

ELIAS DAVID DAHAN

**VERIFICAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA  
DA ALFA-1-ANTITRIPSINA E DO FATOR DE NECROSE TUMORAL  
COM A ASMA BRÔNQUICA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Sidney Emanuel Batista dos Santos.

BELÉM

2004

ELIAS DAVID DAHAN

**VERIFICAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA  
DA ALFA-1-ANTITRIPSINA E DO FATOR DE NECROSE TUMORAL  
COM A ASMA BRÔNQUICA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Sidney Emanuel dos Santos.

BELÉM

2004

ELIAS DAVID DAHAN

VERIFICAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DA ALFA-1-  
ANTITRIPSINA E DO FATOR DE NECROSE TUMORAL COM A ASMA  
BRÔNQUICA

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários da Universidade Federal do Pará, pela comissão formada pelos professores:

Orientador: Prof. Dr. Sidney Emanuel Batista dos Santos  
Centro de Ciências Biológicas da UFPA

Prof. Dr. Antonio Carlos Rosário Vallinoto  
Centro de Ciências Biológicas da UFPA

Prof. Dr. João Farias Guerreiro  
Centro de Ciências Biológicas da UFPA

Profa. Dra. Ândrea Kely Campos Ribeiro dos Santos  
Centro de Ciências Biológicas da UFPA

Belém, 28 de Maio de 2004

## EPÍGRAFE

Ao velho que queria aprender mais e à  
criança que queria voltar para a escola.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu bom Deus que me concedeu muito, incluindo esta escola, cheia de amigos, para a qual eu poderei sempre retornar, conviver e aprender com todos.

À minha família pelo incentivo e apoio, dados em todos os momentos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Sidney Emanuel Batista dos Santos, pelos ensinamentos, atenção e apoio na execução deste trabalho.

À Profa. Dra. Ândrea Kely Campos Ribeiro dos Santos, pela atenção, ensinamentos e estímulo.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Rosário Vallinoto, pelos ensinamentos, estímulo e amizade.

Aos colegas da turma de Pós-graduação pela colaboração e amizade.

Aos meus pacientes, pela gentileza em colaborar com este projeto.

## SUMÁRIO

	páginas
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	viii
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	ix
<b>LISTA DE TABELAS</b>	xi
<b>RESUMO</b>	xii
<b>ABSTRACT</b>	xiii
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>01</b>
1.1. SÍNTESE E SECREÇÃO DA A1AT	02
1.2. AS FUNÇÕES DA A1AT	03
1.3. ESPECIFICIDADE DA EXPRESSÃO	05
1.4. MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO	06
1.5. BASES MOLECULARES DA DAAT	07
1.6. ESTRUTURA DO GENE DA A1AT	09
1.7. EVOLUÇÃO DO GENE DA A1AT	11
1.8. GENÓTIPOS E FENÓTIPOS DA A1AT	13
1.9. DEFICIÊNCIA DE A1AT: PATOGENIA	18
1.10. BIOQUÍMICA DA INIBIÇÃO DE PROTEASES	20
1.11. TRATAMENTO DE REPOSIÇÃO	22
1.12. EPIDEMIOLOGIA E PREVALÊNCIA	22
1.13. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	23
1.14. ASMA, HIPERREATIVIDADE BRÔNQUICA E A1AT	25
1.15. PATOGENIA DA ASMA	26
1.16. UNIDADE TRÓFICA, A1AT E ASMA	28
1.17. POLIMORFISMOS ASSOCIADOS À ASMA BRÔNQUICA	30
1.18. TNF- $\alpha$ E ASMA	33
1.19. TNF E O PROCESSO DE BRONCOESPASMO	35
1.20. OBJETIVOS	37
1.20.1 Objetivo Geral	37
1.20.2 Objetivos Específico	37
<b>2. MATERIAL E MÉTODO</b>	<b>38</b>
2.1. POPULAÇÃO INVESTIGADA	38
2.2. CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS	38

2.3.	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	38
2.4.	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	39
2.5.	PROCEDÊNCIA DAS AMOSTRAS	39
2.6.	ANÁLISE MOLECULAR DAS AMOSTRAS	40
2.6.1.	EXTRAÇÃO DE DNA	40
2.6.2.	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE	41
2.6.3.	POLIMORFISMOS DE RESTRIÇÃO (RFLP)	42
2.6.4.	ELETROFORESE E VISUALIZAÇÃO	42
2.6.5.	TESTES ALÉRGICOS	44
2.6.6.	PROVA FUNCIONAL RESPIRATÓRIA	44
2.6.7.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS</b>	46
3.1.	PACIENTES ASMÁTICOS TESTADOS PARA A1AT	46
3.2.	PACIENTES ASMÁTICOS TESTADOS PARA O TNF- $\alpha$ (-308G/A)	51
<b>4.</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	55
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	59
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	61
	<b>ANEXO</b>	74

**LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>A1AT</b>	Alfa-1-antitripsina
<b>DAAT</b>	Deficiência de Alfa-1-antitripsina
<b>PI</b>	Sistema de genes inibidores de proteases
<b>PI 1</b>	Sistema 1 de inibidores de proteases
<b>Pi MM</b>	Homozigoto MM
<b>Pi ZZ</b>	Homozigoto ZZ
<b>DPOC</b>	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
<b>ABAEx</b>	Asma brônquica extrínseca
<b>HB</b>	Hiperreatividade brônquica
<b>RFPL</b>	Polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição
<b>VEF1</b>	Volume expiratório máximo no primeiro segundo
<b>TNF</b>	Fator de necrose tumoral.
<b>TNFSF2</b>	Fator de necrose tumoral superfamília 2; TNF- $\alpha$ .

**LISTA DE FIGURAS**

Página		
Figura 1	- Mecanismo patogênico da DAAT	05
Figura 2	- Localização cromossômica do gene da A1AT	07
Figura 3	- Estrutura do gene da A1AT	09
Figura 4	- Locais de mutação no gene da A1AT	10
Figura 5	- Esquema da evolução das formas variantes de A1AT.	12
Figura 6	- Cirrose macronodular	23
Figura 7	- A1AT polimerizada no hepatócito	24
Figura 8	- A1AT polimerizada em paciente com genótipo ZZ	24
Figura 9	- Mecanismos patogênicos da asma	26
Figura 10	- Ácaro aeroalérgeno	27
Figura 11	- A asma como inflamação	29
Figura 12	- Fibrose subepitelial	29
Figura 13	- Unidade trófica epitélio-mesenquimal	30
Figura 14	- Esquema do gene do TNF- $\alpha$	34
Figura 15	- Ações pro-inflamatórias do TNF	36
Figura 16	- Esquema do perfil eletroforético da A1AT	43
Figura 17	- Esquema do perfil eletroforético do TNF- $\alpha$	43
Figura 18	- Distribuição de asmáticos de acordo com o sexo	46
Figura 19	- Distribuição de asmáticos de acordo com a idade	47

Figura 20 - Distribuição de asmáticos de acordo com o nível de severidade	48
Figura 21 - Distribuição genotípica por nível de severidade	48
Figura 22 - Distribuição dos resultados dos testes alérgicos	50
Figura 23 - Distribuição dos valores médios dos parâmetros respiratórios	51
Figura 24 - TNF- $\alpha$ (-308 G/A):Distribuição genotípica	52
Figura 25 - TNF- $\alpha$ (-308 G/A): distribuição segundo a severidade	52

**LISTA DE TABELAS**

Página	
Tabela 1 - Alelos Normais da A1AT	15
Tabela 2 - Alelos Deficientes e Disfuncionais da A1AT	15
Tabela 3 - Alelos Nulos da A1AT	16
Tabela 4 - Distribuição Fenotípica em Diversas Populações	17
Tabela 5 - Polimorfismos genéticos Associados à Asma	31
Tabela 6 - Graus de Severidade da Asma	32
Tabela 7 - Concentração e seqüência dos Iniciadores	41
Tabela 8 - Condições para Análise de RFLP	42
Tabela 9 - A1AT: Distribuição genotípica e F. alélicas	53
Tabela 10 - TNF- $\alpha$ : Distribuição genotípica nos asmáticos	54
Tabela 11 - Resultados dos testes estatísticos	75
Tabela 12 - Regressão logística simples	
75	

## RESUMO

A asma brônquica é uma desordem inflamatória crônica, complexa, na qual estão envolvidos fatores genéticos e ambientais. A inflamação das vias aéreas na asma é regulada, predominantemente, por células do sistema imunológico e por uma vasta rede de citocinas que interagem mutuamente e com as vias aéreas. O exato desempenho funcional de cada citocina na fisiopatologia da asma ainda necessita ser completamente estabelecido. A presente investigação teve como objetivo comparar a distribuição dos alelos S e Z do gene da A1AT e do polimorfismo do gene do TNF- $\alpha$  (-308 G/A) em uma população de 110 asmáticos, divididos em dois níveis de severidade da asma (com 54 pacientes no nível da doença moderada persistente e 56 pacientes no nível da doença severa persistente). Os genótipos da A1AT e do TNF- $\alpha$  (-308 G/A) foram determinados pela técnica de digestão enzimática (polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição). O polimorfismo no promotor do gene do fator de necrose tumoral TNF- $\alpha$  (-308G/A), citocina pro-inflamatória que participa da reação inflamatória em pacientes com asma, contribuindo para a hiperreatividade brônquica, não foi na presente investigação, associado com a doença ou com o aumento da hiperreatividade brônquica, nos níveis de severidade sintomática mais graves da doença.

## ABSTRACT

Asthma is a complex chronic inflammatory disorder in which genetic and environmental factors are involved with the remodeling extracellular matrix. The present study had aim to describe, through genetic methods, the prevalence of both S and Z alpha 1-antitrypsin alleles and the TNF- $\alpha$  (-308) genetic polymorphism, associated with the spectrum of asthma severity levels. A total of 110 asthmatics recruited random sample for a physical examination, determination of cutaneous sensibility with prick test, determination of respiratory parameters (forced expiratory volume in the first second and vital capacity) and DNA analysis by polymerase chain reaction and RFLP, completed this study. The patients was divided in two groups, 54 with moderated asthma and 56 with severe asthma. The genotype distribution of the deleterious variants of alpha 1 - antitrypsin may contribute to the severe persistent level of asthma. The TNF- $\alpha$  (-308 G/A) heterozygotes is not significantly associated with asthma.

## 1. INTRODUÇÃO

A deficiência de alfa-1-antitripsina (DAAT) é uma desordem hereditária, autossômica recessiva, causada por mutações no gene da Alfa-1-antitripsina (A1AT), um gene de 12.2 kb, localizado no segmento distal do braço longo do cromossomo 14 (14q32.1) ( Crystal *et al.*, 1996).

A DAAT severa é caracterizada pela redução do nível sérico de A1AT, o que determina um risco crescente de desenvolvimento precoce de enfisema pulmonar e/ou de acumulação de polímeros de A1AT nos hepatócitos, o que pode promover hepatopatia grave na criança e no adulto (Perlmutter *et al.*, 2000).

A primeira observação sobre a DAAT, foi feita casualmente em doentes pulmonares crônicos internados que apresentavam um decréscimo da alfa-1-globulina sérica (Laurell, 1963; Eriksson, 1964; Eriksson, 1965). Naquele período, era conhecido que 90% da banda eletroforética da alfa-1-globulina era constituída por uma só proteína capaz de inibir a tripsina, e foi então decidido usar a designação de Deficiência de alfa-1-antitripsina para definir o quadro clínico apresentado (Jakobsson, 1955; Schultz, 1962).

Foi, entretanto, após a observação de muitos casos e os trabalhos experimentais de Gross *et al.* (1965) e Janoff *et al.* (1979) que a função da A1AT tornou-se bem esclarecida.

No final da década de 60, Janoff *et al.* (1968) descobriram que o mais importante e natural alvo da A1AT, a elastase, a quem é imputada a destruição pulmonar, era transportada e liberada pelos neutrófilos. A enzima passou a ser denominada ELASTASE NEUTROFÍLICA ou ELASTASE 2.

A base genética da DAAT grave só foi claramente definida, após a clonagem e sequenciamento do gene da A1AT por Long *et al.* (1981) e a clonagem e sequenciamento da variante Z por Nukiwa *et al.* (1986).

A patogenia do enfisema associado a DAAT foi definitivamente esclarecida por Gadeck *et al.*, (1981), que demonstraram que os níveis de A1AT eram baixos nos fluidos pulmonares de enfisematosos, tanto quanto era reduzida a capacidade desses fluidos de inibir a elastase.

Gadek *et al.* (1981) e Wewers *et al.* (1987) mostraram que a administração em circulação de A1AT purificada aumentava os níveis da A1AT

nos pulmões. Como resultado desses estudos tornou-se possível o uso de preparado purificado de A1AT, no caso de risco potencial de enfisema pulmonar da DAAT.

A Alfa-1-antitripsina (A1AT) é um dos mais importantes inibidores plasmáticos de proteases. É o inibidor mais abundante em circulação e pode ser inativado por mutações, o que favorece a sua transição para uma forma polimérica patogênica (Long *et al.*, 1984; Crystal *et al.*, 1989).

A A1AT é um inibidor de protease pertencente à superfamília das serpinas, cujo substrato fisiológico mais importante é a elastase dos neutrófilos (Cox *et al.*, 1990). A A1AT, produzida e secretada, basicamente, pelo fígado, é uma glicoproteína com peso molecular de 52 kD. A função da A1AT é inibir a potente ação de degradação da elastase sobre a elastina e outras proteínas da matriz celular (Underhill & Hammond, 1989).

A A1AT é uma antienzima da família das serpinas (inibidoras de proteases) que inclui, ainda: Alfa-1-antiquimiotripsina (A1AQT), Alfa-1-antiplasmina, Inibidores 1 e 2 da ativação do plasminogênio, Antitrombina III, Cofator II da heparina, Inibidor ativo da proteína C, Inibidor de C1, Globulina de ligação da tiroxina, Globulina de ligação do cortisol, Angiotensina, Protease nexina-1, Calistatina e Inibidores de leucócitos (Crystal *et al.*, 1989).

O gene da A1AT tem uma grande variabilidade genética e até recentemente já foram caracterizadas, pelo padrão de migração eletroforética, cerca de 100 variantes (De Serres, 2002; Eden *et al.*, 2003).

### 1.1. SÍNTESE E SECREÇÃO DA A1AT

A secreção diária de A1AT no soro é de, aproximadamente, 34 mg/kg de peso. As moléculas glicosiladas tem no soro uma vida média de 4 a 5 dias (Jones *et al.*, 1978; Jeppsson *et al.*, 1978).

A molécula da A1AT é globular com um sítio inibitório ativo localizado em uma protrusão de sua superfície (Loebermann *et al.*, 1984).

A A1AT é sintetizada no fígado, nos monócitos do sangue e nos macrófagos alveolares (Laurell *et al.*, 1975). Outros locais mostram um baixo grau de expressão de A1AT: rins, pulmões e intestino delgado, locais onde a A1AT é requerida (Perlmutter *et al.*, 1989).

Os neutrófilos sintetizam e secretam 40 a 80 vezes menos A1AT do que os monócitos, mas são capazes de armazenar e liberar em minutos a A1AT depois do estímulo na membrana (Perliner *et al.*, 1990).

Os monócitos sintetizam a A1AT como polipeptídeos precursores glicosilados de 48 a 52 kDa e os converte em polipeptídeo funcionalmente ativo de 53 kDa, pronto para a secreção num tempo médio de 40 a 50 minutos (Perlmutter *et al.*, 1985).

A A1AT é produzida também no epitélio gastrointestinal, e nas células dos ductos pancreáticos e das parótidas (Carlsson *et al.*, 1988). Nos neutrófilos, onde a elastase e a A1AT estão empacotadas no mesmo grânulo primário, ocorre a interação enzima-inibidor dentro dos fagolisossomos, para evitar o dano celular interno.

## 1.2. AS FUNÇÕES DA ALFA 1 - ANTITRIPSINA

A A1AT é uma proteína predominantemente sérica, que entra no pulmão por difusão passiva. O endotélio pulmonar é, relativamente permeável, permitindo concentrações intersticiais de até 80% da concentração encontrada no plasma, enquanto que o epitélio apresenta-se mais impermeável, permitindo concentrações aproximadas de até 1/10 da concentração no plasma (Stockley *et al.*, 1999). A integridade do tecido pulmonar tende a ser mantida em função do balanço entre a concentração e funcionalidade do inibidor (A1AT) e a concentração da elastase neutrofílica, eventualmente liberada na forma ativa.

A destruição do pulmão tem sido em geral creditada, a ação da elastase no espaço intersticial. O dano proteolítico deve se circunscrever a uma área perto do grânulo liberado.

A elastase dos neutrófilos é estocada nos grânulos azurófilos dos neutrófilos polimorfonucleares maduros, e são excitados durante a ativação da

célula, liberando, então, na forma ativa, o seu conteúdo enzimático que se difunde exponencialmente para longe do grânulo.

A concentração de elastase desses grânulos é aproximadamente 5mM, portanto, duas ordens de magnitude maior que a concentração de A1AT no plasma (30  $\mu$ M) ou da concentração no interstício (24  $\mu$ M).

Esta diferença de concentração mostra porque os neutrófilos são capazes de digerir o tecido conectivo, mesmo em concentrações normais de A1AT. Liou *et al.* (1995) descreveram este processo, quantificando a proteólise e desenvolveram um modelo matemático para determinar a concentração de elastase e a sua difusão a partir do grânulo azurófilo. Estes autores concluíram que a enzima mantém a sua capacidade proteolítica, mesmo se a sua concentração cair para valor aproximadamente igual ao da antiprotease. A consequência mais importante dessa observação é que a concentração de elastase (cerca de 10  $\mu$ M) retida numa grande área, decresce até valores iguais ao da A1AT somente nos indivíduos normais e nos deficientes heterozigotos e, o único fenótipo com concentração sérica inferior a 10  $\mu$ M é o ZZ, cuja concentração média no plasma é de 5  $\mu$ M e no interstício , 4  $\mu$ M.

A susceptibilidade individual dos deficientes de A1AT, acrescido do fenômeno de recrutamento de neutrófilos através do interstício, que ocorre em circunstâncias patológicas, como nas infecções (agudas ou crônicas, nos deficientes de A1AT com colonização bacteriana brônquica crônica), explicam como estes indivíduos experimentam desenvolvimento rápido e extenso de destruição pulmonar (Hill *et al.*, 2000).

Para produzir um fenótipo anormal, as duas mutações mais comuns são as denominadas Z e S. O alelo Z contém uma mutação G/A no éxon V, que resulta na troca do ácido glutâmico na posição 342, pela lisina. A consequência desta mutação é o rompimento de ponte sulfidrílica dentro da molécula, levando-a a uma conformação anormal e à acumulação no retículo endoplasmático (Brantly *et al.*, 1988).

A Figura 1 mostra esquematicamente o mecanismo patogênico do desgaste pulmonar.

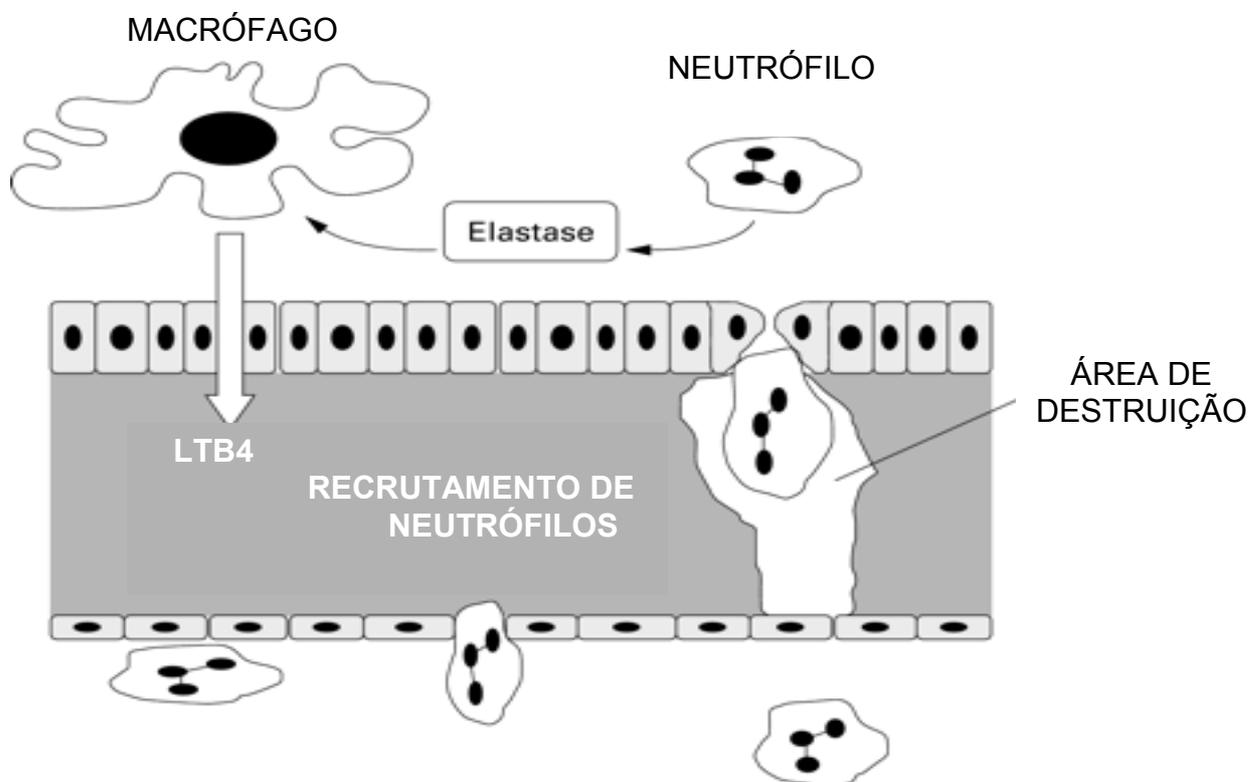


Figura 1– Mecanismo patogênico sugerido para a destruição pulmonar na deficiência de A1AT. A ativação dos neutrófilos das vias aéreas, seguida da degranulação dos mesmos, liberando a elastase que se torna ativa. A elastase estimula os macrófagos a liberar LTB4 (leucotrieno B4), quimiotático que recruta mais neutrófilos. O recrutamento através do interstício causa destruição do tecido conectivo (particularmente da elastina), e a área de destruição é então aumentada por consequência direta da deficiência de A1AT. O resultado é uma perpetuação do ciclo de eventos e destruição do tecido pulmonar (Stockley, 2000).

### 1.3. ESPECIFICIDADE DA EXPRESSÃO

A síntese de proteínas da fase aguda do processo inflamatório, ocorre predominantemente no fígado. Os hepatócitos contém duzentas vezes mais mRNA da A1AT do que qualquer outra célula. O restante é sintetizado e secretado pelos enterócitos, fagócitos mononucleares e neutrófilos (Carlson *et al.*, 1988; Koopman *et al.*, 1989; Molmenti *et al.*, 1993). O éxon 1c é o sítio de

iniciação da transcrição específica nos hepatócitos, enquanto que o éxon Ia, tem a mesma função nas outras células.

De experiências *in vitro* concluiu-se que é um promotor localizado entre -137 pb a -2 pb do iniciador de transcrição que determina a especificidade da transcrição no fígado. Para a transcrição é também importante um elemento A (-119 a -104), um elemento B (-77 a 64) e um TATA box (TAAAT). Mutações no TATA box inibem completamente a transcrição (Monaci *et al.*, 1988).

#### 1.4. MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO

Como a A1AT é uma proteína de fase aguda das inflamações, sintetizada predominantemente no fígado, cujo nível sérico aumenta cerca de quatro vezes em resposta a danos diversos (Dickson & Alper, 1974), está demonstrado que a expressão do gene da A1AT é regulado nos hepatócitos pela interleucina 6, mediador predominante da resposta de fase aguda. A IL-6 induz um aumento dos níveis de mRNA de A1AT e da síntese de proteínas nas células hepáticas. Outras citocinas, incluindo IL-1 e TNF, que também participam da resposta de fase aguda, não tem qualquer efeito sobre a transcrição de A1AT.

Em culturas de monócitos de sangue periférico, a IL-6 induz a transcrição de A1AT e a síntese de proteínas. Nos hepatócitos, em condições basais, a transcrição é iniciada no éxon Ic, após a indução da transcrição com IL-6, e o sítio inicial da transcrição pode ser também detectada no éxon Ia. Nos fagócitos mononucleares a transcrição é iniciada quase sempre no éxon Ia (Perlmutter & Punsal, 1988).

O gene da A1AT pode também ser regulado pela elastase neutrofílica e por lipopolissacarídeos. A elastase, em nível transcricional e a LPS, aumentando a transcrição do gene, sem modificações no nível de mRNA (Perlmutter & Punsal, 1988).

### 1.5. BASES MOLECULARES DA DAAT

O gene da A1AT é um segmento de 12.2 kb, localizado no braço longo do cromossomo 14, na região q32.1 (Figura 2). Ele é composto de sete éxons (designados IA, IB, IC, II, III, IV e V) e seis íntrons (Long *et al.*, 1984; Crystal *et al.*, 1989). Os éxons não-codificadores da proteína (IA, IB e IC), são assim designados por não serem transcritos nos hepatócitos, mas somente nos macrófagos e monócitos.

A região codificadora propriamente dita, da proteína A1AT, está contida nos éxons II, III, IV e V (Long *et al.*, 1984; Perlino *et al.*, 1987).

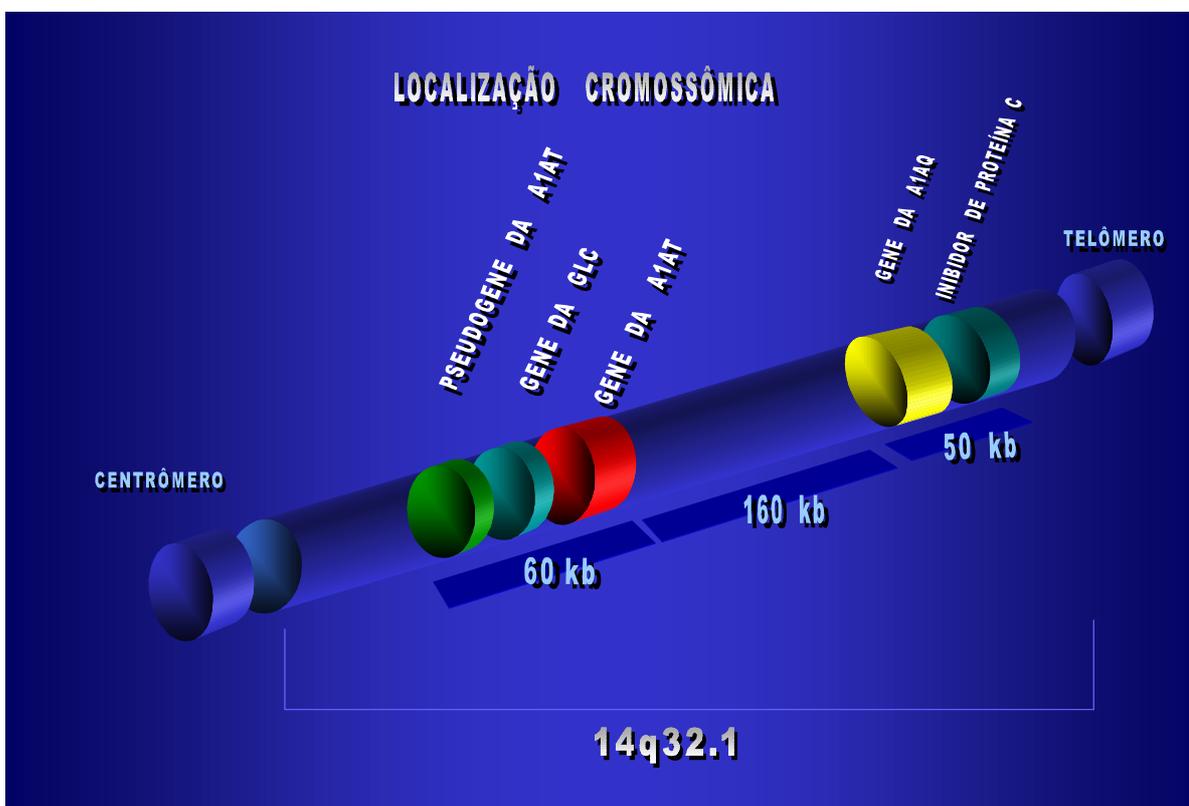


Figura 2 – Esquema representativo da localização do gene da A1AT no cromossomo 14 .

Vários genes das serpinas formam um grupo de 270 kb no cromossomo 14 (14q32.1), incluindo o da globulina de ligação dos

corticosteróides, o pseudogene semelhante ao da A1AT, o gene da A1AT, o do inibidor da proteína C e o da A1AQT – ordenados do centrômero para o telômero (Byth *et al.*, 1994). Estes genes, nesse *locus* têm organização e seqüência similar, sugerindo evolução a partir de um ancestral comum.

Os genes da A1AT, A1QT e da globulina de ligação dos corticosteróides, tem 56% de homologia de seqüência (Chandra *et al.*, 1953), e compartilham um ou dois sítios de restrição, que originam fragmentos de restrição de tamanhos quase idênticos e que hibridizam cruzadamente com as mesmas sondas (Billingsley *et al.*, 1993). O gene da globulina de ligação dos corticosteróides, tem 56% de homologia com o gene dos inibidores de proteases (cuja função é muito diferente) (Underhill & Hammond, 1989).

A homologia elevada sugere a evolução desta região, a partir de um gene ancestral comum, provavelmente, por duplicação.

## 1.6. ESTRUTURA DO GENE DA A1AT

O gene da A1AT codifica uma proteína de 418 aminoácidos (Figura 3 e 4). A região codificadora da A1AT está entre os éxons II e V (Long *et al.*, 1984). No éxon V está a codificação da Met<sup>358</sup>, sítio ativo inibitório da protease (Loebermann *et al.*, 1984). Os éxons IA, IB e IC codificam elementos de transcrição.

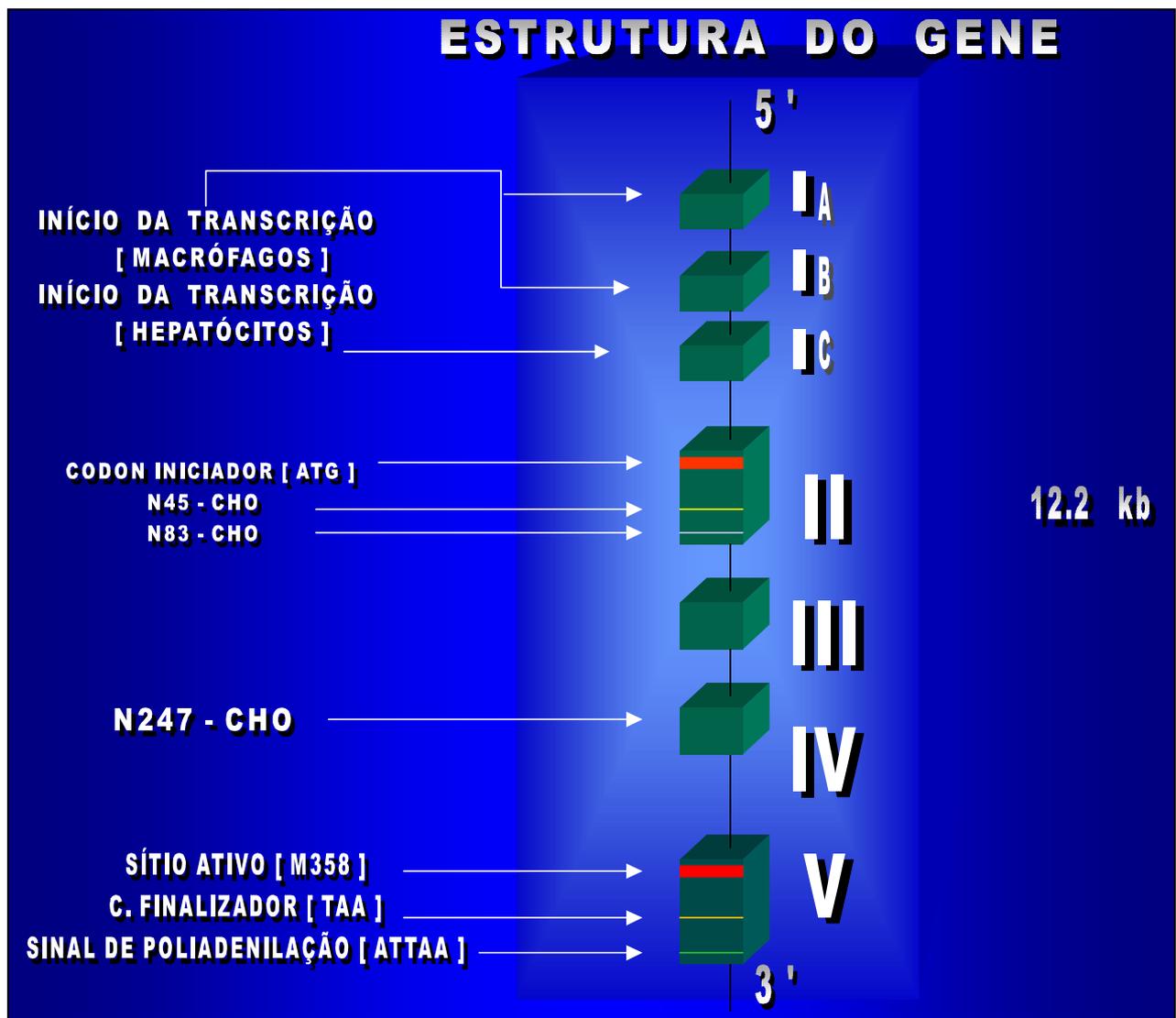


Figura 3 - Esquema representativo da estrutura do gene da A1AT



A transcrição do gene da A1AT resulta em três tipos de mRNA: 1,6 kb (exclusivo dos hepatócitos e enterócitos) codificado a partir do éxon IC; e os de 1,8 e 2,0 kb (exclusivos dos fagócitos mononucleares) codificados a partir dos éxons IA e IB, respectivamente.

O pseudogene da A1AT, caracterizado pela presença de uma mutação crítica no codon iniciador (ATG→ATA) (Hofker *et al.*, 1988), tem grande similaridade com o gene da A1AT, havendo cerca de 70% de homologia, incluindo éxons e íntrons. Este pseudogene está situado a 12 kb do gene autêntico (Hofker *et al.*, 1988; Bao *et al.*, 1988).

O centro do sítio ativo da molécula de A1AT é a Met<sup>358</sup> (Loebermann *et al.*, 1984). Quando este é transformado em sulfóxido de metionina ou em sulfona, a constante de associação é fortemente reduzida (Hubbard *et al.*, 1987). A importância biológica desse fenômeno é muito grande, porque os neutrófilos e macrófagos alveolares do trato respiratório baixo podem liberar oxidantes e o pulmão está sempre exposto a oxidantes inaláveis (Gadek *et al.*, 1978).

A proteína anormal resultante tem susceptibilidade à degradação intracelular (Curiel *et al.*, 1989).

## 1.7. EVOLUÇÃO DO GENE DA A1AT

As semelhanças e diferenças dos genes da A1AT entre diferentes espécies de mamíferos já foram parcialmente estabelecidas. Há uma grande quantidade de informações e estudos evolucionários, quanto às variações dentro da superfamília das serpinas, especialmente com relação a A1AT. Semelhanças entre a estrutura éxon-íntron da A1AT e A1QT e, o fato de estarem próximas no cromossomo 14q31, são indicativas de que ocorreu uma divergência muito recente desses genes (100 a 250 milhões de anos).

Éxons codificadores (II a V) de chimpanzés e gorilas, foram recentemente seqüenciados. A diferença de apenas um aminoácido foi demonstrada entre a A1AT humana M1 (Ala<sup>213</sup>) e a A1AT do chimpanzé (Bao *et al.*, 1987). A clonagem de variantes de A1AT normal e deficiente revelou a existência de três substituições de aminoácidos (Arg<sup>101</sup>/His, Ala<sup>213</sup>/Val e

Glu<sup>376</sup>/Asp). Utilizando essas combinações haplotípicas, foi possível construir a relações de ancestralidade mostradas na Figura 5 (Crystal *et al.*, 1989).

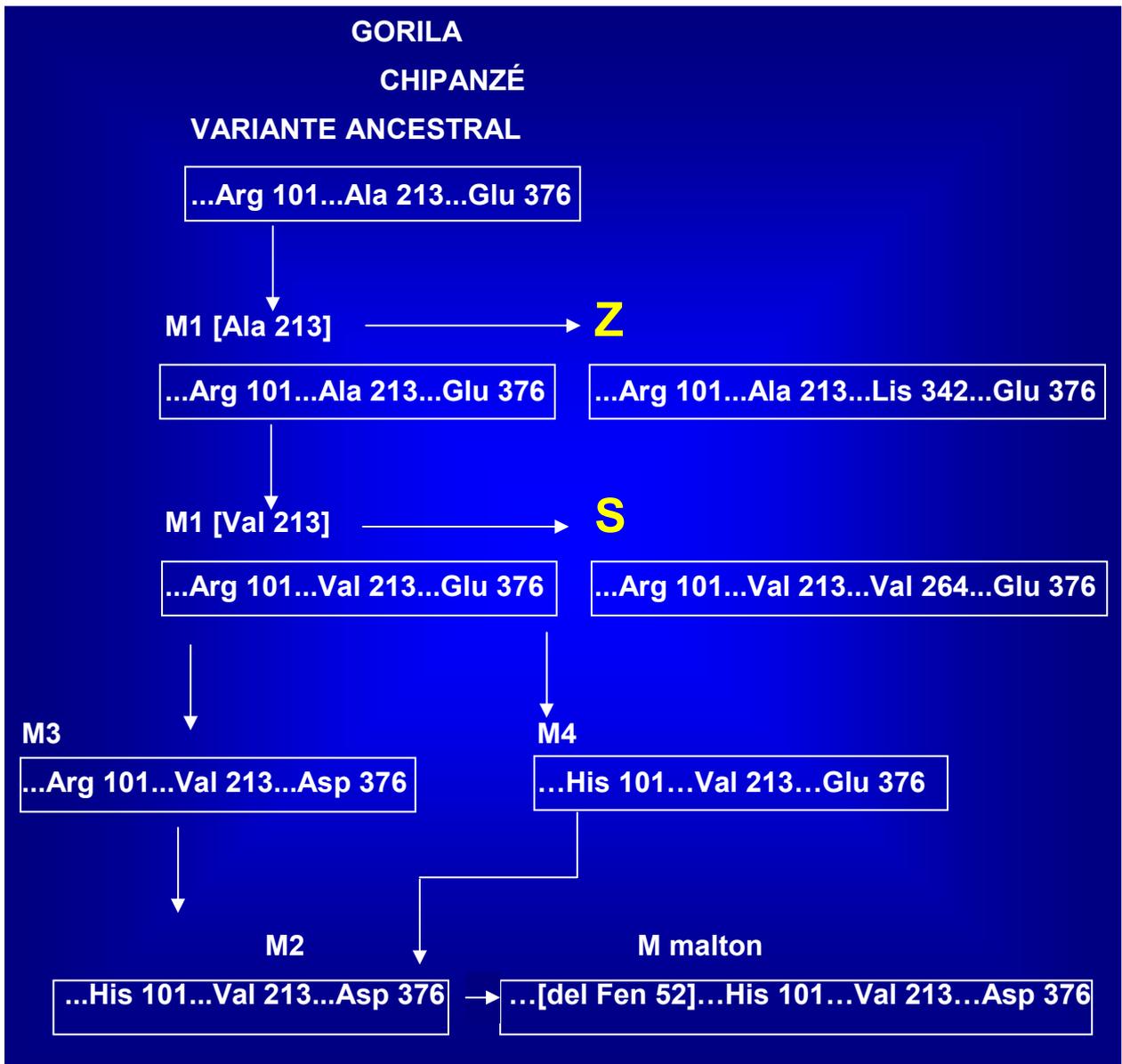


Figura 5 – Esquema da evolução do gene da A1AT segundo Crystal *et al.*, (1989).

## 1.8. GENÓTIPOS E FENÓTIPOS DE A1AT

Laurell e Erickson, em 1963, descobriram que o enfisema e a ausência de alfa-1-globulina, eram características que poderiam ser transmitidas através das gerações.

Axelsson e Laurell (1965), demonstraram evidências que os levaram a supor que se tratava de um sistema tri-alélico codominante.

Fagerhol e Braend (1965), utilizando uma nova técnica de eletroforese, a isoeletrofocalização, determinaram que as variações na região da pré-albumina resultavam das variantes eletroforéticas da A1AT. Juntas, essas variantes formam o sistema alélico que passou a ser denominado Sistema Pi (ou inibidor de proteases). Como extensão, o termo Pi\* passou a designar o *locus* da A1AT.

No sistema Pi as variantes foram, inicialmente, denominadas segundo a velocidade de migração eletroforética e, assim, divididas em quatro grupos: média (M), rápida (F), lenta (S) e muito lenta (Z).

Muitas outras variantes Pi foram, posteriormente, identificadas por diferenças presumíveis, na substituição de aminoácidos. Na década de 80, o conhecimento das bases moleculares da variação da A1AT, avançou substancialmente com a clonagem, o seqüenciamento de segmentos de DNA e a reação em cadeia da polimerase.

Atualmente, as variantes tem denominações de acordo com a migração característica em gel de isoeletrofocalização em pH 4-5. As mais anódicas ganham letras iniciais do alfabeto e, as mais catódicas, letras do final.

A isoeletrofocalização (IEF) demonstrou pleomorfismo entre as variantes e, heterogeneidade em uma mesma variante. Os sub-índices numéricos correspondem aos padrões de bandejamento na imunoeletroforese cruzada, e algumas bandas vistas por esta técnica, não são observadas na IEF. As bandas não vistas na IEF são as 1, 3 e a 5. As maiores bandas são a 4 e a 6 e, as menores a 2, a 7 e a 8.

As bandas 2, 4 e a 6, migram diferentemente por causa de diferentes graus das cadeias laterais de carboidratos. As bandas 7e8 são semelhantes na

composição de carboidratos, mas diferem no padrão da migração porque 5 aminoácidos foram clivados do N-terminal de ambas (Jeppsson *et al.*, 1995).

O alelo Z da DAAT tem um único haplótipo que inclui a globulina de ligação do cortisol, o pseudogene da A1AT, e o gene da A1AT, em *loci* de 60 kb. Isso sugere que o alelo Z ocorre como evento isolado e que essa relação com o gene da globulina de ligação do cortisol (ou outros genes) deve explicar algumas das associações da DAAT com outras doenças, tais como a Artrite reumatóide, Paniculite ulcerativa, Asma brônquica, doenças de complexos imunes e certas formas de câncer.

Há muitos alelos normais e pelo menos quatro, migram entre as variantes médias (M1, M2, M3 e M4).

Por convenção, decidiu-se designar as novas variantes mais raras com a combinação da letra da variante mais próxima e a cidade do portador mais antigo da variante (Cox *et al.*, 1990).

As variantes que não tem A1AT detectável no soro são chamadas nulas e, designadas QO (Tabela 3).

Sob critérios clínicos as variantes da A1AT são divididas em 3 categorias:

- 1) Normais – com nível sérico normal e não-associadas a risco de pneumopatia e hepatopatia;
- 2) Deficientes – associadas com níveis séricos reduzidos, mas detectáveis e com risco de pneumopatia e/ou hepatopatia;
- 3) Disfuncionais – associadas com função alterada (em geral A1AT Pittsburgh e as variantes nulas) sem contribuição na concentração sérica da A1AT e associadas ao risco de pneumopatia.

Deficiência de A1AT é um termo relativo ao nível sérico igual ou abaixo do limite de 11 $\mu$ M, que é o limite máximo para a categoria de deficiente, baseado na concentração sérica do fenótipo PiSZ (Wewers *et al.*, 1987).

As Tabelas 1,2 e 3 mostram os alelos da A1AT.

Tabela 1 – Alelos Normais da A1AT segundo Crystal *et al.*, 1989.

<b>ALELO</b>	<b>ALELO BASE</b>	<b>ÉXON</b>
M1 [Ala 213]		
M1 [Val 213]	M1 [Ala 213]	III
M3	M1 [Val 213]	V
M2	M3	II
M2 oberenburg	M1 [Ala 213]	II
M4	M1 [Val 213]	II
M5 karlsruhe	M1 [Val 213]	II
M5 berlin	M1 [Val 213]	II
M6	M1 [Val 213]	II
L frankfurt	M2	II, III
L offenbach	M1 [Val 213]	V
V	M1 [Val 213]	II
V donauworth	M1 [Val 213]	V
P st. Albans	M1 [Val 213]	III, V
X	M1 [Val 213]	III
X Christchurch	Desconhecido	Desconhecido
V munich	M1 [Val 213]	II
B alhambra	Desconhecido	Desconhecido
P st. Louis	M2	III

Tabela 2 – Alelos Deficientes e Disfuncionais da A1AT segundo Crystal *et al.*, 1989.

<b>ALELO</b>	<b>ALELO BASE</b>	<b>ÉXON</b>
F	M1 [Val 213]	III
Z	M1 [Ala 213]	V
T	M2	III
S	M1 [Val 213]	III
M malton	M2	II
M mineral springs	M1 [Ala 213]	II
M procida	M1 [Val 213]	II
W bethesda	M1 [Ala 213]	V
I	M1 [Val 213]	II
M palermo	M1 [Val 213]	II
M nichinan	M1 [Val 213]	II
P lowel	M1 [Val 213]	III
P duarte	M4	III
S siiyama	M1 [Val 213]	II
Z ausburg	M2	V
P pittsburgh	Desconhecido	

Tabela 3 – Alelos Nulos da A1AT segundo Crystal *et al.*, 1989.

<b>ALELO</b>	<b>ALELO BASE</b>	<b>EXON</b>
QO granite falls	M1 [Ala 213]	II
QO bellinham	M1 [Val 213]	III
QO mattawa	M1 [Val 213]	V
QO bolton	M1 [Val 213]	V
QO hong kong	M2	IV
QO ludwigshafen	M2	II
QO isola di procida	Desconhecido	II - V
QO clayton	M1 [Val 213]	V
QO bonny blue	M1 [Val 213]	[INTRON]
QO new hope	M1 [Ala 213]	IV,V
QO trastevere	M1 [Val 213]	III
QO kowloon	M1 [Val 213]	II
QO saarbruecken	M1 [Ala 213]	V
QO lisbon	M1 [Val 213]	II
QO reidenburg	Desconhecido	II - V
QO west	M1 [Val 213]	[INTRON]

Na Tabela 4 está relacionada a distribuição dos fenótipos da A1AT em algumas populações de origem européia. Em todas as populações investigadas, o alelo Pi M1 é o mais freqüente, enquanto que o segundo mais prevalente, na maioria das populações, é o PI M2 .

Tabela 4 - Distribuição Fenotípica de A1AT em diversas populações de origem europeia.

GENÓTIPOS	POPULAÇÕES							
	1	2	3	4	5	6	7	8
M1M1	93	225	78	63	150	319	48	148
M2M2	6	18	6	2	2	3	3	11
M3M3	2	8	1	2	1	11	0	10
M1M2	42	125	33	37	60	40	19	64
M1M3	36	81	17	25	33	111	11	84
M2M3	8	17	3	4	6	19	5	12
SS	1	0	0	0	0	2	5	1
ZZ	0	0	0	0	0	0	0	0
SZ	0	0	0	0	0	0	0	0
M1S	10	21	5	7	10	14	1	20
M1Z	4	7	3	4	0	1	0	1
M2S	0	4	2	0	1	4	0	1
M2Z	0	3	1	0	1	2	0	0
M3S	0	4	1	1	0	2	1	1
M3Z	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	202	513	150	146	264	538	103	348

1- ITÁLIA (NORTE)  
 2- ITÁLIA (ROMA)  
 3- ITÁLIA (SUL)  
 4- ALEMANHA (MARBURG)  
 5- ALEMANHA (MUNICH)

6- ALEMANHA ( SUL )  
 7- ESPANHA (CENTRO )  
 8- RIO GRANDE DO SUL

### 1.9. DEFICIÊNCIA DE A1AT (DAAT): PATOGENIA

Há pelo menos 20 alelos conhecidos associados a DAAT e vários diferentes mecanismos pelos quais esses alelos mutantes podem causar o estado de deficiência .

A maioria dessas mutações produzem alguma proteína, mas há mutantes para os quais a A1AT não pode ser detectada. Os níveis normais de A1AT no soro estão entre 20 a 53  $\mu\text{M}$ .

As variantes normais do gene da A1AT estão todas associadas a níveis séricos normais, e esses genes são referidos como variantes M, por causa da posição média de migração eletroforética.

A variante mais comum, a causar a DAAT é a Z que difere da normal M1 (Val<sup>213</sup>) por uma simples substituição de base (Glu<sup>342</sup> – Lis). Essa mutação Z é responsável por mais de 95% de todos os casos da DAAT (Brantly *et al*, 1990).

Os homozigotos Z tem os níveis séricos entre 2 a 10  $\mu\text{M}$  (Bethesda, MD, 1994). A A1AT produzida por Z é funcionante, com baixa constante de associação com a elastase, mas os baixos níveis séricos deixa o pulmão muito vulnerável a proteólise.

A conformação polimérica da A1AT, que origina polímeros aberrantes patogênicos, acumula-se no retículo endoplasmático dos hepatócitos para formar inclusões associadas a hepatite juvenil, cirrose e carcinoma hepatocelular (Lomas, 2000).

A patogenia da doença hepática na DAAT não é bem entendida, como o é a da doença pulmonar. A doença hepática ocorre somente em uma pequena fração dos deficientes e, raramente as duas formas coexistem no mesmo indivíduo (Crystal, 1990; Brantly *et al.*, 1988). Enquanto que o enfisema pode ocorrer em qualquer indivíduo com DAAT, a doença hepática ocorre, somente em associação com alelo Z e outros poucos alelos raros, como o M malton (Crystal, 1989; Crystal, 1990).

A DAAT (hepatopatia) é considerada um modelo de doença que ocorre por mecanismo de conformação aberrante da proteína e de agregação intermolecular com acumulação (Carrell & Lomas, 2002).

A DAAT é um protótipo para doenças com anormalidades em várias serpinas (inibidores de proteases): antitrombina III, Alfa-1-antiquimiotripsina e inibidor de C1. Essas doenças são conhecidas coletivamente como serpinopatias. As assim chamadas serpinopatias, incluem a Encefalopatia com corpo de inclusão de neuroserpina, a Síndrome de Alzheimer (variante Lewy) com depósito de alfa-sinucleína, a Doença de Pick com os corpos de Pick da demência fronto-temporal e as doenças causadas por prions.

Nos indivíduos ZZ somente 15% da proteína A1AT é secretada para o plasma. O restante, não secretado, acumula-se no retículo endoplasmático dos hepatócitos, local onde é degradado até uma forma insolúvel de inclusão intracitoplasmática (Lomas *et al*, 1992).

Como a A1AT, sobretudo nas doenças infecciosas, é uma proteína de fase aguda, cuja polimerização e conseqüente acumulação é dependente de concentração e temperatura, é importante nos indivíduos ZZ, controlar a inflamação e a febre.

O dano hepático nos indivíduos ZZ provavelmente resulta de efeitos tóxicos da proteína anormal acumulada, mas somente 12% a 15% dos indivíduos deste genótipo desenvolvem doença hepática.

Wu *et al* (1994) sugerem que outros fatores genéticos determinem a susceptibilidade individual ou familiar para hepatopatias na DAAT.

A relação entre doença hepática e DAAT é muito mais complexa do que a simples deficiência de uma antiprotease e suas conseqüências. Essa relação deve envolver, segundo trabalhos mais recentes, fatores imunológicos e genéticos, já que a taxa de deficientes de A1AT que desenvolvem hepatopatias é 3 vezes maior em indivíduos HLA DR3 positivos (Doherty *et al.*, 1990; Nemeth *et al.*, 1987). Demonstrou-se também que a relação DAAT-hepatopatia-HLA Dr3 está associada de forma significativa aos subtipos Dw24 e Dw25 que são de 2 a 4 vezes mais freqüentes na DAAT-hepatopatia do que no grupo controle (Reid *et al.*, 1987).

## 1.10. BIOQUÍMICA DA INIBIÇÃO DE PROTEASES

O produto do gene da A1AT é um inibidor de protease, de uma família de serpinas inibidoras de proteases, que tem o aminoácido serina no seu sítio ativo (Bieth, 1984). As moléculas de serpinas têm uma seqüência de 15 resíduos de aminoácidos reativos que interagem com o sítio ativo da serina alvo na proteinase (Ogushi *et al.*, 1987).

É grande a atração das moléculas de A1AT e da elastase, seu principal alvo inibitório, em consequência de uma constante de associação de  $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$  (Smith & Johnson, 1985).

Logo que a interação ocorre, a inibição é irreversível – a A1AT e a elastase complexadas, não podem mais exercer suas funções: a A1AT, inibir outras moléculas e a elastase, proteolizar (Beatty *et al.*, 1980; Johnson & Travis, 1976; Ogushi *et al.*, 1987). Formam, assim, um complexo estável, que mais tarde é metabolizado.

A cinética da inibição da ação degradante das proteases tem como modelo teórico a inibição *in vivo* da elastase neutrofílica, que é irreversível, e pode ser, esquematicamente, assim representada:



Se a concentração *in vivo* do inibidor  $[\text{I}_0]$  for dez vezes maior do que a concentração de proteinase  $[\text{E}_0]$  a inibição deverá ser a primeira etapa da reação,



com uma vida média de:

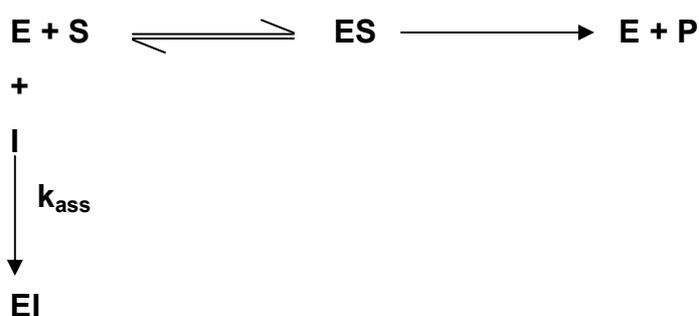
$$t_{1/2} = 0,693 / K_{\text{ass}} [\text{I}_0]$$

após sete vidas-média, ou seja depois de  $d(t)$ , tempo requerido para a quase a completa inibição de uma proteinase *in vivo*, a associação será de 99,2%. Então:

$$d(t) = 5/k_{ass} [I_0]$$

e quanto maior  $d(t)$  mais eficiente será a inibição *in vivo*. Um inibidor pouco eficiente (baixa  $k_{ass}$ ) deve ter uma boa potência *in vivo* se a sua concentração for muito alta e vice-versa.

Se a proteinase (E) é liberada *in vivo*, ela se encontrará com o inibidor (I) e com o substrato (S). como são ambas proteínas, é mais provável que a inibição ocorra por competição, isto é, E liga-se a S ou I, como mostrado no esquema a seguir :



Este esquema mostra ser inevitável ocorrer alguma perda do substrato. A concentração do produto da reação [P] sobe exponencialmente até um ponto de equilíbrio, uma vez que a maior parte de **E** já tenha se transformado em **EI**.

A inibição da proteólise não depende somente do tempo, mas também da eficiência da interação entre a proteinase e o substrato. Como esta referida eficiência é difícil de ser medida, é importante saber que o  $d(t)$  compatível com uma prevenção significativa da proteólise é 1 segundo se  $[E_0]$  e a razão  $k_{cat}/K_m$  é desconhecida.

Concluindo que se  $d(t)$  é menor ou igual a 1 segundo, o inibidor exerce uma eficiente função de prevenção da proteólise (Stokley, 2000).

### 1.11. TRATAMENTO DE REPOSIÇÃO

Prolastin e Respitin são dois produtos ainda não disponíveis comercialmente, compostos de A1AT administrada sob a forma de aerosol ou por via endovenosa. Eles elevam a concentração sérica e alveolar a um nível adequadamente protetor (Hill *et al.*, 2000). A eficácia dessa terapia continua sob julgamento e a espera de ensaios clínicos mais esclarecedores.

### 1.12. EPIDEMIOLOGIA E PREVALÊNCIA

O interesse científico pelos aspectos epidemiológicos da DAAT aumentou consideravelmente nos últimos anos em todo o mundo, especialmente na Europa e nas Américas.

A recomendação da Organização Mundial da Saúde (1996) é de que todos os asmáticos adultos devem ser testados para a deficiência de A1AT, fumantes ou não-fumantes, expostos ou não a poluentes (Stockley, 2000).

A desordem clínica mais prevalente na DAAT é a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), sob a forma de enfisema pan-acinar, especialmente nos fumantes. O início e a severidade da DPOC-DAAT são muito variáveis. A mortalidade, varia consideravelmente, entre fumantes e não-fumantes. Em uma população sueca, 98% de mulheres deficientes não fumantes e 65% dos homens deficientes não-fumantes mantiveram-se vivos até os 55 anos. Entre os deficientes fumantes, somente 30% das mulheres e 18% dos homens, alcançaram tal idade.

A poluição aérea urbana, os riscos de exposição ocupacional aos poluentes aéreos e, sobretudo, as infecções repetidas do trato respiratório inferior (especialmente nas crianças), são fatores de risco importantes para o surgimento precoce do enfisema.

### 1.13. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico laboratorial da DAAT inclui vários exames. As dosagens de concentração podem ser feitas por: imunodifusão radial, nefelometria, imunoelektroforese e capacidade de inibição da elastase.

A determinação do genótipo é feita pela técnica de Isoeletofocalização ou por RFLP (Polimorfismos do Comprimento de Fragmentos de Restrição).

A histopatologia é útil nos pacientes com hepatopatia decorrente da DAAT que podem desenvolver cirrose macronodular (Figura 10). Os pacientes ZZ, com ou sem doença hepática, acumulam glóbulos de A1AT, com defeito estrutural, nos hepatócitos. A proteína defeituosa não pode se ligar ao ácido siálico, interação que facilita a excreção de A1AT normal. Os glóbulos são arredondados (Fig 7 e 8), eosinofílicos, com 1 a 20 nm de largura, que se acumulam no citoplasma dos hepatócitos, primariamente, nas áreas periportais. Eles coram-se pelo PAS após digestão da diastase para remover o glicogênio.

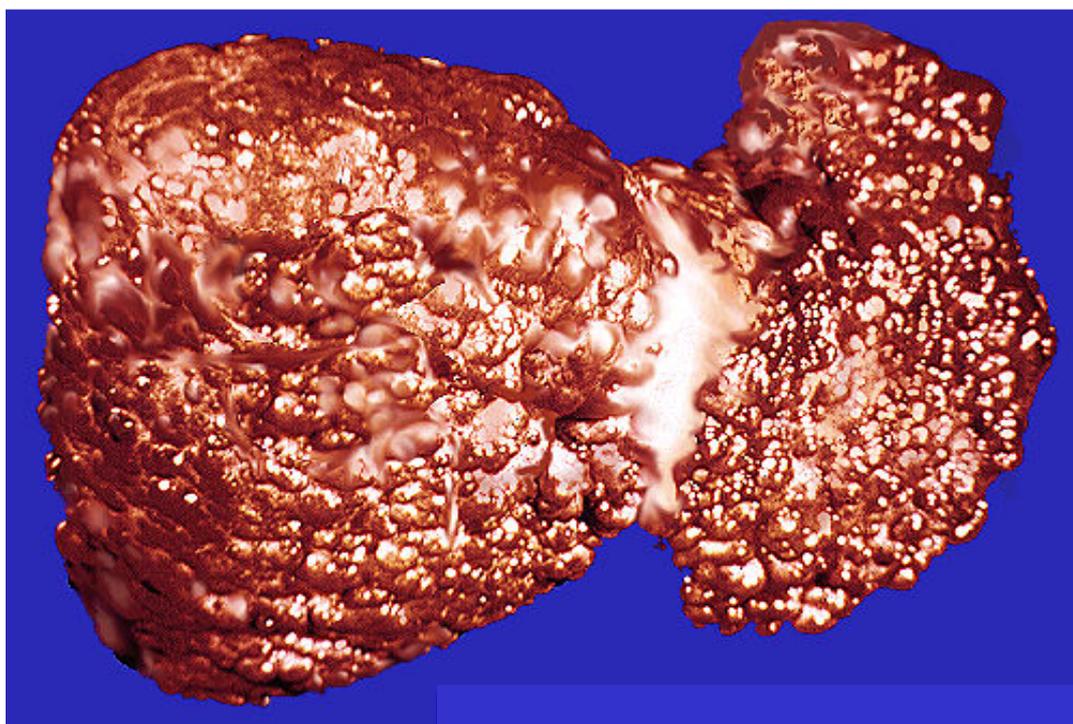


Figura 6 – Cirrose macronodular em um deficiente de A1AT homozigótico ZZ.

Fonte: Anatomia Patológica do H. da Lagoa - PUCRJ

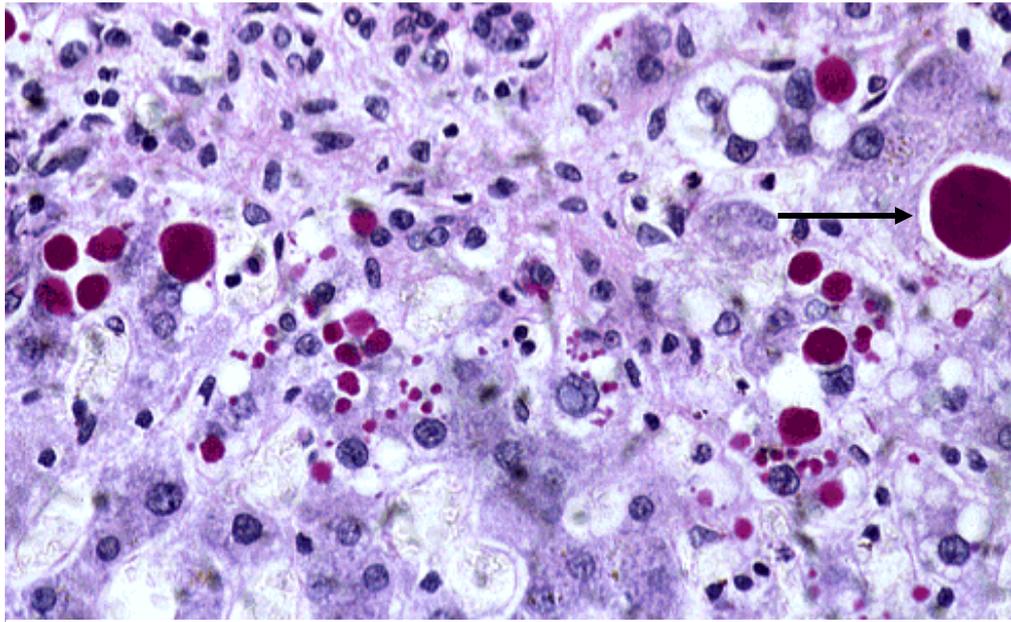


Figura 7 – Polimerização A1AT no hepatócito em um paciente com genótipo ZZ.

Fonte: Anatomia Patológica do H. da Lagoa - PUCRJ

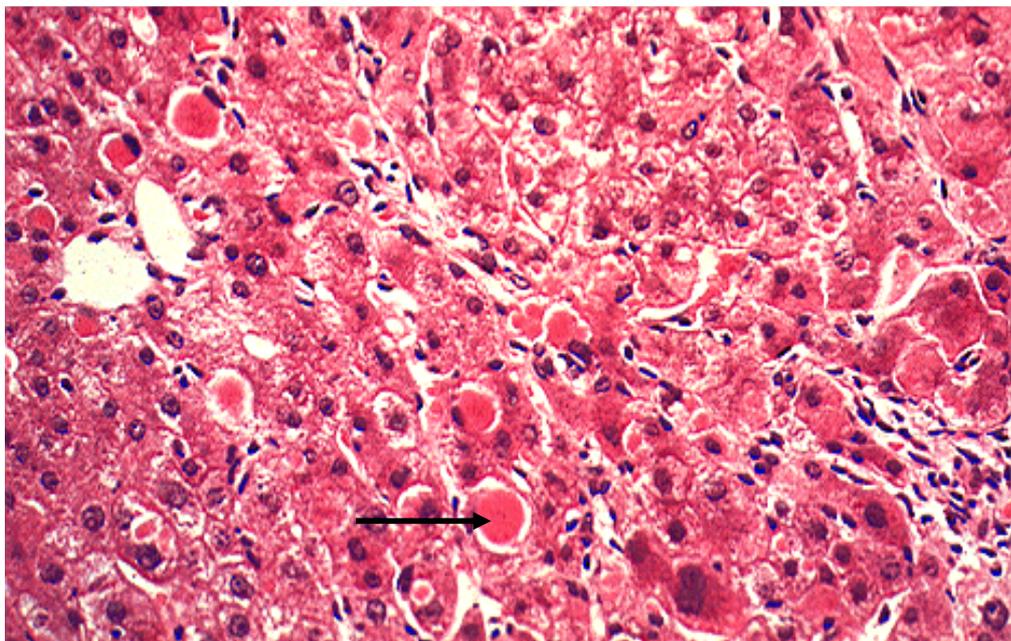


Figura 8 – Polímeros da A1AT nos hepatócitos . Coloração pelo PAS. Paciente com genótipo ZZ.

Fonte: Anatomia Patológica do H. da Lagoa - PUCRJ

#### 1.14. ASMA, HIPERREATIVIDADE BRÔNQUICA E A1AT

Inicialmente acreditava-se que a DAAT causava injúria apenas no parênquima, sem envolver as vias aéreas, exceto por se tornarem tortuosas e estreitadas devido a destruição dos alvéolos.

Mais recentemente, descobriu-se que a tosse e as sibilâncias, sugerem hiperreatividade brônquica, que de fato está presente numa grande proporção de pacientes com DAAT severa. O presumido é que a elastase afeta as vias aéreas tanto quanto o interstício, provocando inflamação e estreitamento, em adição ao efeito indireto resultante da perda de rebote elástico pulmonar.

Atualmente, é aceito que alguns pacientes com DAAT, são inicialmente diagnosticado como asmáticos, o que torna a DAAT, doença sub-diagnosticada. Em muitos estudos, a prevalência de história clínica ou diagnóstico prévio de asma variam de 4% a 45% (Silverman *et al.*, 1989; Brantley *et al.*, 1988; Tobin *et al.*, 1983; Makino *et al.*, 1970; Larsson, 1978). Em um grupo de 164 deficientes, a média de VEF 1 foi de 42% do predito com melhora para 45% após aerosol broncodilatador. A capacidade vital forçada (CVF) de 75% do predito melhorou a 85% do predito após aerosol broncodilatador (Sandford *et al.*, 1999;Townley *et al.*, 2000).

A hiperreatividade brônquica nos heterozigotos já está demonstrada pelas conclusões de vários estudos (Sandford *et al.*, 1999; von Ehrenstein *et al.*,2004). O teste de broncoprovocação com a metacolina encontrou 35% de 65 indivíduos (34 Pi MZ e 31 Pi MM) com hiperreatividade (declínio de >15% do VEF 1).

Do estudo de Townley *et al* (2000), 34 indivíduos MS mostraram ter hiperreatividade maior que os 419 MM e os 34 MZ. Este estudo foi realizado com dados do teste de provocação bronquial com metacolina (dose-resposta).

No mais recente estudo ( von Ehrensteisn *et al.*, 2004), com 5629 asmáticos, os autores concluíram que os asmáticos com baixos níveis de A1AT, são tendentes a desenvolver hiperreatividade brônquica.

## 1.15. PATOGENIA DA ASMA

Dois mecanismos são consensualmente aceitos para explicar a patogenia da asma: o mecanismo seqüencial ou tradicional e o mecanismo alternativo. Ambos os mecanismos podem incluir a participação das variantes alélicas da A1AT na predisposição à hiperreatividade e ao remodelamento brônquicos (Figura 9).

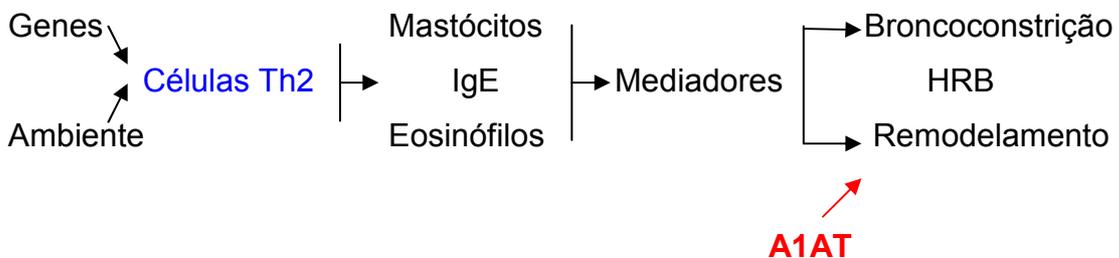
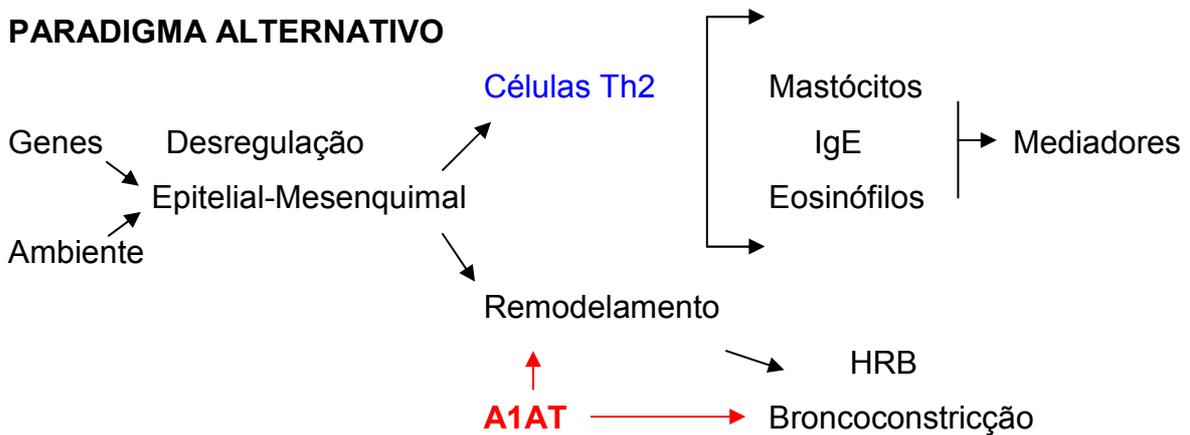
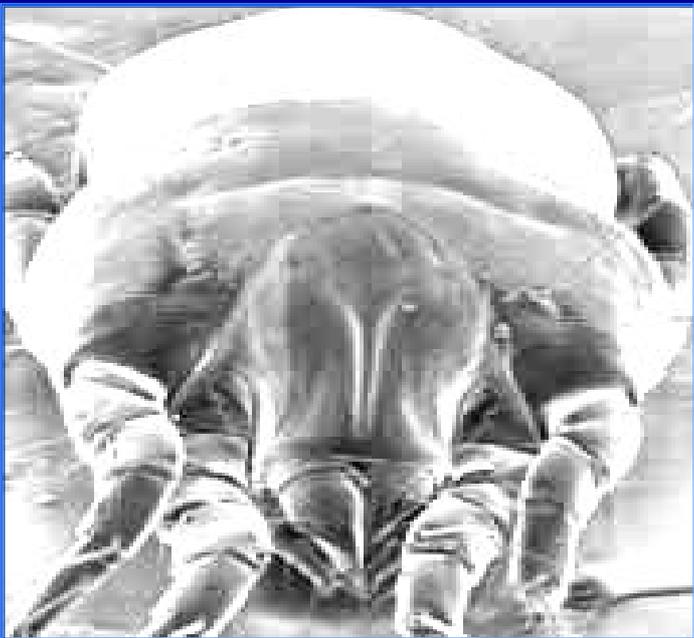
**SEQÜENCIAL****PARADIGMA TRADICIONAL****PARALELA****PARADIGMA ALTERNATIVO**

Figura 9 – Mecanismos Patogênicos da asma brônquica.

Os ácaros são os aeroalérgenos mais importantes na sensibilização da mucosa respiratória. No Brasil os mais estudados são os da família *Acaridae*, *Glycyphagidae* e *Pyroglyphidae*. Dentre todos estes, o mais sensibilizador no Brasil, é o *Dermatophagoides pteronyssinus* (Figura 10).

**ASMA BRÔNQUICA** **IMUNOPATOPATOGENIA**

- ORDEM :  
ASTIGMATA .
- FAMÍLIA :  
PYROGLYPHIDAE .
- DURAÇÃO DO  
CICLO OVO  
ADULTO : 31 DIAS.
- VIDA MÉDIA ;  
70 DIAS.
- EM UM MÊS  
PRODUZ 200 VÊZES  
O PRÓPRIO  
PESO EM FEZES .



**UFPA**

Figura 10 - *D. pteronyssinus*, ácaro de maior interesse na Alergologia clínica, por sensibilizar as vias aéreas, induzindo a formação de anticorpo específico da classe IgE.

Fonte: Dep Microscopia Eletrônica da UFRJ.

### 1.16. UNIDADE TRÓFICA, A1AT E ASMA

O epitélio brônquico é uma estrutura com arquitetura e funcionamento próprio para proteger o delicado tecido pulmonar de uma grande variedade de agressores, que incluem agentes infecciosos, poluentes e alérgenos. Nos asmáticos há evidências de que essa estrutura física e bioquímica, não atua eficientemente (Holgate, 2002).

Nesses pacientes, com perfil inflamatório Th-2, o epitélio exibe uma fragilidade aumentada. O aumento da expressão de CD44, o receptor para o Fator de Crescimento Epitelial (EGFR), acompanhada da produção epitelial de muitos mediadores, citocinas (IL-4, IL-5 e IL-10) e fatores fibrogênicos (TGF-B1, TGF-B2 e Endotelina-1), favorecem o desenvolvimento da asma (Carrell & Lomas, 2002).

O aumento de colágenos de reparo Tipo I, III, V e VI, e do número de miofibroblastos subepiteliais em todos os tipos de Asma, tornam evidente que há uma persistente ativação da Unidade Trófica Epitélio-Mesenquimal nos asmáticos, além do que é a sua atividade normal, a morfogênese no feto. A existência de colágeno subepitelial em crianças, quatro anos antes da Asma se manifestar clinicamente, sugere que a secreção desses fatores de crescimento e das metaloproteases, pela unidade trófica, deve ser fundamental no desenvolvimento da asma. (Sandford et al, 1999).

O epitélio injuriado é estimulado a secretar fatores de crescimento pró-fibrogênicos, alguns dos quais causam proliferação (IGF-1, PDGF-1) e outros fatores que induzem a secreção de colágeno e a transformação de fibroblastos em miofibroblastos (TGF-B2), como mostrado nas figuras 11,12 e 13.

Essas evidências consideradas em conjunto, indicam que para a asma se desenvolver cronicamente, pelo menos duas anormalidades são requeridas: uma contínua ativação da Unidade Trófica Epitélio-mesenquimal que produzirá um remodelamento brônquico via miofibroblastos e, como segunda anormalidade, a polarização da resposta dos linfócitos T de mucosa, para o fenótipo Th-2 (CD4+ secretores de IL-4 e IL-5) (Eden *et al.*, 2003).

## ASMA COMO INFLAMAÇÃO E REMODELAMENTO

Figura 11 - Asma como inflamação e remodelamento.  
GENES  AMBIENTE

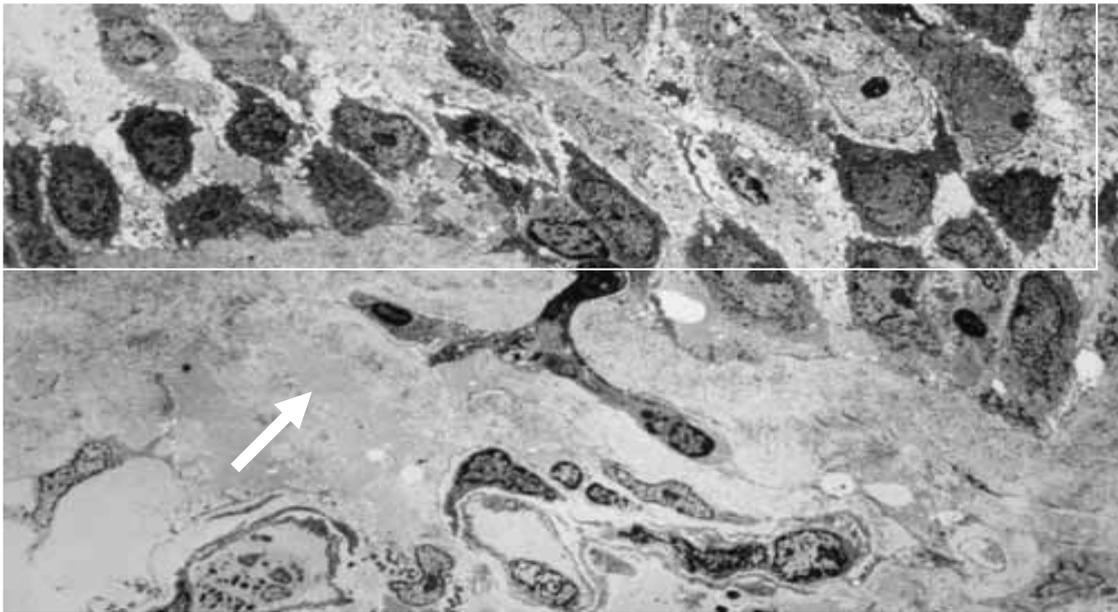


Figura 12 - Fibrose no remodelamento brônquico de um asmático.

Fonte: Anatomia Patológica do H. da Lagoa - PUCRJ

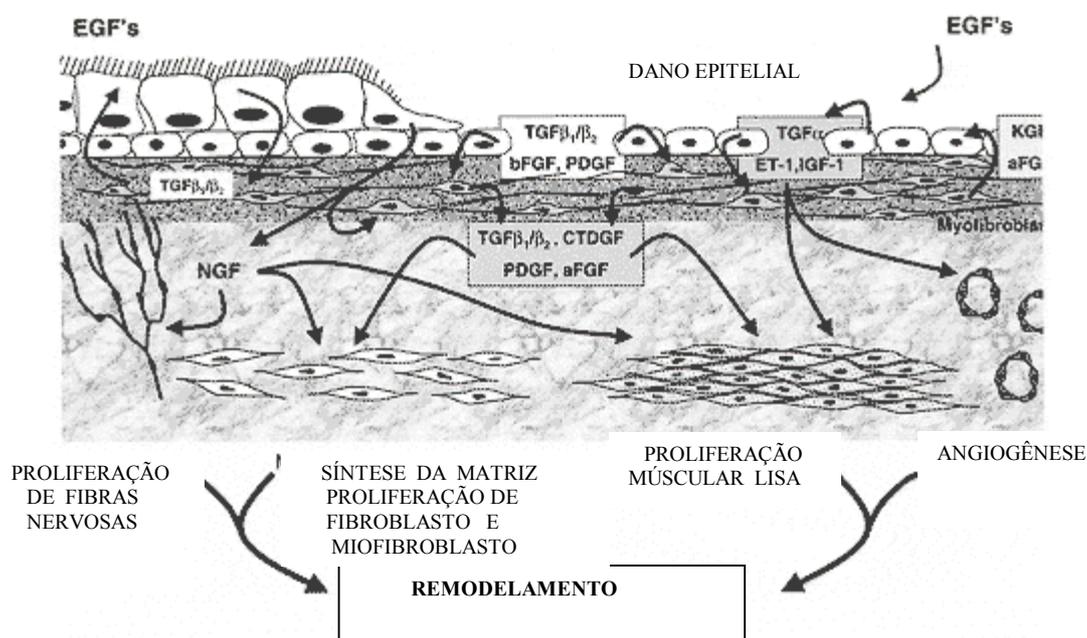


Figura 13 - Unidade Trófica Epitélio-Mesenquimal no processo de remodelamento brônquico.

### 1.17. POLIMORFISMOS GENÉTICOS ASSOCIADOS À ASMA BRÔNQUICA

A asma é decorrente de uma desordem genética complexa com fenótipo heterogêneo, atribuído à interação entre muitos genes e, entre esses genes e o meio ambiente. Um grande número de *loci* e genes candidatos, foram relacionados com os fenótipos da asma, de alelos marcadores de microsátélites a polimorfismos de nucleotídeos simples (Hakonarson & Hapali, 2002).

Em estudo recente do genoma de famílias americanas (EUA) de três grupos raciais, foi encontrada associação com os cromossomos 2q, 5q, 6p, 12q, 13q, 14q, 19q e 21q (Sandford *et al.*, 1999).

Em famílias alemãs foi identificada a relação com a Asma nos cromossomos 2q, 6p, 9q e 12q, sugerindo que estas regiões devem conter genes

que contribuem para o desenvolvimento da asma. Entretanto, apesar de muitos esforços e do progresso significativo na última década, ainda permanecem indeterminadas as implicações clínicas dos genes e variações genéticas dentro de numerosos genes, que foram relacionados em associação com a expressão dos fenótipos da asma.

Na Tabela 5 estão relacionados os polimorfismos associados à asma brônquica.

TABELA 5 - Polimorfismos genéticos associados à asma brônquica.

<b>GENE</b>	<b>MUTAÇÃO</b>	<b>AUTOR</b>	<b>POPULAÇÃO</b>
<b>IL-4</b> alpha (Receptor)	Ser761pro	Mojica-Lopez, 2002	México
<b>RANTES</b> (Regulador de citocina)		Hizawa, 2002	Japão
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	CA-Repetição (12q21)	Nagarkatti, 2002	Índia
<b>NOS 3</b> (Óxido nítrico sintase)	Glu298asp	Holla, 2002	Rep. Tcheca
<b>PAI 1</b> (Inibidor de ativador de plaminogenio)	4G/5G	Buckova, 2002	Rep. Tcheca
<b>IL-10</b>	-592 A/C -819 C/T	Zhang, 2002	China
<b>IL-4</b>	Del 70 pb- intron2	Noguchi, 2001	Japão
<b>IL-13</b>	- 1512	Heinzmann, 2000	Alemanha
<b>TNF</b>	- 308 A/G	Somma, 2003	África

Tabela 6 – Graus de severidade da asma

FORMA	SINTOMAS	SINTOMAS NOTURNOS	FUNÇÃO RESPIRATÓRIA
Severa Persistente	Contínuos. Atividade limitada. Exacerbações freqüentes.	Freqüentes.	VEF 1 $\leq$ 60%
Moderada Persistente	Diários (uso diário de B2-agonista) Exacerbações > 2 x semana	> 1 x semana	60% < VEF 1 $\leq$ 80%

Ainda que a DAAT e a asma brônquica representem patologias distintas, a predisposição dos deficientes de alfa 1-antitripsina desenvolverem asma é desconhecida (Wilson *et al.*, 2000). Por outro lado, asmáticos com asma severa persistente, podem também desenvolver um componente de obstrução aérea fixa, tornando difícil a separação consistente de asma e enfisema. É esperado que alelos deficientes da A1AT, contribuam para essa citada complicação por meio do remodelamento brônquico, ou conjugado a outros fatores. É possível, portanto, que genótipos deficientes da alfa 1-antitripsina influenciem nas características clínicas da asma brônquica, especialmente no grau de severidade da asma do adulto.

### 1.18. TNF- $\alpha$ E ASMA BRÔNQUICA

O TNF- $\alpha$ , recentemente denominado de TNFSF2 (segundo membro da superfamília de TNF), é um importante mediador do processo inflamatório dependente da ação de citocinas. O TNF- $\alpha$  é liberado na resposta alérgica IgE-dependente que envolve mastócitos e macrófagos. Níveis elevados de TNF já foram demonstrados em lavado broncoalveolar de asmáticos.

O TNF- $\alpha$  inalado aumenta, consideravelmente, em asmáticos e não-asmáticos, a hiperreatividade brônquica nos testes de provocação com a metacolina. Nestes testes, percebe-se também, neutrofilia no lavado (Thomas *et al.*, 2000).

O TNF- $\alpha$  aumenta a produção de adesinas, facilita a migração de células inflamatórias para a árvore aérea e ativa mecanismos pro-fibróticos no subepitélio. Estes dados sugerem que o TNF participa como componente importante da inflamação das vias aéreas e na geração de hiperreatividade brônquica. Em adição à todas essas evidências de participação no processo inflamatório, há ainda, os polimorfismos no gene do TNF- $\alpha$ , particularmente o TNFSF2 (-308 G/A) já descrito como associado à asma brônquica, em várias populações (Thomas, PS, 2001).

O gene do TNF- $\alpha$  (TNFS 2) está localizado no braço curto do cromossomo 6 na região 21.3, dentro do complexo maior de histocompatibilidade (MHC), entre a região que codifica componentes do sistema do complemento e o gene do HLA-B. O esquema representativo do gene do TNF- $\alpha$  está mostrado na Figura 14.

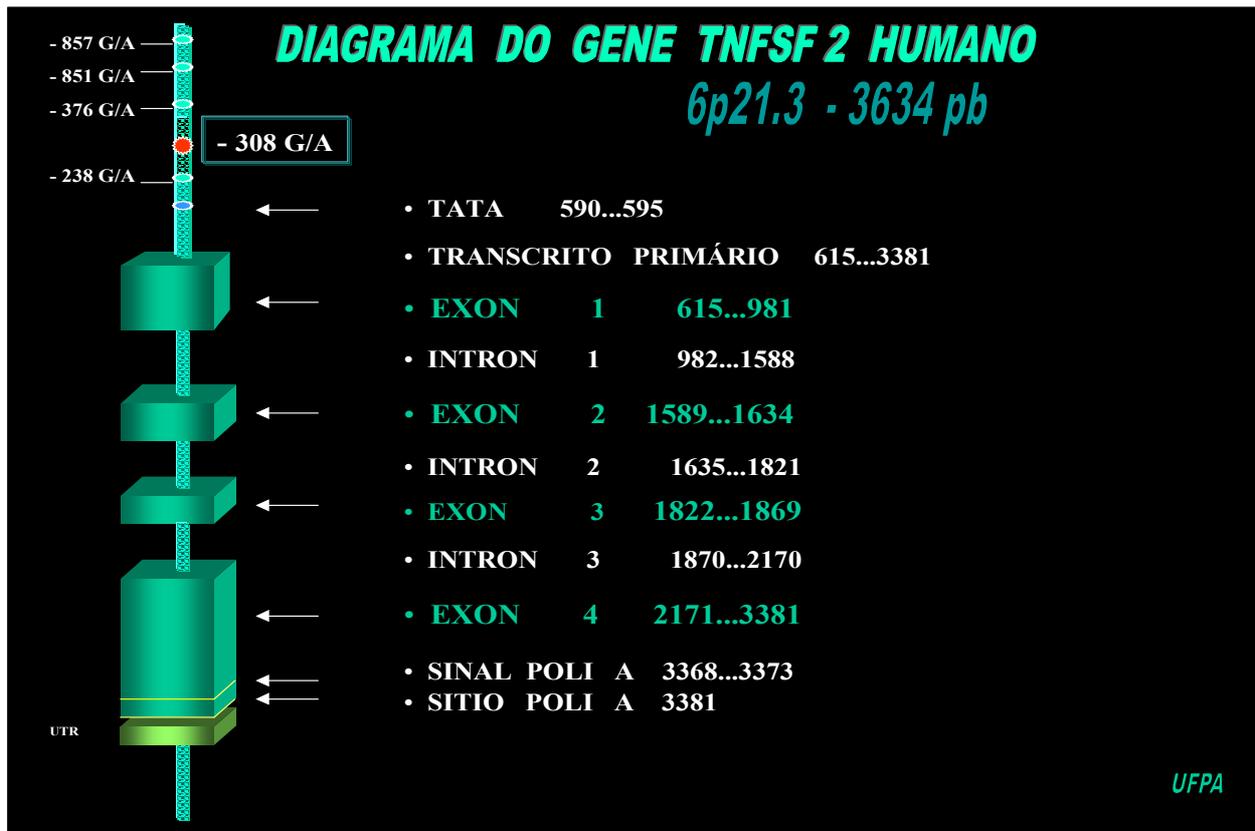


Figura 14 – Esquema representativo do gene do TNF- $\alpha$  .

Desde a descrição de polimorfismos bialélicos nos genes do TNF- $\alpha$  (-308 G/A) e TNF- $\beta$  (íntron 1), a influência desses polimorfismos na predisposição genética para a produção de TNF- $\alpha$  tem sido intensamente estudada (Keane *et al.*, 2001). A contribuição do polimorfismo na região promotora do TNF- $\alpha$  (-308 G/A) para a severidade da asma brônquica mediada por IgE, já foi confirmada por vários autores (Roach *et al.*, Keane *et al.*, 2001), mas não confirmada por outros. O TNF- $\alpha$  é um dos elementos importantes da denominada forma rápida de defesa do hospedeiro contra uma grande variedade de patógenos e, como cada um envolve um padrão diferente de risco, é esperado que este fato favoreça a diversidade dos mecanismos genéticos de controle da produção de TNF- $\alpha$  (Keane *et al.*, 2001).

Alguns investigadores observaram que o TNF- $\alpha$  é essencial para a formação e manutenção de granulomas e na resistência na tuberculose. Camundongos com baixa produção de TNF- $\alpha$  apresentam-se com baixa resposta imunológica do tipo celular. Esses autores concluíram que o TNF é necessário para uma resposta eficiente na indução de produção de quimiocinas e no recrutamento de células formadoras do granuloma protetor ( Keane *et al.*, 2001).

A produção de quimiocinas independente da ação do TNF- $\alpha$  parece tratar-se de uma resposta inflamatória desregulada, sem eficiência na defesa do hospedeiro com tuberculose, o que sugere um mecanismo para a reativação da mesma (Keane *et al.*, 2001).

As citocinas podem ser agrupadas em famílias com base em similaridades funcionais, de seqüências e de estrutura (Keane *et al.*, 2001 ). O fator de necrose tumoral (cachectina) é uma citocina sintetizada, principalmente, nos monócitos, é responsável pela regressão de certos tipos de células tumorais. O TNF está também implicado na produção do choque séptico e caquexia.

A proteína é sintetizada como um pro-hormônio, que é uma longa e atípica seqüência sinalizadora, ausente na citocina secretada. Um pequeno número de aminoácidos serve para ancorar o pro-hormônio entre as duas camadas lipídicas. A proteína ativa e o hormônio parcialmente processado são secretados após clivagem do polipeptídeo.

Há diferentes famílias de TNF, mas todas essas citocinas parecem formar complexos homotriméricos (ou heterotrimérico, no caso da LT-alfa e beta) que são reconhecidos por seus receptores específicos. A estrutura do TNF humano é homotrimérica e as subunidades são antiparalelas. As subunidades formam a estrutura trimérica pela interação de sítios receptores em cada uma delas, o que permite a transmissão de sinais entre elas (Keane *et al.*, 2001).

#### 1.19. TNF- $\alpha$ E O PROCESSO DO BRONCOESPASMO

O TNF- $\alpha$  é liberado nas reações alérgicas IgE-dependentes, dos mastócitos e macrófagos. Níveis elevados de TNF foram demonstrados no lavado bronco-alveolar de asmáticos durante as crises ou após estimulação com antígenos (Thomas *et al.*, 2001).

O TNF- $\alpha$  inalado aumenta a reatividade brônquica à metacolina em asmáticos e em pessoas normais; facilita a migração de células inflamatórias na árvore respiratória e ativa mecanismos profibróticos no sub-epitélio respiratório. Essas ações reunidas sugerem que o TNF tem um importante papel na iniciação da inflamação alérgica respiratória do asmático, na cronificação da inflamação e na geração e evolução da hiperreatividade brônquica do asmático, talvez participando na modulação do nível de severidade da doença. Há evidências de que polimorfismos genéticos na região não-codificadora (5') do gene do TNF- $\alpha$ , estão associados com a asma, particularmente o polimorfismo -308 G/A (Thomas *et al.*, 2001). As ações do TNF- $\alpha$  (TNFS 2) estão esquematicamente mostradas na figura 15.

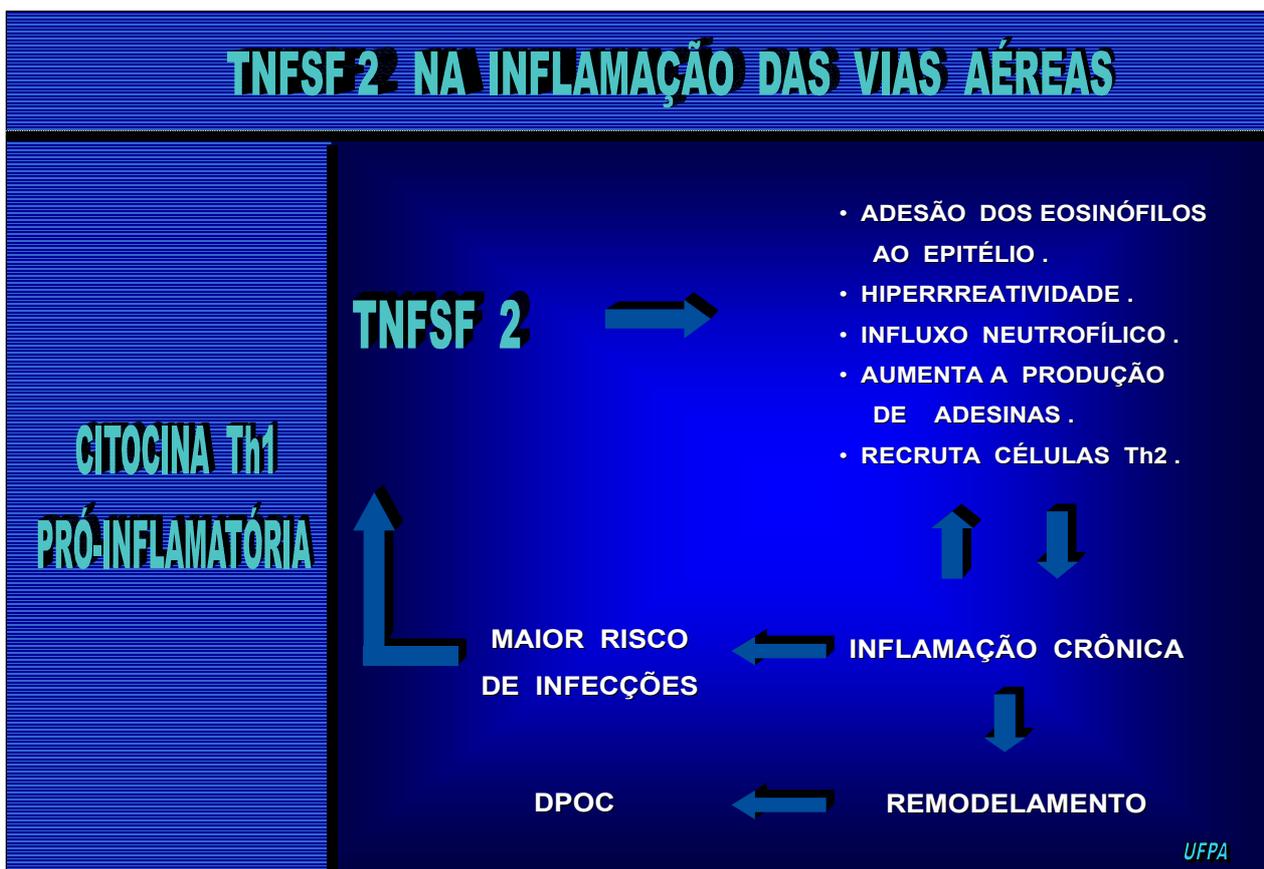


Figura 15 – Ações do TNFS2 na inflamação das vias aéreas.

## 1.20. OBJETIVOS

### 1.20.1. Objetivo Geral.

Investigar a frequência das formas variantes S e Z do gene da A1AT e do polimorfismo (- 308 G/A) da região reguladora do gene do Fator de Necrose Tumoral (TNF- $\alpha$ ) em uma população de pacientes asmáticos de Belém do Pará. Testando a hipótese de que indivíduos portadores de tais formas variantes têm maior ou menor probabilidade de desenvolver a doença em níveis mais graves de severidade sintomática.

### 1.20.2. Objetivos Específicos

Investigar a associação da asma brônquica moderada persistente com as variantes S e Z da A1AT.

Investigar a associação da asma brônquica severa persistente com as formas variantes da A1AT.

Investigar a associação do polimorfismo genético TNF- $\alpha$  (-308 G/A) com a asma brônquica e com os níveis de severidade da mesma.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. POPULAÇÃO INVESTIGADA

A análise das mutações no gene da A1AT foi realizada em um grupo de 110 pacientes, enquanto que o polimorfismo TNF- $\alpha$  (-308 G/A), foi investigado em 100 pacientes, todos portadores de asma brônquica, nos níveis da doença moderada persistente e severa persistente, segundo critérios clínicos, de sensibilidade alérgica, medida por testes de sensibilidade (Testes Cutâneos de Leitura Imediata), além de parâmetros espirométricos (CVF e VEF1), levando-se em consideração os critérios de inclusão e de exclusão.

### 2.2. CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras estudadas foram constituídas por alíquotas de sangue, obtidos por punção venosa de pacientes portadores de asma brônquica extrínseca, dos níveis de severidade moderado e severo persistentes, e selecionados de acordo com os critérios de inclusão e de exclusão.

### 2.3. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO UTILIZADOS NA INVESTIGAÇÃO

- 1) História clínica e quadro sintomático consistentes com o diagnóstico de asma brônquica alérgica.
- 2) Parâmetros funcionais respiratórios consistentes com o diagnóstico de asma.
- 3) RX do tórax normal ou com sinais radiológicos sugestivos de asma brônquica.
- 4) Testes alérgicos indicativos de sensibilidade alérgica aos alérgenos inaláveis utilizados.
- 5) História familiar de asma brônquica.

## 2.4. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO UTILIZADOS NA INVESTIGAÇÃO

- 1) Pacientes com menos de 10 anos ou mais de 60 anos.
- 2) Pacientes com tuberculose pulmonar.
- 3) Pacientes com cardiopatia.
- 4) Pacientes HIV positivos.
- 5) Pacientes com fibrose cística, tumores pleurais, pulmonares e/ou do mediastino, ou outra patologia acompanhada de dispnéia e alterações espirométricas.
- 6) Pacientes impossibilitados de se submeterem à prova funcional respiratória e/ou testes alérgicos.
- 7) Grávidas ou usuárias de medicação com estrogênios.
- 8) Pacientes corticoide-dependentes.
- 9) Pacientes imunodeficientes.
- 10) Fumantes e ex-fumantes.

## 2.5. PROCEDÊNCIA DAS AMOSTRAS

Pacientes asmáticos procedentes do serviço médico-ambulatorial de Alergologia e de Pneumologia do Sistema Único de Saúde e de clínica privada, na cidade de Belém, estado do Pará, dos quais foram obtidas alíquotas de sangue por punção venosa, após explicação da investigação e assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido.

## 2.6. ANÁLISE MOLECULAR DAS AMOSTRAS

### 2.6.1. EXTRAÇÃO DE DNA

#### Lise das Hemácias

1. Em tubo de 2 mL adicionar 300  $\mu$ L de sangue e 1200  $\mu$ L de solução de lise de hemácias.
2. Agitar por 30 minutos, centrifugar (12.000 rpm por 1 minuto) e descartar o sobrenadante.

#### Lise dos Leucócitos

1. Acrescentar ao precipitado 400  $\mu$ L de tampão de lise de leucócitos e misturar no vortex até a dissolução do precipitado.
2. Colocar em banho-maria (55 °C) por 30 minutos.

#### Precipitação das Proteínas

1. Acrescentar à mistura, 200  $\mu$ L de solução de precipitação de proteínas.
2. Agitar brevemente em vortex e colocar em banho-maria (55 °C) por 30 minutos.
3. Centrifugar (1200 rpm) por 4 minutos e transferir o sobrenadante para tubo eppendorf (2 mL).
4. Acrescentar 1200  $\mu$ L de isopropanol e agitar manualmente até aparecer o precipitado de DNA.
5. Centrifugar (1200 rpm) por 10 minutos.
6. Desprezar o sobrenadante e lavar o precipitado de DNA com 500  $\mu$ L de etanol 70%.
7. Centrifugar (1200 rpm) por 12 minutos, desprezar o sobrenadante e deixar secar.
8. Hidratar com 300  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O.

## 2.6.2. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

A amplificação foi executada com as seqüências e concentrações dos iniciadores, mostradas na Tabela 6.

O programa para a amplificação, do segmento do DNA em todos os polimorfismos investigados foi o mesmo e utilizou as seguintes condições:

Desnaturação inicial: 94 °C – 5 minutos.

30 ciclos		94 °C – 1 minuto ( desnaturação).
		60 °C – 1 minuto (pareamento dos iniciadores)
		72 °C – 1 minuto (extensão).

Extensão final: 72 °C – 4 minutos.

Tabela 6 – Concentração e Seqüências dos Iniciadores

Iniciadores	Concentração	Seqüência
Pi S F	0,25 pM	5'-TGAGGGGAAACTACAGCACCTCG-3'
Pi S R	0,25 pM	5'-AGGTGTGGGCAGCTTCTTGGTCA-3'
Pi Z F	0,25 pM	5'-ATAAGGCTGTGCTGACCATCGTC-3'
Pi Z R	0,25 pM	5'-TTGGGTGGGATTACCACTTTTC-3'
TNF -F	0,25 pM	5'- AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT-3"
TNF -R	0,25 pM	5'- TCCTCCCTGCTCCGATTCCG-3'

### 2.6.3. POLIMORFISMOS DE RESTRIÇÃO

Na investigação dos dois sítios de restrição da deficiência de alfa 1-antitripsina, foi utilizada uma única enzima (*Taq I*). A investigação do polimorfismo (-308 G/A) do gene do TNF- $\alpha$  utilizou a enzima de restrição *Nco I*.

A amplificação multiplex possibilitou a análise em conjunto dos dois alelos (alelos S e Z). Indivíduos normais possuem ambos os sítios de restrição, nos quais a endonuclease reconhece e cliva, enquanto que indivíduos deficientes apresentam mutações em um ou ambos os sítios de restrição, os quais a endonuclease não reconhece e por sua vez não o(s) cliva (Figura 16). Na investigação do polimorfismo (-308) do gene do TNF- $\alpha$ , foi empregado um par de iniciadores que amplifica um segmento de 118 pares de nucleotídeos e cria um sítio de restrição nos indivíduos portadores do alelo mais comum ((alelo TNF- $\alpha$  – 308 G). Nos indivíduos portadores da mutação, este segmento não é clivado pela enzima e, permanece com 118 pb (Fig. 17). Na Tabela 7 estão as condições para análise de RFLP para o gene da A1AT.

Tabela 7–Condições para análise de digestão enzimática dos produtos da PCR

Segmentos	Água	Tampão	Enzima	Produto	Temp.	Tempo
Duplex S e Z	7,25 $\mu$ L	2,5 $\mu$ L	0,2 $\mu$ L	10 $\mu$ L	65° C	12 h
TNF- $\alpha$	7,25 $\mu$ L	2,5 $\mu$ L	0,2 $\mu$ L	10 $\mu$ L	37°C	12 h

### 2.6.4. ELETROFORESE E VISUALIZAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO

Após a amplificação e digestão, as amostras foram submetidas a eletroforese vertical em suporte de poliacrilamida 7% (4 mL de TEB 10x – Tris 108g/L; EDTA dissódico 9,3 g/L; e ácido bórico 55 g/L; 7 mL de acrilamida a 40% - 38 g de acrilamida, 2 g de bis-acrilamida e 100 mL de água deionizada; 200  $\mu$ L de persulfato de amônia; 29 mL de água deionizada; e 50  $\mu$ L de TEMED.

Após a separação eletroforética, o gel permaneceu 20 minutos em solução de fixação (100 mL de etanol, 5 mL de ácido acético e 895 mL de água deionizada). Decorrido o tempo indicado, o fixador foi retirado para a adição do nitrato de prata (0,17 g para 100 mL de água deionizada) durante 25 minutos. Retirada a solução de nitrato, colocou-se a solução de revelação (4,5 de NaOH, 200  $\mu$ L de formaldeído e, 150 mL de água deionizada). Esta solução foi, então, imediatamente retirada com o aparecimento das primeiras bandas, colocando-se a seguir a solução de fixação que interrompeu a revelação. Foi então realizada a leitura, análise e discussão dos resultados.

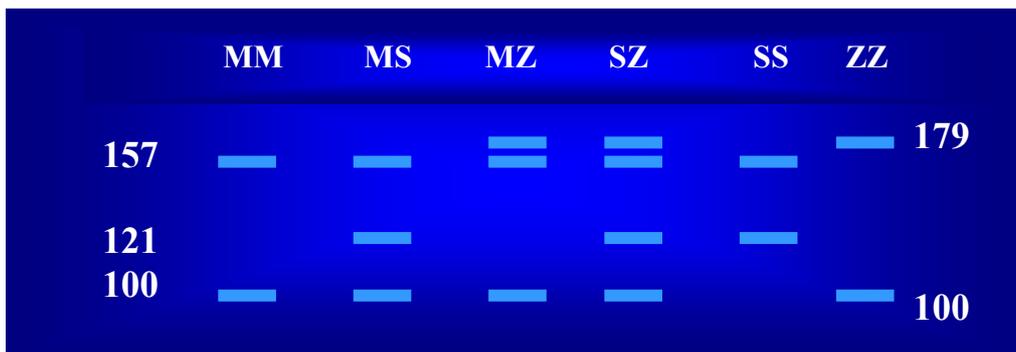


Figura 16 – Esquema do perfil eletroforético da A1AT.

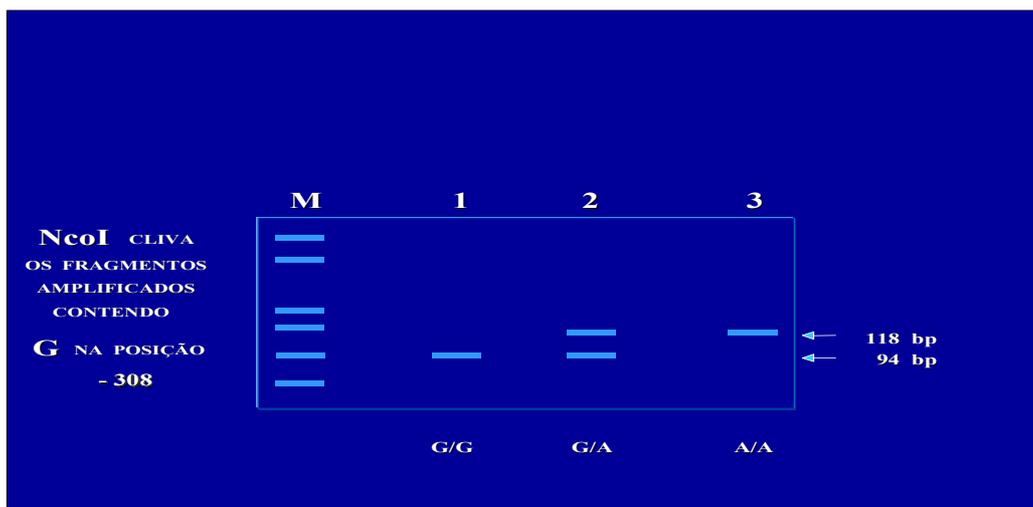


Figura 17 – Perfil eletroforético esquemático (TNF- $\alpha$  -308 G/A).

### 2.6.5. TESTES ALÉRGICOS

A aferição do grau de sensibilidade alérgica aos alergênicos inaláveis, foi feita através de testes de punctura, executado na face anterior do antebraço com punctor descartável, utilizando-se extratos alergênicos padronizados de *D. pteronissinus*, *D. farinae* e *B. tropicalis*. A leitura, após 20 minutos, foi feita pela medição da pápula de reação. A leitura e interpretação dos testes foram feitas pela medição do diâmetro das pápulas de reação e em seguida foram comparadas com o diâmetro daquelas obtidas com os controles positivos (histamina) e negativos (diluyente) e os resultados expressos com os seguintes graus:

Negativo ( - ) – reação igual à do controle negativo (pápula ausente ou inferior a 3 mm).

Positivo ( 1+ ) - pápula menor que a do controle positivo.

Positivo ( 2+ ) - pápula igual à do controle positivo.

Positivo ( 3+ ) - pápula maior que a do controle positivo sem pseudópodo(s).

Positivo ( 4+ ) - pápula com presença de pseudópodos.

### 2.6.6. PROVA FUNCIONAL RESPIRATÓRIA

Para aceitação do exame final, foram aplicados os critérios de reprodutibilidade estabelecidos pelo Consenso Brasileiro de Espirometria: os 2 maiores valores de VEF 1 e CVF devem diferir menos de 0,2 L , após a obtenção de manobras aceitáveis. Foram levadas em consideração, as orientações gerais, a seguir:

- ESPIRÔMETRO COM SENSOR DE FLUXO COM MICROPROCESSADOR.
- INFORMAÇÕES AO PACIENTE SÔBRE A EXECUÇÃO DAS MANOBRAS.
- DILATADORES DE AÇÃO CURTA SUSPENSOS 4h ANTES .
- DILATADORES DE AÇÃO PROLONGADA SUSPENSOS 6h ANTES
- CIGARROS PROIBIDOS 2h ANTES .
- CAFÉ E CHÁ SUSPENSOS 6h ANTES .
- EXPECTORAÇÃO PROFUSA ADIA O TESTE .
- FLUXOS EXPIRATÓRIOS MENORES AO ACORDAR E MÁXIMOS AO MEIO-DIA E AO FINAL DA TARDE .
- PROCURAR DISTÚRPIO VENTILATÓRIO OBSTRUTIVO : RESPOSTA AO BRONCODILATADOR VEF1

### 2.6.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os cálculos estatísticos foram executados, com o programa Bioestat 3 (Ayres *et al*, 2003) e o programa CLUMP( Sham *et al.*, 1998), empregando-se o teste do Qui-Quadrado, o teste binomial (duas proporções) e a regressão logística simples, para detectar diferenças estatísticas entre os níveis de severidade dos pacientes asmáticos. O nível de significância considerado foi de 95% ( $p < 0,05$ ). Os cálculos estatísticos estão apresentados no Anexo1.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. PACIENTES ASMÁTICOS TESTADOS PARA OS ALELOS S E Z DA A1AT

Para os alelos S e Z da A1AT foram testadas 110 amostras de DNA de pacientes com asma brônquica e as respectivas informações adicionais foram fornecidas pela anamnese alergológica. Dentre as amostras testadas, 57,2% (63/110) foram provenientes de pacientes do sexo masculino, com idade média de 26 anos, sendo que 48% (30/63) destes tinham idade acima de 20 anos. Os pacientes do sexo feminino representaram 43% (47/110) da amostra, apresentando idade média de 27 anos, sendo que 52% (24/47) destes, tinham idade acima de 22 anos (Figuras 18 e 19). Todos os pacientes são residentes na cidade de Belém, no Estado do Pará.



Figura 18 - Distribuição de pacientes asmáticos de acordo com o sexo.

Todos os asmáticos relataram história familiar de asma brônquica. Nenhum paciente declarou fazer uso de cigarros no presente ou em sua vida pregressa. Apenas dois pacientes do sexo feminino, declararam estar usando

corticoide sistêmico, incluído no seu programa de tratamento para agudização da asma.



Figura 19 - Distribuição de asmáticos de acordo com a idade.

Dos 110 indivíduos da população de asmáticos, todos residentes em Belém, Estado do Pará, 84,5% (93/110) tinha entre 10 e 40 anos de idade.

Com relação aos níveis de severidade da doença, os asmáticos selecionados para a investigação, foram categorizados nos níveis da doença moderada persistente 49% (54 /110) e severa persistente 51% (56/110) (Figura 20).



Figura 20 - A1AT: Distribuição da amostra de pacientes asmáticos segundo o nível de severidade.



Figura 21 – A1AT: Distribuição genotípica por nível de severidade.

Com relação à A1AT, das 110 amostras de DNA submetidas à genotipagem, obtivemos os seguintes resultados: 81% dos indivíduos com o genótipo MM (89/110); 12,7% com o genótipo MS (14/110); 2,7% dos indivíduos com os genótipos MZ e SS (ambos com 3/110) e 0,9% com o genótipo composto SZ (1/110). Nenhum indivíduo analisado na amostra de asmáticos apresentou o genótipo ZZ (Tabela 9).

Quando foram considerados somente os indivíduos no nível da asma moderada persistente, os seguintes resultados foram observados: 91% dos indivíduos tem o genótipo MM (49/54); 5,4% dos indivíduos são heterozigotos para os alelos M e S (3/54) e 1,8% da amostra é composta por um indivíduo homozigoto SS (1/54); a mesma proporção (1,8%) foi encontrada para os indivíduos heterozigotos MZ. Nenhum indivíduo no nível da asma moderada apresenta os genótipos SZ ou ZZ.

Quando se considerou somente os asmáticos do nível de doença severa persistente, foram observados os seguintes resultados: 71,4% da amostra tem o genótipo MM (40/56); 19,6% (11/56) dos indivíduos da amostra tem o genótipo MS. 3,6% dos indivíduos da amostra (2/56) tem o genótipo MZ; a mesma proporção de indivíduos (3,6%) tem o genótipo SS. O único indivíduo heterozigoto composto (SZ) da amostra apresenta o nível de doença severa persistente.

De um modo geral, observa-se que os 54 asmáticos no nível de doença moderada persistente, 9,3% (5/54) apresentaram pelo menos um alelo mutante S ou Z, sendo 4 heterozigotos e 1 homozigoto. Entre os 56 asmáticos no nível de doença severa persistente, 28,6% (16/56) apresentaram pelo menos um alelo mutante (S ou Z) no estado heterozigoto (14) ou homozigoto (2).

Os resultados dos testes alérgicos de punctura estão apresentados na Figura 22, de forma que podem ser observados resultados sobrepostos positivos a mais de 1 alérgeno sensibilizador. Não ocorreu nenhum caso de teste negativo aos 3 alérgenos, considerados simultaneamente. Dos 110 testes cutâneos executados, 33% (36/110) foram positivos para *D. pteronyssinus*; 26,3% (29/110) positivos para *D. farinae* e, 53,6% (59/110) positivos para *B. tropicalis* (Figura 22).



Figura 22 - Distribuição dos resultados dos testes cutâneos em 110 asmáticos.

Os valores médios, obtidos dos resultados numéricos das provas funcionais respiratórias, no nível da asma moderada persistente atestam, predominantemente, um distúrbio ventilatório obstrutivo leve, com resposta broncodilatadora positiva (25%). No caso da doença de nível severa persistente, observou-se, pelos valores médios, um distúrbio obstrutivo, sendo que 4 pacientes apresentaram componente restritivo, com ausência de resposta broncodilatadora e dispnéia incapacitante (Figura 23).

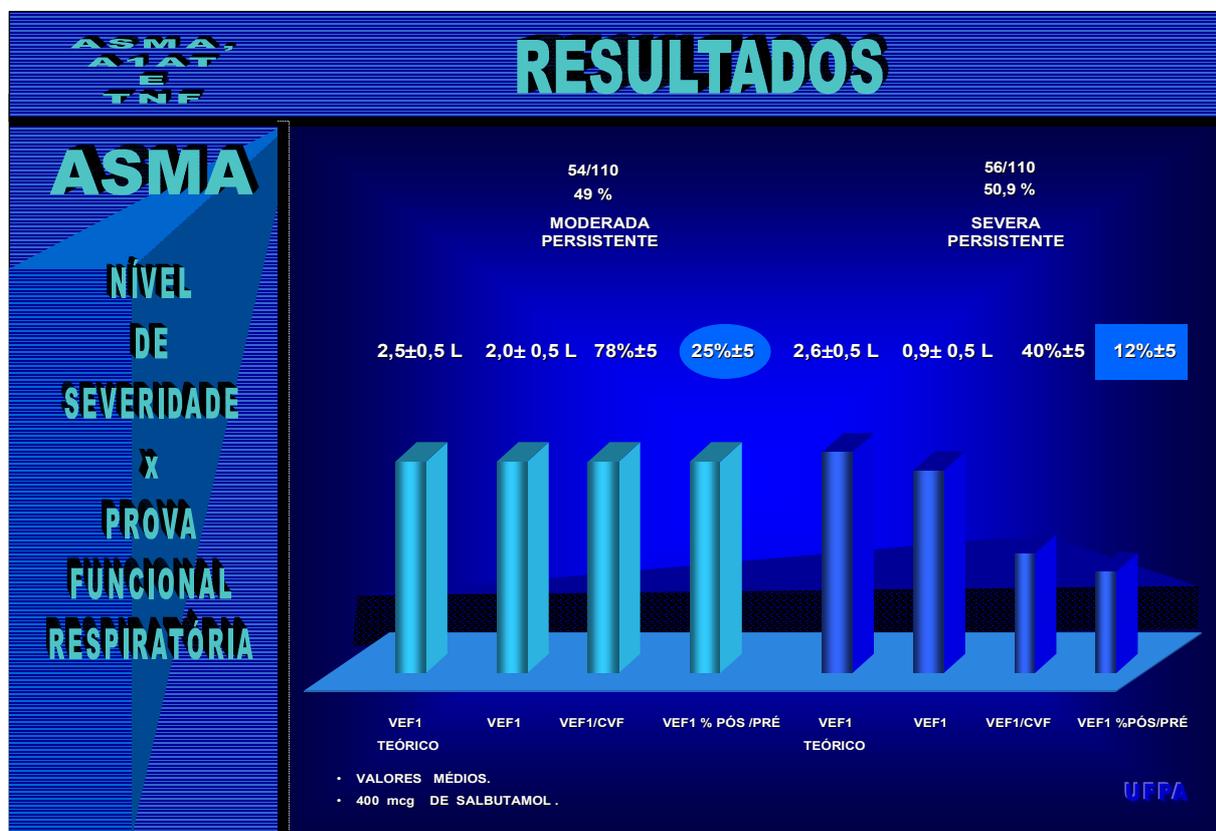


Figura 23 – Distribuição dos valores médios dos parâmetros funcionais respiratórios segundo os níveis de severidade.

### 3.2. PACIENTES ASMÁTICOS TESTADOS PARA O TNF- $\alpha$ (-308 G/A).

A distribuição genotípica do TNF- $\alpha$  (-308 G/A) entre os asmáticos (n=100), mostrou que 86% (86/100) apresentou genótipo GG, 14% (14/100) apresentou genótipo GA e nenhum paciente apresentou o genótipo AA (Figura 24).

A distribuição genotípica do TNF- $\alpha$  (-308 G/A), segundo o nível de severidade da doença, mostrou que na amostra de pacientes com asma moderada persistente, 83,3% (40/48) apresentaram o genótipo GG e 16,7% (8/48) apresenta-se no estado heterozigoto para o alelo mutante (GA) (Figura 25).

Na amostra de pacientes com asma severa persistente a distribuição é semelhante, com 88,4% (46/52) da amostra apresentando o genótipo GG e 11,5% (6/52) da amostra apresentando o genótipo heterozigoto GA (Figura 25 e Tabela 10).



Figura 24 - TNF-  $\alpha$ : Distribuição genotípica na amostra de 100 asmáticos.

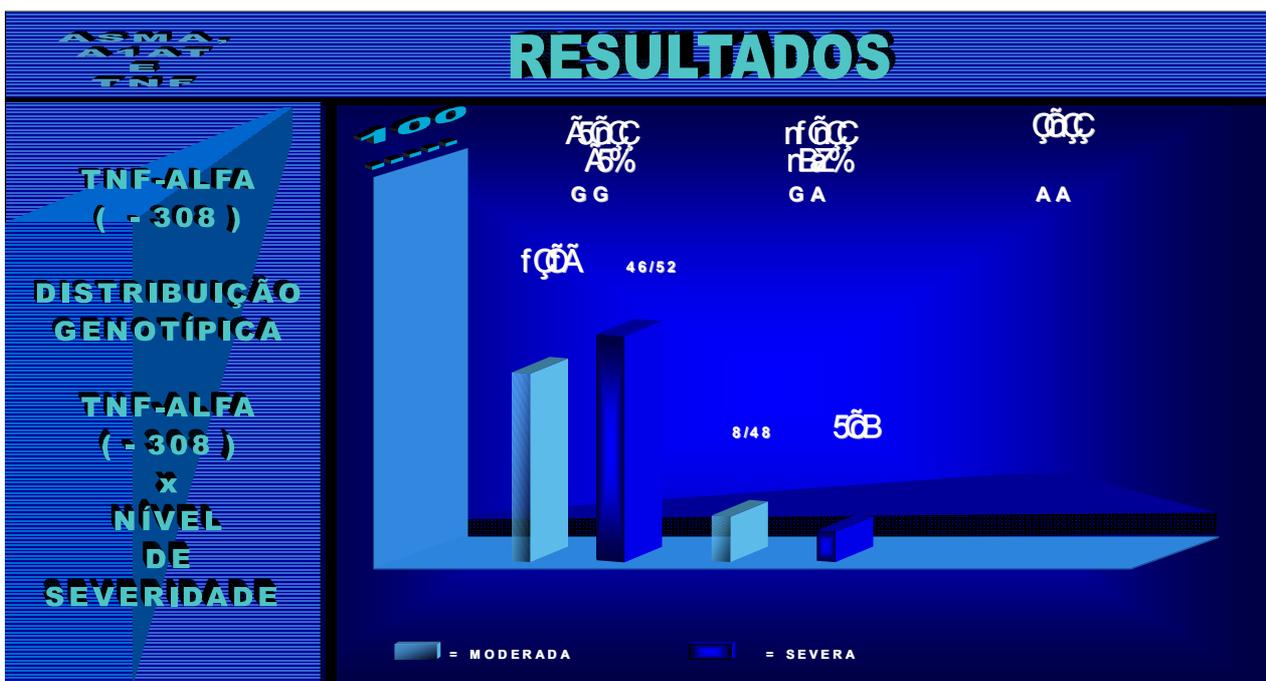


Figura 25- TNF- $\alpha$  (-308 G/A): Distribuição segundo os níveis de severidade.

Tabela 9 – A1AT:Distribuição genotípica e freqüências alélicas.

	DISTRIBUIÇÃO GENOTÍPICA						FREQUÊNCIA ALÉLICA		
	MM	MS	MZ	SS	SZ	ZZ	M	S	Z
<b>ASMA (n = 110)</b>	<b>89</b> (80,9%)	<b>14</b> (12,7%)	<b>03</b> (2,7%)	<b>03</b> (2,7%)	<b>01</b> (0,9%)	<b>0</b>	<b>0,887</b>	<b>0,095</b>	<b>0,018</b>
<b>MODERADA PERSISTENTE (n= 54)</b>	<b>49</b> (90,7%)	<b>03</b> (5,5%)	<b>01</b> (1,85%)	<b>01</b> (1,85%)	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0,945</b>	<b>0,046</b>	<b>0,009</b>
<b>SEVERA PERSISTENTE (n= 56)</b>	<b>40</b> (71,4%)	<b>11</b> (19,6%)	<b>02</b> (3,57%)	<b>02</b> (3,57%)	<b>01</b> (1,78%)	<b>0</b>	<b>0,830</b>	<b>0,143</b>	<b>0,027</b>

A distribuição genotípica entre portadores de asma severa e asma moderada, quando se considerou todos os genótipos, não apresentou diferenças estatisticamente significativas ( $\chi^2 = 7.11$  e  $p=0,096$ ). Quando todos os indivíduos portadores de alelos deficientes foram agrupados, observou-se que os portadores de asma severa têm uma proporção estatisticamente superior de alelos deficientes, em relação aos portadores de asma moderada. As diferenças estatisticamente significativas podem ser observadas, tanto no teste do Qui-quadrado ( $\chi^2 = 6,63$ ;  $p=0,017$ ), como no teste binomial ( $p$  bilateral= 0,0116).

Quanto a comparação da distribuição do genótipo GA do TNF- $\alpha$  (-308 G/A), obteve-se os seguintes resultados: comparadas asma moderada com asma severa, no teste binomial ( $p = 0,0745$ ) e no teste do Qui-Quadrado ( $\chi^2 = 0,267$ ; Correção de Yates  $p=0,8101$ ), não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas. As Tabelas 11 e 12 (ANEXO 1) mostram os resultados dos testes estatísticos aplicados.

Tabela 10 – TNF- $\alpha$  (-308 G/A) -Distribuição genotípica e freqüência alélica na amostra de asmáticos da população de Belém.

	DISTRIBUIÇÃO GENOTÍPICA			FREQUÊNCIA ALÉLICA	
	GG	GA	AA	G	A
<b>ASMA</b> (n=100)	<b>86</b> (86%)	<b>14</b> (12,7%)	<b>0</b>	<b>0,930</b>	<b>0,070</b>
<b>MODERADA</b> <b>PERSISTENTE</b> (n=48)	<b>40</b> (83,3%)	<b>08</b> (16,6%)	<b>0</b>	<b>0,916</b>	<b>0,083</b>
<b>SEVERA</b> <b>PERSISTENTE</b> (n=52)	<b>46</b> (88,4%)	<b>06</b> (11,5%)	<b>0</b>	<b>0,942</b>	<b>0,005</b>

#### 4. DISCUSSÃO

A asma é decorrente de uma desordem genética complexa, com fenótipo heterogêneo, atribuído à interação entre muitos genes e, entre esses genes e o meio ambiente. É uma doença crônica, incurável, de baixa mortalidade, se comparada à mortalidade de algumas doenças infecciosas e às enfermidades cardiovasculares, mas com prevalência ascendente em todo o mundo, impondo grave sofrimento às crianças e adultos. É grande o impacto dessa doença, em qualquer nível de severidade, na saúde geral e na força de trabalho, porque os sintomas incapacitantes, revelam em todo o mundo um crescente número de hospitalizações e faltas ao trabalho, com repercussões econômicas e sociais previsíveis.

Muitos estudos e investigações têm associado a asma brônquica à mutações gênicas (Carrell & Lomas, 2002; Sandford *et al*, 1999).

A presente investigação distribuiu originalmente os genótipos da A1AT e do TNF- $\alpha$  (-308 G/A), de acordo com o nível de severidade da asma em uma população de asmáticos procedente de Belém, Estado do Pará.

Os testes alérgicos, a prova de função respiratória, tanto quanto os critérios de inclusão e de exclusão, foram aqui utilizados para se compor uma população exclusiva de asmáticos, nos dois níveis mais graves de severidade sintomática, objeto da presente investigação. Sem a interferência de doenças anergizantes e/ou medicamentos inibidores das reações do teste cutâneo; excluídas as naturais dificuldades dos pacientes menores de 10 anos, em atender as recomendações técnicas solicitadas antes e durante as provas espirométricas e, executando com rigor, o exame físico dos pacientes, a aplicação da anamnese alergológica, a análise de exames complementares, como os exames radiográficos, obteve-se, antes da execução dos testes genéticos, uma população de asmáticos, exclusivamente nos dois níveis de severidade desejados. Foram considerados níveis de severidade da doença e não propriamente fenótipos clínicos, pois estes ainda não tem uma definição precisa, especialmente na asma do adulto.

Nesta investigação foi possível verificar que os testes cutâneos de leitura imediata empregados, mostraram-se adequados pela praticidade,

sensibilidade e especificidade. Pelo uso de critérios de exclusão, na composição da população que foi investigada, não houve evidências de reações "falsas", decorrentes de testes inibidos pelo uso de medicamentos ou coexistência de patologia anergizante. Predominaram os testes positivos para *B. tropicalis* 53,6% (59 /110), seguidos de 33% (36/110) para o *D. pterinyssinus* e de 26,3% (29/110) para o *D. farinae*. Entretanto, não há estudos demonstrando, predominância entre os alérgenos da fauna acarina na região de Belém. Sabe-se, entretanto, que em todo o mundo, é na fauna acarina, com algumas poucas variações, que se encontram os aeroalérgenos mais freqüentes entre os sensibilizadores do sistema imune, com repercussões sintomáticas respiratórias, tal como acontece na asma brônquica.

Para serem qualificados como aceitáveis, comparados aos valores teóricos, segundo critérios do consenso brasileiro de espirometria, todos os resultados e curvas, obtidos pela medição e plotagem dos valores respiratórios, foram criteriosamente revistos e, quando necessário, refeitos. Os dados das provas funcionais respiratórias permitiram observar que a prova broncodilatadora foi positiva em todos os pacientes, atestando a existência de espasmo brônquico reversível, ou parcialmente reversível, em 100% (110/110) da população investigada. A variação das médias observadas de broncodilatação, resultante da aerosolização de 400 mcg de salbutamol, entre os níveis de doença moderada persistente e severa persistente, foi de 15% do VEF1, resultado consistente com a diferença de severidade do broncoespasmo, entre esses dois níveis.

Dos 56 pacientes com asma severa persistente, 30,3% (17/56), apresentaram resultados espirométricos compatíveis com o diagnóstico de distúrbio ventilatório obstrutivo, característico da asma, somado a distúrbio ventilatório com componente fixo, restritivo, em graduações variadas, com percentual médio de VEF1/CVF de  $40\pm 5\%$ , VEF1 de  $0,9\pm 5$  L e resposta à broncodilatação de 8% do VEF1 pré-dilatação.

Esses pacientes manifestaram dispnéia incapacitante e, em média, fraca resposta à prova de broncodilatação ( $12\pm 5\%$ ), quando comparada à resposta média dos portadores de asma moderada ( $25\pm 5\%$ ).

O valor médio do volume expiratório máximo no primeiro segundo (VEF1), da asma moderada, foi de  $78\% \pm 5\%$  antes da broncodilatação, mas com acréscimo de  $25\% \pm 5\%$ , após a prova de broncodilatação, o que significa broncoconstrição reversível. Nos pacientes com doença severa persistente, o VEF1 médio foi de  $0,9 \pm 5$  L, significando constrição mais acentuada e com fraca resposta à prova de dilatação, com valor médio de  $12\% \pm 5\%$ .

Os valores espirométricos dos asmáticos moderados persistentes (54/110), de qualquer um dos genótipos da A1AT, nesse nível de doença, MM (49/110), MS (3/110), MZ (1/110) e SS (1/110), não puderam ser associados às variações clínicas atribuíveis a qualquer um deles, até o momento dessa investigação. O paciente heterozigoto MZ, contando no presente momento com 22 anos de idade, será acompanhado clinicamente e submetido às provas funcionais respiratórias subseqüentes, para demonstração da evolução percentual do seu declínio ventilatório (previsto por ser portador do alelo Z), o que representa procedimento não aplicável à esta investigação transversal.

Quando considerados conjuntamente, os genótipos deletérios da A1AT devem contribuir para o agravamento da asma, ou a sua severidade, pois foi observada diferença estatística significativa, entre os dois níveis de severidade investigados ( $\chi^2 = 6,63$ ;  $p=0,017$  - no programa CLUMP). Com a aplicação do teste de regressão logística simples foi possível observar que os asmáticos portadores de genótipos deletérios tem, aproximadamente, 4 vezes mais chances de se situarem no nível da asma severa persistente (OR=3,9200;  $p=0,0138$ ).

Essa observação sugere, uma crescente hiperresponsividade brônquica nos portadores de alelos deficientes da A1AT, por provável agravamento da inflamação e do remodelamento brônquicos, tal como já havia sido antes concluído (Colp, C., 1990), entretanto, sem ter este autor feito vinculações formais aos níveis de severidade da doença.

A associação sugerida por outra investigação recente, envolvendo 5629 crianças, entre 9 e 11 anos, concluiu que, embora os portadores de genótipos MS ou MZ não tenham risco aumentado de desenvolver asma, os asmáticos com baixos níveis de A1AT são tendentes ao desenvolvimento de hiperreatividade brônquica e a redução de suas funções respiratórias (von Ehrenstein, 2004).

É possível, que esses dados confirmem a hipótese de que os asmáticos com alelos deficientes experimentem no decurso da sua doença, um agravamento crescente e global dos sintomas, com declínio de seus parâmetros ventilatórios, e conseqüente migração de um nível de severidade menor para outro nível de maior gravidade sintomática. Os alelos deletérios da A1AT, devem ser para os asmáticos, fatores complicadores da doença, o que sustenta a recomendação da OMS de que todo asmático, fumante ou não, em qualquer nível da doença, deve submeter-se aos testes de A1AT.

Embora a comprovação do papel exercido pelas mutações aqui investigadas dependa de outros trabalhos, serão necessários os estudos prospectivos de coorte, envolvendo uma amostra maior de asmáticos com grandes períodos de tempo de acompanhamento dos enfermos, para responder à indagação principal que ensejou essa investigação. Ressaltem-se os estudos epidemiológicos da asma, que tenham presentes entre os seus métodos, a genotipagem para A1AT. As observações feitas em investigação recente, com cerca de 5 mil crianças asmáticas, indicam que os asmáticos com baixos níveis de A1AT são particularmente tendentes a desenvolver hiperreatividade brônquica e terem sua capacidade ventilatória reduzida progressivamente (von Ehrenstein, 2004).

Quando distribuídos nos níveis da doença moderada e severa, o genótipo GA do TNF- $\alpha$  (-308 G/A) não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os níveis, tanto no teste binomial ( $p$  bilateral=0,0745), quanto no teste do Qui-quadrado ( $\chi^2 = 0,267$ ;  $p=0,8101$ ). Observa-se, por estes resultados, que o TNF- $\alpha$  (-308 G/A), não foi pela presente investigação, considerado fator genético contributivo para o agravamento da asma brônquica alérgica.

## 5. CONCLUSÕES

O presente trabalho descreveu a ocorrência dos alelos S e Z da alfa-1 antitripsina (A1AT) e do polimorfismo genético do TNF- $\alpha$  (-308 G/A), em pacientes portadores de asma brônquica, com diferentes níveis de severidade da doença. Da presente investigação foi possível concluir que:

- a investigação de genótipos da A1AT poderão auxiliar na determinação dos fenótipos clínicos da asma, especialmente a asma do adulto, já que a classificação de pacientes asmáticos em níveis de severidade da doença, obedece a critérios meramente clínicos, especialmente a persistência da dispnéia.
- os testes alérgicos cutâneos de leitura imediata, por punctura, mostraram-se adequados como auxiliares no alergodiagnóstico etiológico da doença, com relação à fauna acarina, utilizada nessa investigação, tão somente para compor a coorte investigada, exclusivamente por asmáticos alérgicos.
- foi observado que o maior número de testes alérgicos positivos, 53,6% (59/110), ocorreu com os alérgenos da espécie *Blomia tropicalis*.
- foi observada uma crescente hiperreatividade brônquica nos portadores de alelos deficientes da A1AT.
- foi observada diferença estatística significativa entre os níveis de doença moderada persistente e severa persistente, quando se considerou apenas os portadores dos genótipos deletérios da A1AT: teste binomial:  $p$  bilateral= 0,0116; teste do Qui-quadrado:  $\chi^2 = 5,271$  e  $p = 0,0387$  com correção de Yates (Bioestat 3) e  $\chi^2 = 6,63$ ;  $p = 0,017$  (CLUMP).

- foi observado pela aplicação do teste de regressão logística simples, que os asmáticos portadores de genótipos deletérios tem, aproximadamente 4 vezes mais chances de apresentar asma no nível de doença severa persistente (OR=3,92;  $p=0,0138$ ).
- as observações feitas nessa investigação indicam que asmáticos com baixos níveis de A1AT são particularmente tendentes a desenvolver hiperreatividade brônquica e terem sua capacidade ventilatória reduzida progressivamente.
- não foi observada associação estatisticamente significativa entre os portadores do genótipo GA do TNF- $\alpha$  (-308 G/A) e os níveis de severidade investigados da asma, tanto no teste do Qui-quadrado ( $\chi^2 = 0,267$ ;  $p = 0,8101$ ), como no teste binomial ( $p$  bilateral =0,0745).

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADNER, M. Na assay to evaluate the long-term effects os inflammatory mediators on murine airway smooth muscle: evidence that TNF alpha up-regulates 5-HT (2 A )- mediated contraction. **Br J Pharmacol** 2003; 137(7):934-41.

ALBES B., BAYLE-LEBEY, P., BAZEX, J. & LAMANT, L. Panniculitis revealing alpha-1-antitrypsin deficiency. **Annales Medicine Interne**, 152 (8): 502-6, 2001. 140, 1963.

AXELSSON, U., LAURELL, C. B. Hereditary variants of serum alpha-1-antitrypsin. **Am J Hum Genet** 1965; 17(6):466-472.

BAO, J-J, REED-FOURQUET, L., SIFERS, R. N., KIDD, V. I., WOO, S. L. C. Molecular structure and sequence homology of a gene related to  $\alpha_1$ -antitrypsin in the human genome. **Genomics** 1988; 2:165-173.

BEATTY, K., BIETH, J. TRAVIS, J. Kinetics of association of serine proteinases with native and oxidized  $\alpha_1$ -proteinase inhibitor and  $\alpha_1$ -antichymotrypsin. **J Biol Chem** 1980; 55:3931-3934.

BEL, E.H. Clinical phenotypes of asthma. **Curr Opin Pulm Med** 2004; (1):44-50.

BILINGSLEY, G. D., WALTER, M. A., HAMMOND, G. L., COX, D. W. Physical mapping of four serpin genes:  $\alpha_1$ -antitrypsin,  $\alpha_1$ -antichymotrypsin, corticosteroid-binding globulin, and protein C inhibitor, within a 280-kb region on chromosome 14q32.1. **Am J Hum Genet** 1993; 52:343-353.

BRANTLEY, M. L., PAUL, L. D., MILLER, B. H., FALK, R. T., WU, M., CRYSTAL, R. G. Clinical features and history of the destructive lung disease associated with  $\alpha_1$ -antitrypsin deficiency of adults with pulmonary symptoms. **Am Rev Respir Dis** 1988; 138: 327-336.

BRANTLY, M., NUKIWA, T., CRYSTAL, R. G. Molecular basis of a  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency. *Am J Med* 1988; 84:13-31.

BRANTLY, M., NUKYWA, T., CRYSTAL, R. G. Molecular basis of alpha-1-antitrypsin deficiency. **Am J Med** 1988; 84 (6A):13-31.

CARLSON J. A., ROGERS, B. B, SIFERS, R. N, HAWKINS, H. K., FINEGOLD, M. J., WOO S. L. C. Multiple tissues express alpha1-antitrypsin in transgenic mice and man. **J Clin Invest** 1988; 82: 26-36.

CASTELL, J. V., GÓMEZ-LECHÓN, M. J., DAVID, M., HIRANO, T., HEINRICH, P. C. Recombinant human interleukin-6 (IL-6/BSF-2/HSF) regulates the synthesis of acute phase proteins in human hepatocytes, **FEBS Lett** 1988; 232:437-350.

CHOWANADISAI, W. & LONNERDAL, B. Alpha-1-antitrypsin and antichymotrypsin in human milk: origin, concentration and stability. **American Journal of Clinical Nutrition**, 76(4): 828-33, 2002.

COLP, C. Profile of bronchospastic disease in Puerto Rican patients in New York City: A possible relationship to A1AT variants. **Arch Intern Med**1990; 150:2349-2354

CRYSTAL, R. G.  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency, emphysema, and liver disease: Genetic basis and strategies for therapy. **J Clin Invest** 1990; 85:1343-1352.

CRYSTAL, R. G. The  $\alpha$ <sub>1</sub>-antitrypsin gene and its deficiency states. **Trends Genet** 1989; 5:411-417.

CRYSTAL, R. G. The alpha-1-antitrysin gene and its deficiency states. **Trends Genetic**, 5: 411-417, 1989.

CRYSTAL, R. G., BRANTLY, M. L. HUBBARD, R. C., CURIEL, D. T., STATES, D. J. & HOLMES, M. D. The alpha-1-antitrypsin gene and its mutations: Clinical consequences and strategies for therapy. **Chest** 95: 196-208, 1989.

CURIEL, D. T., CHYTIL, A., COURTNEY, M., CRYSTAL, R. G. Serum  $\alpha_1$ -antitrypsin deficiency associated with the common S-type (Glu<sup>264</sup> → Val) mutation results from intracellular degradation of  $\alpha_1$ -antitrypsin prior to secretion. **J Biol Chem** 1989; 264:10477-10486.

DAHL M., TYBJAERG-HANSEN A., LANGE P., VESTBO J. & NORDESTGAARD B. G. Change in lung function and morbidity from chronic obstructive pulmonary disease in alpha -1-antitrypsin MZ heterozygotes: a longitudinal study of the general population. **Annals Internal Medicine**, 136(4): 270-9, 2002.

DE SERRES, F. J. Worldwide racial and ethnic distribution of alpha-1-antitrypsin deficiency: summary of an analysis of published genetic epidemiologic surveys. **Chest**, 122(5): 1818-29, 2002.

DICKSON, I., ALPER, C. A. Changes in serum proteinase inhibitor levels following bone surgery. **Clin Chim Acta** 1974; 54:381-385.

DOWSON, L. J., GUEST, P. J. & STOCKLEY, R. A. The relationship of chronic sputum expectoration to physiologic, radiologic and health status characteristics in alpha-1-antitrypsin deficiency (Pi Z). **Chest**, 122(4): 1247-55, 2002.

EDEN E., HAMMEL J., & Rouhani FN. Asthma features in severe alpha(1)-antitrypsin deficiency: Experience of the heart, lung and blood Institute registry.

ENGSTROM, G., LIND, P., HEDBLAD, B., WOLMER, P., STAVENOW, L., JANZON, L & LINDGARDE, F. Lung function and cardiovascular risk: relationship with inflammation-sensitive plasma proteins. **Circulation**, 106(20): 2555-60, 2002.

ERIKSON, S. Studies in  $\alpha$ -1-antitrypsin deficiency. **Acta Medica Scandinavia**, 177: 421-428, 1965.

ERIKSSON, S. Pulmonary emphysema and  $\alpha$ -1-antitrypsin deficiency. **Acta Medica Scandinavia**, 175: 197-205, 1964.

FABER, J. P., WAIDINGER, S. & OLEK, K. Sequence data of the rare deficient  $\alpha$ -1-antitrypsin Pi Zaugusburg. **American Journal of Human Genetic**, 46: 1158-1162, 1990.

FAGERHOL, M., BRAEND, M. Serum prealbumin: polymorphism in man. **Science** 1965; 419:986-987.

FAUST D., HORMAN S., FRIEDRICH-SANDER M. MILOVIC V. & STEIN J. Butyrate and the cytokine-induced  $\alpha$ -1-antitrypsin inhibitor release in intestinal epithelial cells. **European Journal of Clinical Investigation**, 31 (12): 1060-3, 2001.

FAUST, D., RASCHKE, K., HORMANN, S., MILOVIC, V. & STEIN, J. Regulation of  $\alpha$ -1-proteinase inhibitor release by proinflammatory cytokines in human intestinal epithelial cells. **Clinical Experimental Immunology**, 128(2): 279-84, 2002.

FOCCILO, G., GIUNTA, R., De CAPITE, C., MORDENTE, S. & LUCIVERO, G. Pffeifer-Webwe-Christian's panniculitis in an obese patient with antinuclear antibody-positive leukocytoclastic vasculitis. **Annals Italian Medicine Intern**, 17(2): 121-5, 2002.

GADEK, J. E., ZIMMERMAN, R. L., FELLS, G. A., RENNARD, S. I., CRYSTAL, R. G. Antielastase of the human alveolar structures: implications for the protease-antiprotease theory of the emphysema. **Journal Clinical Investigation**, 68: 889-898, 1981.

GROSS, P., BABYAK, M. A., TOLKER, E. & KASCHAK, M. Enzymatically produced emphysema, a preliminary report. **Journal Occupational Medicine**, 6: 481-484, 1964.

GROSS, P., PFITZER, E. A. & TOLKER, E. Experimental emphysema: Its production with papain in normal and silicotic rats. **Archives Environmental Health**, 11: 50-8, 1965.

HAAEGERUP, A., BJERKE, T., BINDERUP, H.G., DAHL, R. & KRUSE, T.A. Asthma and atopy – a total genome scan for susceptibility genes. **Allergy**, 57(8):680-6, 2002.

HAKONARSON, H. & HALAPI, E. Genetic analysis in asthma: current concepts and future directions. **American Journal of Pharmacogenomics**, 2 (3): 155-66, 2002.

HEINZMENN, A. Genetic variants of IL-13 signalling and human asthma and atopy. **Human Mol Genet**, 9:549, 2000.

HIZAWA, N., YAMAGUCHI, E., KONNO, S., TANINO, Y., JINUSHI, E. & NISHIMURA, M. A functional polymorphism in the RANTES gene promoter is associated with the development of late-onset asthma. **American Journal of Respiratory Critical Care Medicine**, 166(5): 686-90, 2002.

HOFKER, M. H., NELEN, M., KLASSEN, E. C., NUKIWA, T., CURIEL, D., CRYSTAL, R. G., FRANTS, R. R. Cloning and characterization of an  $\alpha_1$ -antitrypsin like gene 12 kb downstream of the genuine  $\alpha_1$ -antitrypsin gene. **Biochem Biophys Res Comm** 1988; 155:634-642.

HOLLA, L. I., BUCKOVA, D., KUHOVA, V., FRANCOVA, H., ZNOJIL, V. & VACHA, J. Prevalence of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism in patients with atopic asthma. **Clinical Experimental Allergy**, 32(8): 1193-8, 2002.

HUBBARD, R. C, OGUSHI, F., FELLS, G. A., CANTIN, A. M., JALLAT, S., COURTNEY, M., CRYSTAL, R. G. Oxidants spontaneously released by alveolar macrophages of cigarette smokers can inactivate site of  $\alpha$ 1-antitrypsin, rendering it ineffective as an inhibitor of neutrophil elastase. **J Clin Invest** 1987; 80:1299-1295.

HUTCHISON, D. C. & COOPER, D. Alpha-1-antitrypsin deficiency: smoking, decline in lung function and implications for therapeutic trials. **Respiratory Medicine**, 96 (11): 872-80, 2002.

JANCIAUSKIENE, S., DOMINAITIENE, R., STERNBY, N. H., PIITULAINEN, E. & ERICKSON, S. Detection of circulating and endothelial cell polymers of Z and wild type alpha-1-antitrypsin by a monoclonal antibody. **Journal of Biological Chemistry**, 277(29): 26540-6, 2002.

JANOFF, A. & SCHAEFER, S. Mediation of acute inflammation in leucocyte lysosomes. **Nature**, 213: 144-147, 1967.

JANOFF, A. & ZELIGS, J. D. Vascular injury and lysis of basement membrane in vitro by neutral protease of human leukocytes. **Science**, 161: 702-704, 1968.

JANOFF, A., WHITE, R. & CARP, H. Lung injury induced by leukocytic proteases. **American Journal of Pathology**, 97:11-136, 1979.

JEPPSON, J. O., LAURELL, C. B., NOSSLIN, B. & COX, D. W. Catabolic rate of the alpha-1-antitrypsin of the Pi types S and M malton and of asialylated M-protein in man. **Clinical Science Molecular Medicine**, 55: 103-107, 1978.

JOHNSON, D. A., TRAVIS, J. Human alpha-1-protease inhibitor mechanism of action: evidence for activation by limited proteolysis. **Biochem Biophys Res Commun** 1976; 72:33-39.

JONES, E. A., VERGALLA, J., STEER, C. J., BRADLEY-MOORE, P. R. & VIERLING, J. R. Metabolism of intact and desyallated alpha-1-antitrypsin, **Clinical Science Molecular Medicine**, 55: 139-148, 1978.

KALSHEKER, N., MORLEY, S. & MORGAN, K. Gene regulation of the serine proteinase inhibitors alpha-1-antitrypsin and alpha-1-antichymotrypsin. **Biochemistry Society Transaction** 30(2): 93-8, 2002.

KEANE, E. TNF $\alpha$  in bronchial inflamation. **Acta Med Scand** 2000; 204:367-371.

KHAN, H., SALMAN, K. A. & AHMED, S. Alpha-1-antitrypsin deficiency in emphysema. **Journal of Assotiation Phisicians India**, 50: 579-82, 2002.

KOOPMAN, P., POVEY, S., LOVELL-BADGE, R. H. Widespread expression of human  $\alpha_1$ -antitrypsin in trangenic mice revealed by in situ hybridization. **Genes Devel** 1989; 3:16-25.

LAFUENTE, M., CASTERAD, X., LASO, N., MAS, S., PANADES, R., CALLEJA, A., HERNÁNDEZ, S., LAFUENTE, A. Pi\*S and Pi\*Z alpha-1-antitrypsin polymorphism and the risk for asbestosis in occupational exposure to asbestos. **Toxicology Letter**, 136(1): 9, 2002.

LARSSON, C. Natural history and life expectancy in severe  $\alpha_1$ -antitrypsin deficiency, PiZ. **Acta Med Scand** 1978; 204:345-351.

LAURELL, C. B. & ERIKSSON, S. The eletrophoretic alfa1-globulin pattern of serum in alfa-1-antitrypsin deficiency. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratorial Investigation**, 15: 132-140, 1963.

LAURELL, C. B. & ERIKSSON, S. The eletrophoretic alfa1-globulin pattern of serum in alfa-1-antitrypsin deficiency. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratorial Investigation**, 15: 132-140, 1963.

LIN, Y.C. & LU C.C. The association between tumor necrosis factor, HLA-DR alleles, and IgE-mediated asthma in Taiwanese adolescents. **Allergy**, 57(9):831-4, 2002.

LINDSTROM, F. D., SKOGH, T. & LUNDSTROM, I. M. Alpha-1-antitrypsin deficiency in a patient with systemic vasculitis and primary Sjogren's syndrome. **Annals of Rheumatic Disease**, 61 (10): 945-6, 2002.

LIOU, T. J. & CAMPBELL, E. J, Non isotopic enzyme-inhibitor interactions: a novel non-oxidative mechanism for quantum proteolysis by human neutrophils. **Biochemistry**, 34: 16171-16177, 1996.

LOEBERMANN, H., TOKUOKA, R., DEISENHOFER, J. & HUBER, R. Human alpha 1 proteinase inhibitors: crystal structure analysis of two crystal modifications, molecular model and preliminary analysis of the implications for functions. **Journal of Molecular Biology**, 177: 531 556, 1984.

LOEBERMANN, H., TOKUOKA, R., DEISENHOFER, J., HUBER, R. Human  $\alpha_1$ -antitrypsin inhibitor: Crystal structure analysis of two crystal modifications, molecular model and preliminary analysis of the implications for function. **J. Mol Biol** 1984; 177: 531-556.

LONG, G. L., CHANDRA, T., WOO, S. L. C., DAVIE, E. W., KURACHI, K. Complete sequence of the cDNA for human  $\alpha_1$ -antitrypsin and the gene for the S variant. **Biochemistry** 1984; 23:4828-4837.

LONG, G. L., CHANDRA, T., WOO, S. L., DAVIS, E. W. & KURACHI, K. Complete sequence of the DNA for human alpha-1-antitrypsin and the gene for S variant. **Biochemistry**, 23: 4228-37, 1984.

MAKINO, S., CHOSY, L., VALDIVIA, E., REED, C. E. Emphysema with hereditary  $\alpha_1$ -antitrypsin deficiency masquerading as asthma. **J Allergy** 1970; 46: 40-48.

METZ, R., DICOLO, M., KURIHARA, T., BAYLEY, A., FRANK, B., ROECKLEIN, B. & BLAESE, M. Mode of action of RNA/DNA oligonucleotides: progress in the development of gene repair as a therapy for alpha-1-antitrypsin deficiency. **Chest**, 121 (3 Suppl): 91S – 97S.

MIRAVITLLES, M., VILA, S., TORRELLA, M., BALCELL, S E., RODRIGUEZ-FRIAS, F., JARDI, R. & VIDAL, R. Influence of deficient alpha-1-antitrypsin phenotypes on clinical characteristics and severity os asthma in adults. **Respiratory Medicine**, 96(3): 186-92.

MOLMENTI, E. P., PERIMUTTER, D. H., RUBIN, D. C. Cell-specific expression of  $\alpha_1$ -antitrypsin in human intestinal epithelium. **J Clin Invest** 1993; 92:2022-2034.

MONACI, P., NICOSIA, A., CORTESE, R. Two different liver-specific factors stimulate in vitro transcription from the human a  $\alpha_1$ -antitrypsin promoter. **EMBO J** 1988; 7:2075-2087.

MUJICA-LOPEZ, K. I., FLORES-MARTINEZ, .E., RAMOS-ZEPEDA, R. & SANCHES-CORONA, J. Association analysis of polymorphisms in the interleukin-4 receptor (alpha) gene with atopic asthma in patients from western México. **European Journal of Immunogenetics**, 29 (5): 375-8, 2002.

NOGUCHI E. Haplotypes of the 5' region of the IL-4 gene and SNPs in the intergene sequence between the IL-4 and IL-13 genes are associated with atopic asthma. **Human Immunology**, 62: 1251-1257, 2001.

NUKIWA, T., SATOH, K., BRANTLY, M. L., OGUSHI, F., FELLS, G. A., COURTNEY, M. & CRYSTAL, R. G. Identification of a second mutation in the protein coding sequence of the Z type alpha-1-antitrypsin gene. **Journal of Biological Chemistry**, 261: 15989-94, 1986.

OGUSHI, F., FELLS, G. A., HUBBARD, R. C, STRAUS, S. D., CRYSTAL, R. G. Z-type  $\alpha_1$ -antitrypsin is less competent then M1-type  $\alpha_1$ -antitrypsin as an inhibitor of neutrophil elastase. **J Clin Invest** 1987; 80:1366-1374.

OWEN, M. C., BRENNAN S. O., LEWIS, J. H., CARRELL, R. W. Mutation of antitrypsin to antithrombin  $\alpha_1$ -antitrypsin Pittsburgh (358 Met→Arg), a fatal bleeding disorder. **N Eng J Med** 1983; 309:694-698.

PARMAR, J. S., MAHADEVA, R., REED, B. J., FARAH, N., CADWALDER, K., KEOGAN, M. T., BILTON, D., CHILVERS, E. R. & LOMAS, D. A. Polymers of alpha-1-antitrypsin are chemotactic for human neutrophils: a new paradigm for the pathogenesis of emphysema. **American Journal of respiratory Cell Molecular Biology**, 26(6): 723-30, 2002.

PERLINO, E., CORTESE, R. & CILIBERTO, G. Human alpha-1-antitrypsin gene is transcribed from two different promoters in macrophages and hepatocytes. **Trends Genetic**, 6: 311-318, 1990.

PERLINO, E., CORTESE, R., CILIBERTO, G. The human  $\alpha_1$ -antitrypsin gene is transcribed from two different promoters in macrophages and hematocytes. **EMBO J** 1987; 6:2767-2771.

PERMUTTER, D. H., MAY, L. T., SEHGAL, P. B. Interferon  $\beta$ /interleukin 6 modulates synthesis of  $\alpha_1$  proteinase inhibitor in mononuclear phagocytes. **J Biol Chem** 1988; 263:16499-16503.

PIITULAINEN, E. & SVEGER, T. Respiratory symptoms and lung function in young adults with severe alpha (1) – antitrypsin deficiency ( PiZZ ). **Thorax** , 57 (8): 705-8, 2002.

ROACH, M.A. 2002. Tumor necrosis factor-alpha and airway hypersensitivity **Thorax** , 57(8): 705-8, 2002.

SANDFORD, A. J. & SILVERMAN, E. K. Chronic obstructive pulmonary disease. 1: Susceptibility factors for COPD the genotype – environment interaction. **Thorax**, 57(8): 736-41, 2002.

SEERSHOLM, N. Epidemiology of emphysema in subjects with severe alpha-1-antitrypsin deficiency. **Denmark Medical Bulletin**, 49(2): 145-58, 2002.

SEFTON, L, KELSEY, G, KEARNEY, P, POVEY, S. WOLFE, J. A physical map of the human PI and AACT genes. **Genomics** 1990; 7:382-388.

SHAM, P. C., CURTIS, D. 1998. Monte Carlo tests for associations between disease and alleles at highly polymorphic loci. **Ann. Hum. Genet** 1998; 59:97-105.

SILVERMAN, E. K. Variability of pulmonary function in  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency: clinical correlates. **Ann Intern Med** 1989; 111: 982-991.

SMITH, C. E., JOHNSON, D. A. Human bronchial leucocyte proteinase inhibitor. **Biochem J** 1985; 225:463-472.

SONG, S., SCOTT-JORGENSEN, M., POIRIER, A., CRAWFORD J., CAMPBELL, M. & FLOTTE T. Intramuscular administration of recombinant adeno-associated virus 2 alpha-1-antitrypsin (rAAV-SERPINA 1) vectors in a nonhuman primate model: safety and immunologic aspects. **Molecular Therapy**, 6(3): 329, 2002.

STOCKLEY, R. A., BAYLEY, D. L., UNSAL, I. & DOWSON, L. J. The effect of augmentation therapy on bronchial inflammation in alpha-1-antitrypsin deficiency, **American Journal of Respiratory Critical Care Medicine**, 165(11): 1494-8, 2002.

STOLLER, J. K., ROUHANI, F., BRANTLY, M., SHAHIN, S., DWEIK, R. A., STOKS, J. M., CLAUSEN, J., CAMPBELL, E. & NORTON, F. Biochemical efficacy and safety of a new pooled human plasma alpha (1) – antitrypsin, Respitin, **Chest**, 122 (11): 66 – 74, 2002.

THABUT G, EI-BENNA J. &CORDA S. Tumor necrosis factor-alpha increases airway smooth muscle oxidants production through a NADPH oxidase-like system

to enhance myosin light chain phosphorylation and contractility. **J Biol Chem** 2002 Jun 21;277(25): 22841-21

THOMAS P.S. Tumor necrosis factor-alpha increases airway hipersensitivity. **Immunol Cell Biol.** 2001 Apr;79(2):132-40.).

TOBIN, M. J., COOK, P. J. L., HUTCHISON, D. C. S.  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency: the clinical and physiological features of pulmonary emphysema in subjects homozygous for features P<sub>i</sub> type Z: A survey by the British Thoracic Association. **Br J Dis Chest** 1983; 77: 14-27.

TRAVIS, J. Structure, function, and control of neutrophil proteinases. **Am J Med** 1988; 84: 37-43.

TREXLER, M. M., MCDONALD, K. A. & JACKMAN, A. P. Bioreactor production of human alpha-1-antitrypsin using metabolically regulated plant cell cultures. **Biotechnology Progress**, 18(3): 501-8, 2002.

UNDERHILL, D. A., HAMMOND, G. L. Organization of the human corticosteroid binding globulin gene and analysis of its 5'-flanking region. **Mol Endocrinol** 1989; 3:1448-1454.

VELOSO, S., AGUILAR, X., PANIAGUA, M. J., VIDAL, F. & RICHART C. PiSZ-phenotype alpha-1-antitrypsin deficiency: a rare cause of bronchiectasis. **Archives of Bronchoneumology**, 2002 38 (5): 249-50.

VON EHRENSTEIN, O.S., MAIER, E.M.,WEILAND, S.K.,CARR,D. Alpha 1-antitrypsin and the prevalence and severity of asthma. **Arch Dis Child**, 2004 89(3):230-235.

WEWERS, M. D., CASOLARO, M. A., SELLERS, S. E., SWAYZE, S. C., MCPAUL, K. M. Replacement therapy for alpha-1-antitrypsin associated with emphysema. **New England Journal of Medicine**, 1987 316: 1055-1062.

WILSON, J.S., GALVIN, R.J. Normal diffusing capacity in patients with PiZ Alpha 1- antitrypsin deficiency, severe airflow obstruction, and significant radiographic emphysema. **Chest**, 2000 118:867-871.

WU, S. S., DE CHADAREVIAN, J. P., MACPHAUL, L., RILEY, N. E., LEEWEN F. W. & FRENCH, F. W. Coexpression and accumulation of ubiquitin +1 and ZZ protein in livers of children with alpha(1)-antitrypsin deficiency. **Pediatric Development Pathology** 2002 5(3): 293-8.

## ANEXO 1

---

---

“VERIFICAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DA ALFA-1-  
ANTITRIPSINA E DO TNFSF 2 (-308 G/A) COM A ASMA BRÔNQUICA”  
*Elias Dahan*

ORIENTADOR: PROF DR. SIDNEY EMANUEL BATISTA DOS SANTOS

### **TRATAMENTO ESTATÍSTICO**

Delineamento básico da investigação:

Trata-se de um estudo transversal, de Bioestatística inferencial, envolvendo variáveis nominais, numéricas e binárias, de população fechada de 2 conjuntos de amostras.

- Estudo Transversal (“levantamento”) o desfecho e o fator em estudo foram avaliados simultaneamente, em um momento específico de tempo.
- Estudo Inferencial porque incluiu técnicas (testes de significância) por meio das quais foram tiradas conclusões sobre populações estatísticas, baseadas em dados obtidos de amostras.

### **TESTES APLICADOS**

- **Teste binomial (duas proporções):** teste estatístico baseado na distribuição binomial ou na aproximação à curva normal, onde se comparam as proporções de duas amostras. Destinado a testar a diferença entre duas proporções amostrais independentes, procurando-se determinar se a diferença  $(p_1 - p_2)$  é de tal grandeza que permita rejeitar a hipótese de nulidade.
- **Teste do qui-quadrado (amostras independentes):** teste estatístico para  $n$  amostras independentes, cujas proporções observadas nas diversas modalidades estão dispostas em tabelas de contingência  $I \times c$ , sendo os valores esperados deduzidos matematicamente, e onde se procura determinar se as proporções observadas nas diferentes categorias são independentes ou

estão associadas. O qui-quadrado apresenta uma família de distribuição de variáveis com  $(l - 1) \times (c - 1)$  graus de liberdade.

## A ESCOLHA DOS TESTES ESTATÍSTICOS EXECUTADOS

### Teste binomial

As amostras atendem às exigências para a aplicação do Teste binomial, ou seja, amostras de tamanhos suficientes para a devida distribuição binomial à curva normal :

$$\begin{array}{ccc} \text{Moderada:} & & \text{Severa:} \\ n_1 p_1 q_1 \geq 5 & e & n_2 p_2 q_2 \geq 5 \end{array}$$

$$\begin{array}{l} \text{No caso da A1AT : Moderada: } 110 \times 0,05 \times 0,95 = \mathbf{5,2} \\ \text{Severa: } 110 \times 0,16 \times 0,84 = \mathbf{14,7} \end{array}$$

$$\begin{array}{l} \text{No caso do TNF : Moderada: } 100 \times 0,08 \times 0,92 = \mathbf{7,36} \\ \text{Severa : } 100 \times 0,06 \times 0,94 = \mathbf{5,64} \end{array}$$

### Qui-Quadrado

Teste não-paramétrico para comprovar que as duas amostras independentes provieram da mesma população.

- Amostras apresentam duas categorias (Moderada e Severa) em tabelas de contingência 2x2, por esta razão sofreu a correção de continuidade (Yates).
- valor de n (soma de todas as modalidades) é maior que 20.

### Regressão logística simples

- Determinar a dependência dos níveis de severidade em relação aos genótipos deletérios da A1AT .
- Variável dependente deve ser binária.
- Variável independente pode ser binária ou contínua.
- Valores binários assumidos: 1 (sucessos).  
0 (insucessos).

As Tabelas 11 e 12 sumarizam os valores estatísticos encontrados.

Tabela 11 - Resultados dos testes estatísticos.

	TESTE BINOMIAL (p)	QUI-QUADRADO
<b>• TODO OS GENÓTIPOS</b>		
Moderada x Severa	0,0798	$\chi^2= 7,11$ P= 0,096
<b>• GENÓTIPOS DELETÉRIOS :</b>		
Moderada x Severa	0,0116	$\chi^2= 6,63$ P= 0,017

Tabela 12 - A1AT: Regressão logística simples .

Tabela 12 – RGRESSÃO LOGÍSTICA SIMPLES.

Y = severa      x 1= Genótipos deletérios

Variáveis	p-valor	odds
x1	0,0138	3,920