulmonary fibrosis in asbestos insulation workers with lung cancer: a radiological and histopathological evaluation. *Br. J. Med.* 1987; 44: 96-100.
- [15] STAPES C.A., GAMSU G., RAY C.S., WEBB W.R. — High resolution computed tomography and lung function in asbestos — exposed workers with normal chest radiographs. *Am. Rev. Resp. Dis.* 1989; 139: 1502-1508.
- [16] MULLER N.L., MILLER R.R. — Computed tomography of chronic diffuse infiltration lung disease. *Am. Rev. Resp. Dis.* 1990; 142: 1206-1215.
- [17] BIGNON J., BONNARD G., JAURAND M.C., GOMI J., DUFOURD G. — Méthod d'isolement et de concentration des "corps ferrugineux" du poumon human. Leur fréquence et leur signification. *J. Franc. Med. Chirug. Thor.* 1970; 1: 71-86.

- [18] SÉBASTIEN P., JAURAND M.C., BONNARD G., GONI J., BIGNON J. — Possibilités actuelles du diagnostic de l'asbestose pulmonaire en utilisant diverses micro-méthodes physico-chimiques pour l'identification des particules fibreuses. *Arch. Mal. Prof.* 1973; 84: 335-344.
- [19] BIGNON J., SÉBASTIEN P., JAURAND M.C., HEM B. — Microfiltration method for quantitative study of fibrosis particles in biological specimens. *Environmental Health Perspectives.* 1974; 9: 155-160.
- [20] BIGNON J., SÉBASTIEN P., GAUDICHET A., BIENTZ M. — Analysis of mineral recovered by bronchoalveolar lavage for diagnosis of dust related lung diseases (Abst.). *Am. Rev. Resp. Dis.* 1978; 117: A218.
- [21] DE VUYST P., JEDWAL J., DUMOSTIER P., VANDERMOTEN G., VANDE WEYER R., YERNAULT J.C. — Asbestos bodies in bronchoalveolar lavage. *Am. Rev. Resp. Dis.* 1982; 126: 972-976.
- [22] DE VUYST P., DUMOSTIER P., MOULIN E., YOURASSAOWSKY N., ROOMANS P., FRANQUEN P., YERNAULT J.C. — Asbestos bodies in bronchoalveolar lavage reflect lung asbestos bodies concentration. *Eur. Resp. J.* 1988; 1: 362-367.
- [23] SÉBASTIEN P., ARMSTRONG B., MONCHAUX G., BIGNON J. — Asbestos bodies in bronchoalveolar lavage fluid and in lung parenchyma. *Am. Rev. Resp. Dis.* 1988; 137: 75-78.
- [24] CHURG A. — Fiber counting and analysis in the diagnosis of asbestos-related disease. *Hum. Pathol.* 1982; 13: 381-382.
- [25] SCHWARTZ D.A. — New developments in asbestos — induced pleural disease. *Chest* 1991; 99: 1991-1998.
- [26] SPURZEN J.R., SALTIN C., ROM W., WINCHESTER R.J., CRYSTAL R.G. — Mechanisms of macrophage accumulation in the lung of asbestos exposed subjects. *Am. Rev. Resp. Dis.* 1987; 136: 276-280.
- [27] BAGANHA M.F., MOTA PINTO A., PÊGO A., MARQUES M.A.T., SOUSA A., MACEDO M., ABREU F., ALCOBIA C., CANÁRIO D., ROBALO CORDEIRO C., LOUREIRO M., FERREIRA M., CHIEIRA L., SANTOS ROSA M.A. — Contribuição de neopterin para o diagnóstico etiológico e para a interpretação patogénica das pleurisas. *O Médico*; 1991; 124: 332-337.
- [28] DHONDT J.L., DARRAS A., MULLIEZ P.H., HAYTE J.M., CRINQUETTE J. — Unconjugated pteridines in bronchoalveolar lavage as indicators of alveolar macrophage activation. *Chest* 1989; 95: 348-351.
- [29] HUBER C., BATCHELOR J.R., FUCHS D., HANSEN A., LONG A., NIEDERWIESER D. — Immune response-associated production of neopterin. Release from macrophages primary under control of interferon-gamma. *J. Exp. Med.* 1984; 160: 310-316.
- [30] TROPFMAIR J., NACHBAUR K., HEROLD M., AULITZKY W., TILG H., GASTL G., BIELING P., KOPTAN B., MULL B., AULITZKY W.O., ROKOS H., HUBER C. — In vitro and in vivo studies on the induction of neopterin biosynthesis by cytokines, alloantigenes and lipopolysaccharise (LPS). *Clin. Exp. Immunol.* 1988; 74: 392-397.
- [31] RITCHIE J.C., SMITH S.F., CASTOR C.W. — Measurement of urinary and serous-fluid glycosaminoglycans and urinary hydroxyproline. *Am. J. Clin. Pathol.* 1977; 67: 585-590.
- [32] AMMITZBOLL T., PEDERSEN S.S., ESPERSEN F., SHIOLER H. — Excretion of urinary collagen metabolites correlates to severity of pulmonary disease in cystic fibrosis. *Acta Paediatr. Scand.* 1988; 77: 842-846.
- [33] ASKENASI R., RAO V.H., DEVOS A. — Peptide-bound hydroxylysine and large polypeptides related to collagen synthesis. *Eur. J. Clin. Invest.* 1976; 6: 361-3363.
- [34] ANDO A., NITTA K., ANDO I., SANADA S., KATSUDA S., TONAMI N., HIRAKI T., HISADA K., OGAWA H. — Mechanism of gallium 67 accumulation in inflammatory tissue. *Eur. J. Nucl. Med.* 1990; 17: 21-27.
- [35] ROBALO CORDEIRO A.J.A. — Alveolites subclínicas. *Rev. Port. Imunoalerg.* (Em publicação).