

*ANA CAROLINA ZIMIANI DE PAIVA*

**ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS GLN27, GLU27,  
ARG16 E GLY16 DO GENE ADRB2R COM ASMA**

*CAMPINAS*

*2007*

**ANA CAROLINA ZIMIANI DE PAIVA**

**ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS GLN27, GLU27,  
ARG16 E GLY16 DO GENE ADRB2R COM ASMA**

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da  
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual  
de Campinas para obtenção do título de Mestre em  
Farmacologia.*

*Orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Carmen Sílvia Bertuzzo*

**CAMPINAS**

**2007**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

P166a Paiva, Ana Carolina Zimiani de  
Associação dos polimorfismos Gin27, Glu27, Arg16 e Gly16 do  
gene ADRB2R com asma / Ana Carolina Zimiani de Paiva. Campinas,  
SP : [s.n.], 2007.

Orientador : Carmen Silvia Bertuzzo  
Dissertação ( Mestrado ) Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Asma. 2. Polimorfismos (Genética). I. Bertuzzo, Carmen  
Silvia. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências  
Médicas. III. Título.

**Título em inglês : Association of the polymorphisms Gln27, Glu27, Arg16 e  
Gly16 from ADRB2 gene with asthma**

**Keywords:** • Asthma  
• Polymorphisms (Genetic)

**Titulação: Mestrado em Farmacologia**

**Banca examinadora: Profa. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo  
Profa. Dra. Mônica Barbosa de Melo  
Profa. Dra. Vera Lúcia Gil da Silva Lopes**

**Data da defesa: 12-02-2007**

## **BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

---

### **Orientador:**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carmen Sílvia Bertuzzo**

### **Membros:**

**Prof. Dra. Carmen Sílvia Betuzzo**

**Prof. Dra. Mônica Barbosa de Melo**

**Profa. Dra. Vera Lúcia Gil da Silva Lopes**

**Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da  
Universidade Estadual de Campinas.**

**Data: 12/02/2007**

## ***DEDICATÓRIA***

Dedico este trabalho aos meus pais, Silvio de Paiva e Eunides Zimiani de Paiva, e à minha irmã Mariana Zimiani de Paiva.

## *AGRADECIMENTOS*

---

Agradeço em primeiro lugar a Deus por ter me proporcionado a realização de meu maior sonho.

Aos meus pais e minha irmã que sempre estiveram ao meu lado durante toda a vida.

Aos meus tios de coração, que são mais que minha família, Amazília de Oliveira Sadano e Ykuho “João” Sadano que me deram o amor e carinho que só esperamos de verdadeiros parentes.

À D.<sup>a</sup> Rosinha (Rosa Pereira Dias), que sempre me acolheu como neta e me apóia há anos.

À Maria Madalena “Madá” Vasconcelos Rosa, que teve a paciência de me ensinar e por quem tenho um carinho muito especial.

À minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Carmen Sílvia Bertuzzo, pela confiança, amizade e por ter me dado esta grande oportunidade.

Às minhas grandes amigas-irmãs Lucila Gobby Amstalden e Lillian Barbosa de Queiroz por toda amizade e carinho.

À Dr.<sup>a</sup> Adyléia Dalbo Toro e ao Prof. Dr. José Dirceu Ribeiro pela imensurável colaboração.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Genética Molecular, do departamento de Genética Médica.

*“Desenvolver força, coragem e paz interior demanda tempo. Não espere resultados rápidos e imediatos, sob o pretexto de que decidiu mudar. Somente sua vontade não basta para transformá-lo, como por mágica. Cada ação que você executa permite que essa decisão se torne efetiva dentro de seu coração. Não se deve mudar de opinião se não se pode mudar de conduta.”*

***Dalai Lama***

	<i>Pág.</i>
<b>RESUMO</b> .....	<i>xiv</i>
<b>ABSTRACT</b> .....	<i>xvii</i>
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	20
<b>1- Definição de Asma Atópica</b> .....	21
<b>2 – Epidemiologia</b> .....	22
<b>3 – Fatores que influenciam o desenvolvimento e a expressão da asma</b> .....	23
<b>4 – Diagnóstico</b> .....	25
4.1 – Clínico.....	25
4.2 – Funcional.....	25
4.3 - Testes adicionais.....	26
<b>5 – Classificação da gravidade da asma</b> .....	26
<b>6 – Patologia e patogenia</b> .....	27
<b>7 – Farmacologia</b> .....	28
7.1 – Classificação dos receptores.....	28
7.2 – Receptores ligados à proteína G.....	28
7.3 – Transdução ligada às proteínas G.....	29
7.4 – Os Receptores Adrenérgicos.....	30
7.5 – O beta-2-adrenorreceptor.....	30
7.6 – Ativação do $\beta$ 2-AR.....	33
7.7 – Mecanismo de ação do $\beta$ 2-AR.....	34
7.8 – Ações do $\beta$ 2-AR.....	35

<b>8 – Genética</b> .....	36
8.1 – Clonagem.....	36
8.2 – Polimorfismos.....	36
<b>9 – Associação com Asma</b> .....	40
<b>10 – Importância clínica</b> .....	41
<b>OBJETIVOS</b> .....	45
<b>ASPECTOS ÉTICOS, CASUÍSTICA E MÉTODOS</b> .....	47
<b>Aspectos éticos</b> .....	48
<b>Casuística e Métodos</b> .....	48
1 - Casuística.....	48
2 - Métodos.....	48
3 – Análise Estatística.....	51
<b>RESULTADOS</b> .....	52
<b>3 – Análise dos diferentes genótipos entre pacientes e controles sadios</b> .....	58
<b>DISCUSSÃO</b> .....	60
<b>1 – Códon 16</b> .....	61
<b>2 – Códon 27</b> .....	62
<b>3 – Análise dos diferentes genótipos entre pacientes e controles sadios</b> .....	63
<b>CONCLUSÃO</b> .....	65
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	67
<b>ANEXOS</b> .....	75
<b>Anexo 1</b> .....	76

## *LISTA DE ABREVIATURAS*

---

<b>Arg</b>	arginina
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	cálcio
<b>GINA</b>	Global Initiative for asthma, 2006
<b>Gln</b>	glutamina
<b>Glu</b>	ácido glutâmico
<b>Gly</b>	glicina
<b>GDP</b>	difosfato de guanosina
<b>GTP</b>	trifosfato de guanosina
<b>Ile</b>	isoleucina
<b>ISAAC</b>	Worldwide variations in the prevalence of asthma symptoms: the International Study of asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) – Eur Respir J., 1998; 12(2):315-35. Comment in: Eur Respir J., 1998; 12(4):1000.  Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivities, and atopic eczema: ISAAC. : The International Study of asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) – Steering Committee. Lancet, 1998; 351(111):125-32.
<b>K<sup>+</sup></b>	potássio
<b>Met</b>	metionina
<b>PKA</b>	proteína quinase A
<b>PFE</b>	pico do fluxo expiratório
<b>Pré-bd</b>	Pré-broncodilatador
<b>Thr</b>	Treonina
<b>Val</b>	valina
<b>VFE</b>	volume expiratório final
<b>SNP</b>	polimorfismo de nucleotídeo simples

## *LISTA DE TABELAS*

---

	<i>Pág.</i>
<b>Tabela 1-</b> Classificação da gravidade da asma.....	27
<b>Tabela 2-</b> Frequência dos comuns genótipos do gene beta-2-adrenérgico em indivíduos sadios e asmáticos.....	36
<b>Tabela 3-</b> Relação de primers que serão utilizados nos testes de ARMS.....	49
<b>Tabela 4-</b> Frequência dos alelos no códon 16 entre pacientes e controles.....	53
<b>Tabela 5-</b> Análise do genótipo no códon 16 de asmáticos e grupo controle.....	54
<b>Tabela 6-</b> Análise do genótipo de pacientes com asma grave, moderada e leve no códon 16.....	55
<b>Tabela 7-</b> Frequência dos alelos no códon 27 entre pacientes e controles.....	56
<b>Tabela 8-</b> Análise do genótipo no códon 27 de asmáticos e grupo controle.....	56
<b>Tabela 9-</b> Análise dos genótipos dos pacientes com asma grave, moderada e leve no códon 27.....	57
<b>Tabela 10-</b> Frequência dos diferentes genótipos entre os pacientes de asma grave, moderada e leve.....	59

## *LISTA DE FIGURAS*

---

	<i>Pág.</i>
<b>Figura 1</b> - Estrutura do $\beta$ -adrenorreceptor humano (Johnson, 1998).....	32
<b>Figura 2</b> - Farmacologia integrada – Clive Page et al. – 2ª Edição – 2004....	33
<b>Figura 2</b> - Fotos de PCRs.....	51

*LISTA DE QUADROS*

---

	<i>Pág.</i>
<b>Quadro 1-</b> Fatores que influenciam o desenvolvimento e expressão da asma.....	24

## *LISTA DE ESQUEMAS*

---

	<i>Pág.</i>
<b>Esquema 1-</b> Efeito da ativação dos receptores $\beta_2$ -adrenérgicos. (Adaptado de Asma: um grande desafio/Editor convidado Álvaro A. Cruz – São Paulo: Editora Atheneu, 2005).....	35
<b>Esquema 2-</b> Anelamento de primer códon 16.....	50
<b>Esquema 3-</b> Anelamento de primer códon 27.....	50



## ***RESUMO***

A asma atópica é uma doença com prevalência média na população brasileira de 20%. Estima-se que 60% dos casos de asma sejam intermitentes ou persistentes leves, 25% a 30% moderados e 5% a 10% graves.

O receptor beta-2-adrenérgico, quando ativado, provoca o relaxamento da musculatura lisa das vias aéreas. Os polimorfismos Arg -> Gly 16 (46 A->G) e Gln -> Glu27 (79C->G) do gene ADRB2 provocam uma mudança nos aminoácidos situados ao lado do sítio ligante do receptor. Estes receptores não são responsáveis pela presença da asma, mas agem como moduladores de gravidade da doença.

Desse modo, o estudo dos polimorfismos do gene ADRB2 é muito importante para prever a resposta ao uso de broncodilatadores beta-adrenérgicos no tratamento da asma atópica.

Os objetivos do trabalho foram:

- 1) Determinar o genótipo de pacientes asmáticos e voluntários sadios quanto aos polimorfismos Gln27, Glu27, Arg16 e Gly16.
- 2) Verificar se existe correlação entre o genótipo estudado e a gravidade da asma.

Foram genotipados 87 pacientes com asma atópica, de acordo com o critério GINA, e 141 voluntários sadios. Após a extração de DNA do sangue periférico foi efetuada PCR-alelo específica (ARMS)

No método de ARMS-PCR é utilizado um primer comum a todas as reações e outro alelo específico, isto é, apenas uma base nitrogenada é diferente. Além disso é utilizado um par de primers como controle interno da reação.

Os resultados encontrados foram analisados através do teste de qui-quadrado.

Amostra de pacientes quanto ao códon 16 não está em equilíbrio de Hardy-Weinberg, entretanto a amostra controle está. No códon 27, ambas as amostras estão em desequilíbrio.

A diferença na frequência dos alelos no códon 16 entre os pacientes e o grupo controle foi significativa, enquanto no códon 27 não.

Na comparação entre os diferentes genótipos no códon 16 dos asmáticos e do grupo controle foi observada diferença significativa, mostrando que o alelo Arg 16 pode estar envolvido na etiologia da asma.

Comparando-se os pacientes com asma grave e grupo controle, foi encontrada uma diferença significativa, assim como quando comparados os pacientes com moderada, também sendo encontrada diferença significativa quando comparados os pacientes leve.

No códon 27 verificou-se diferença significativa entre os genótipos dos pacientes e voluntários saudáveis.

Comparando-se os pacientes com asma grave e grupo controle foi encontrado uma diferença significativa, assim como quando comparados os pacientes com moderada, também sendo encontrada diferença significativa quando comparados os pacientes leve.

Na verificação dos genótipos do grupo controle e do total de pacientes temos uma diferença significativa.

Na comparação entre os grupos de asmáticos só tivemos diferença significativa entre o grupo de asma grave e leve. Na comparação de asma grave e moderada não tivemos diferença significativa assim como moderada e leve.

Os genótipo homocigotos Arg 16 parece estar relacionada à presença da asma e homocigotos Gln 27 parecem estar associados com a gravidade da asma.



***ABSTRACT***

The atopic asthma is an illness with 20% of average prevalence in the Brazilian population. It's estimated that 60% of the asthma cases are intermittent or persistent light, 25% to 30% moderate and 5% to 10% serious.

The receptor beta-2-adrenergic, when activated, causes the relaxation of the aerial ways' smooth muscle. The polymorphisms Arg -> Gly 16 (46 A->G) and Gln -> Glu27 (79C->G) from the ADRB2 gene cause a change on amino acids situated beside the receptor's linking place.

These receptors are not responsible for the asthma's occurrence, but they act as modulators of the illness' severity.

In this way, the study of the ADRB2 gene's polymorphisms is very important to foresee the reply of using beta-adrenergic bronchodilators in the treatment of the atopic asthma.

The objectives of the proceeding were:

- 1) Determinate the genotype of healthy and asthmatic voluntary patients in respect of the polymorphisms Gln27, Glu27, Arg16 and Gly16.
- 2) Verify if there is a correlation between the studied genotype and asthma's severity.

87 patients with atopic asthma were genotyped, in accordance with the healthy criterion GINA, and 141 volunteers. After the extraction of peripheral blood's DNA, an specific PCR-allele (ARMS) was made.

In the ARMS-PCR method, it is used a common primer for all the reactions and another specific allele, that means, only one base is different. Moreover, a pair of primers is used as internal control of the reaction.

The achieved results were analyzed through the qui-square test.

The patients' sample, according to codon 16, is not in Hardy-Weinberg equilibrium, while the control sample is. In codon 27, both of the samples are in disequilibrium.

The difference in the frequency of alleles in codon 16 between the patients and the control group was significant, while in codon 27 not.

In the comparison between the different genotypes in codon 16 of the asthmatic and the control group, significant difference was observed, showing that the Arg 16 allele can be involved in the asthma's etiology.

Comparing the patients with serious asthma and the control group, significant difference was found, as well as when compared the patients with moderate, also being found significant difference when compared the patients with light. In codon 27, significant difference was verified between the genotypes of patients and healthy volunteers.

Verifying the genotypes of the control group and the total of patients, we have a significant difference.

In the comparison between the asthmatic groups, we only had significant difference between the serious asthma group and the light one. In the comparison between serious and moderate asthma, we didn't have significant difference, as well as between moderate and light.

The genotype homozygote Arg 16 seems to be related to the asthma's occurrence and homozygote Gln 27 seems to be associated with the asthma's severity.



## ***INTRODUÇÃO***

## 1- Definição de Asma Atópica

De acordo com o critério GINA (Global Initiative for Asthma, 2006), a asma é uma doença definida por suas características clínicas, fisiológicas e patológicas. A característica clínica marcante é a história de episódios de respiração mais curta, particularmente à noite e frequentemente acompanhada de tosse. Os chiados apreciados na auscultação no peito são o mais comum achado físico.

A característica fisiológica mais comum da asma, são os episódios de obstrução das vias aéreas, caracterizado pela limitação respiratória. A característica patológica predominante é a inflamação das vias aéreas, às vezes associada às mudanças estruturais das mesmas.

A asma tem significantes componentes genéticos e ambientais, mesmo assim sua patogênese não é muito esclarecida, assim como a definição descritiva. Baseado nas conseqüências funcionais da inflamação das vias aéreas, uma descrição operacional da asma é:

*“Asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas nas quais células e elementos celulares têm um papel. A inflamação crônica associada com a hiper-responsividade das vias aéreas, é devida a episódios recorrentes de resfriados, respiração mais curta, firmeza no peito, e tosse, particularmente à noite ou de manhã cedo. Estes episódios são geralmente associados com a difusão, mais variável, da obstrução do fluxo aéreo dentro do pulmão, que é frequentemente reversível, seja espontaneamente ou com tratamento.”*

Como não há definição fenotípica da asma, pesquisadores que estudam o desenvolvimento desta complexa doença, voltam-se às características que podem ser medidas objetivamente, assim como a atopia (manifesta-se na presença de alérgenos no meio-ambiente), hiper-responsividade aérea, e outras medidas de sensibilização alérgica. Embora a associação entre asma e atopia esteja bem estabelecida, ligações precisas entre as duas condições não estão bem claras e compreensivelmente definidas.

Agora há boas evidências das manifestações clínicas da asma – distúrbios do sono, limitações às atividades diárias, comprometimento da função pulmonar e uso de medicações, podem ser controlados com tratamento apropriado. Quando a asma está controlada, não pode mais haver recorrência de sintomas e exacerbações graves são raras (GINA – Global Initiative for Asthma, 2006).

## **2 – Epidemiologia**

A asma é um problema mundial, que afeta cerca de 300 milhões de indivíduos. Uma estimativa é de que a asma afete cerca de 1% a 18% da população em diferentes países. Existe uma boa evidência de que a prevalência da asma vem aumentando em alguns países; em outros aumentou, mas agora se estabilizou. Ao redor do mundo estima-se que ocorrem anualmente cerca de 250.000 mortes por asma, mas a mortalidade não está bem correlacionada à prevalência (GINA, 2006).

Anualmente ocorrem cerca de 350.000 internações por asma no Brasil, constituindo-se ela, na quarta causa de hospitalização pelo Sistema Único de Saúde (2,3% do total) e sendo a terceira causa entre crianças e adultos jovens (Ministério da Saúde 2005).

Um estudo multicêntrico (International Study for Asthma and Allergies in Childhood – ISAAC, 1998) apontou ser a prevalência média mundial de asma de 11,6% entre escolares (seis e sete anos), oscilando entre 2,4 e 37,6%. Entre adolescentes (treze e catorze anos) a prevalência mundial média, foi de 13,7 e oscilou entre 1,5 e 32,6% (ISAAC, 1998). No Brasil, os índices ainda permanecem elevados, ao redor de 20% para as duas faixas etárias (ISAAC, 1998).

A mortalidade vem aumentando no Brasil nos últimos dez anos, correspondendo de 5% a 10% das mortes por causa respiratória, com elevada proporção de óbitos domiciliares (Ministério da Saúde, 2005).

### **3 – Fatores que influenciam o desenvolvimento e a expressão da asma**

Os fatores que influenciam o risco de asma podem ser divididos entre aqueles que causam o desenvolvimento da asma e aqueles que desencadeiam os sintomas da asma. No primeiro influem fatores intrínsecos (primeiramente genéticos) e em segundo, geralmente influem fatores ambientais (Quadro 1). Entretanto, os mecanismos através dos quais eles desencadeiam o desenvolvimento e expressão da asma, são complexos e interativos. Por exemplo, genes provavelmente interagem com outros genes e fatores ambientais para determinar a susceptibilidade à asma. Em adição, aspectos de desenvolvimento, como a maturação da resposta imune e número de exposições a agentes infecciosos durante os primeiros anos de vida, estão emergindo como importantes fatores que modificam o risco da asma em pessoas com susceptibilidade genética (GINA, 2006).

**Quadro 1-** (GINA, 2006) Fatores que influenciam o desenvolvimento e expressão da asma

<b>Fatores intrínsecos</b>
Genéticos <ul style="list-style-type: none"><li>• Genes que predispõem à atopia</li><li>• Genes que predispõem à hiper-responsividade aérea</li></ul>
Obesidade
Gênero
<b>Fatores ambientais</b>
Alérgenos <ul style="list-style-type: none"><li>• Em ambientes fechados: ácaros domésticos, pêlos de animais (cachorros, gatos, ratos), alérgenos de baratas, fungos.</li><li>• Ambientes abertos: pólen, fungos.</li></ul>
Infecções (predominantemente virais)
Sensibilizadores ocupacionais
Fumaça de tabaco <ul style="list-style-type: none"><li>• Fumante passivo</li><li>• Fumante ativo</li></ul>
Ambientes abertos e fechados poluição do ar
Dieta

Aparentemente, algumas características têm sido ligadas ao aumento do risco da asma, mas não são elas os agentes causais. O grupo racial e as diferenças étnicas na prevalência da asma, refletem variações genéticas com significantes variações sócio-econômicas e fatores ambientais (GINA, 2006).

#### **4 – Diagnóstico:**

##### 4.1 – Clínico:

De acordo com o critério GINA (2006), são indicativos de asma:

- Um ou mais dos seguintes sintomas: dispnéia, tosse crônica, sibilância, aperto no peito ou desconforto torácico, particularmente à noite ou nas primeiras horas da manhã.
- Sintomas episódicos.
- Melhora espontânea ou pelo uso de medicações específicas para asma (broncodilatadores, antiinflamatórios esteróides).
- Diagnósticos alternativos excluídos.

##### 4.2 – Funcional:

- Espirometria.
- Pico do Fluxo Expiratório (GINA, 2006).

#### 4.3 - Testes adicionais:

- Teste de broncoprovação com agentes broncoconstritores com alta sensibilidade e alto valor preditivo negativo;
- Teste de broncoprovação por exercício (GINA, 2006).

#### **5 – Classificação da gravidade da asma:**

A asma pode ser classificada quanto à gravidade em: intermitente e persistente leve, moderada e grave, segundo os sintomas, limitação do fluxo respiratório e avaliação da função pulmonar (GINA, 2006).

Estima-se que 60% dos casos de asma sejam intermitentes ou persistentes leves, 25% a 30% moderados e 5% a 10% graves (GINA, 2006).

A avaliação da gravidade da asma pode ser feita pela análise da frequência e intensidade dos sintomas e pela função pulmonar, como resumido na tabela 1.

**Tabela 1-** (GINA) Classificação da gravidade da Asma

	<b>Sintomas diurnos</b>	<b>Sintomas noturnos</b>	<u>PFE ou FEV1</u> Variabilidade do PFE
<b>Intermitente</b>	< 1 vez / semana	≤ 2 vezes / mês	<u>≥ 80%</u>
	Assintomático e PFE normal entre as crises		< 20 %
<b>Persistente leve</b>	> 1 vez / semana mas < 1 vez / dia	> 2 vezes / mês	<u>≥ 80%</u> 20-30%
	Crises podem afetar a atividade		
<b>Persistente moderada</b>	Diários	> 1 vez / semana	<u>60-80%</u>
	Crises afetam as atividades		> 30%
<b>Persistente grave</b>	Contínuos	Frequente	<u>≤ 60%</u>
	Atividade física limitada		> 30%

Siglas:

- PFE: pico de fluxo expiratório;
- VEF: volume expiratório forçado.

## 6 – Patologia e patogenia:

A inflamação brônquica constitui o mais importante fator fisiogênico da asma. É resultante de interações complexas entre células inflamatórias, mediadores e células estruturais das vias aéreas. Ela está presente em todos os pacientes asmáticos, inclusive naqueles com asma de início recente, nas formas leves da doença e mesmo entre os assintomáticos (Kumar, 1991; Vignola et al.; 1998).

## 7 – Farmacologia

### 7.1 – Classificação dos receptores:

As drogas que atuam nos receptores, induzem uma ampla variedade de respostas teciduais e de sistemas por duas razões: a primeira é que diferentes receptores são distintamente expressos em diferentes tecidos; a outra é que os diferentes tipos de receptores possuem muitos tipos diferentes de estrutura e, portanto, de função. Por conseguinte, as respostas celulares à ativação do receptor (transdução) variam consideravelmente conforme a estrutura do receptor. Com base nisto, existem quatro tipos de receptores, referidos como superfamílias de receptores:

- Receptores acoplados à proteína G
- Receptores acoplados ao DNA
- Receptores que possuem atividade de tirosina cinase (“receptores tirosina cinase”)
- Canais operados por receptores (ROCs) (Page, C. et al., 2004).

### 7.2 – Receptores ligados à proteína G

As proteínas G são componentes de transdução. Os receptores ligados à proteína G, estão localizados nas membranas celulares e são compostos por sete hélices transmembranas. No estado em repouso (sem a presença de agonistas), o receptor encontra-se ligado à proteína G que segura o receptor em sua configuração inativa. A própria proteína G é um complexo de subunidades (alfa, beta e gama) e, no estado de repouso do receptor, as três unidades encontram-se unidas, e o nucleotídeo guanina difosfato (GDP) está firmemente ligado à subunidade alfa da proteína G. A ligação do agonista ao receptor causa uma alteração conformacional à proteína G, que leva à dissociação do GDP da subunidade alfa. Isso inicia a seqüência de eventos, que constitui a transdução do receptor acoplado à proteína G.

Curiosamente, as respostas mediadas pela proteína G, podem desaparecer com o tempo, apesar da presença contínua do agonista, fenômeno este chamado de dessensibilização (Page, C. et al., 2004).

### 7.3 – Transdução ligada às proteínas G

As proteínas G, são moléculas ligadas diretamente a uma superfamília específica de receptores, ou a outros alvos moleculares das drogas. As proteínas G ativadas iniciam (ou suprimem), muitas cascatas diferentes de eventos celulares que, em última análise, afetam a função dos canais iônicos, das enzimas, do DNA e de outros componentes celulares. Os exemplos clássicos incluem a abertura dos canais de K<sup>+</sup> no músculo cardíaco após a ligação da acetil colina aos receptores muscarínicos, e o aumento da atividade da proteína cinase após a ligação da epinefrina aos β-adrenorreceptores (Page, C. et al., 2004).

- **As proteínas G consistem em três subunidades, alfa, beta e gama e agem como interruptores na sinalização celular.**

Quando um agonista ativa um receptor acoplado à proteína G, ocorre uma alteração conformacional no receptor que leva à ativação da proteína G. A ativação da proteína G, envolve a liberação de GDP e ligação de GTP à sua subunidade alfa, e a dissociação desta subunidade do complexo heterodimérico beta-gama. As subunidades alfa e beta-gama, ativam inúmeras moléculas efetoras. A subunidade alfa então hidrolisa GTP em GDP, que por sua vez inativa a subunidade alfa, permitindo sua reassociação com o complexo beta-gama, devolvendo a proteína G a seu estado desativado.

A inativação ou inibição da proteína G resulta em modulação do sistema enzimático responsável pela produção dos seguintes componentes da transdução:

- Nucleotídeos cíclicos.
- Diacilglicerol.
- Fosfatos de inositol.

Por exemplo, após o agonismo de  $\beta_1$ , uma proteína G ativada, por sua vez ativa a adenil ciclase, enzima que catalisa a formação de AMPc. A transdução procede pela ativação de AMPc através de proteínas cinase e fosforilação das enzimas, cujo tipo varia conforme o tecido.

Existem muitos tipos de proteína G na maioria das células. Os subtipos alfa, definem as principais propriedades de uma proteína G; por exemplo, os beta-adrenorreceptores interagem tipicamente com as proteínas G possuidoras de uma subunidade  $\alpha_s$ , que ativa a adenil ciclase (Page, et al., 2004).

#### 7.4 – Os Receptores Adrenérgicos

Os adrenorreceptores são membros de uma família de sete receptores transmembrana, com domínios extensos, sendo 3 extracelulares e 3 intracelulares, uma cauda amino terminal extracelular e uma cauda intracelular carboxiterminal (Figura 1A), codificados por um gene localizado no braço longo cromossomo 5 (5q31.32) (Kobilka et al. 1987).

Existem cinco tipos de adrenorreceptores, são eles  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_3$ . O tipo  $\alpha_1$  é encontrado no endotélio vascular sanguíneo, assim como o  $\alpha_2$  (Vavhgoutte, P. M., 2001). A subunidade  $\beta_1$  é identificada como cardíaca, a  $\beta_2$  na musculatura aérea lisa e a  $\beta_3$  no tecido adiposo (Frielle et al., 1988).

#### 7.5– O beta-2-adrenorreceptor (receptor beta-adrenérgico, ADRBR; beta-2-adrenorreceptor, BAR, B2AR; ADRB2R e agonista beta-2-adrenorreceptor.).

O gene B2AR é a chave para estudar asma. Ele está presente em muitas células das vias aéreas (Thakkinstian et al., 2005).

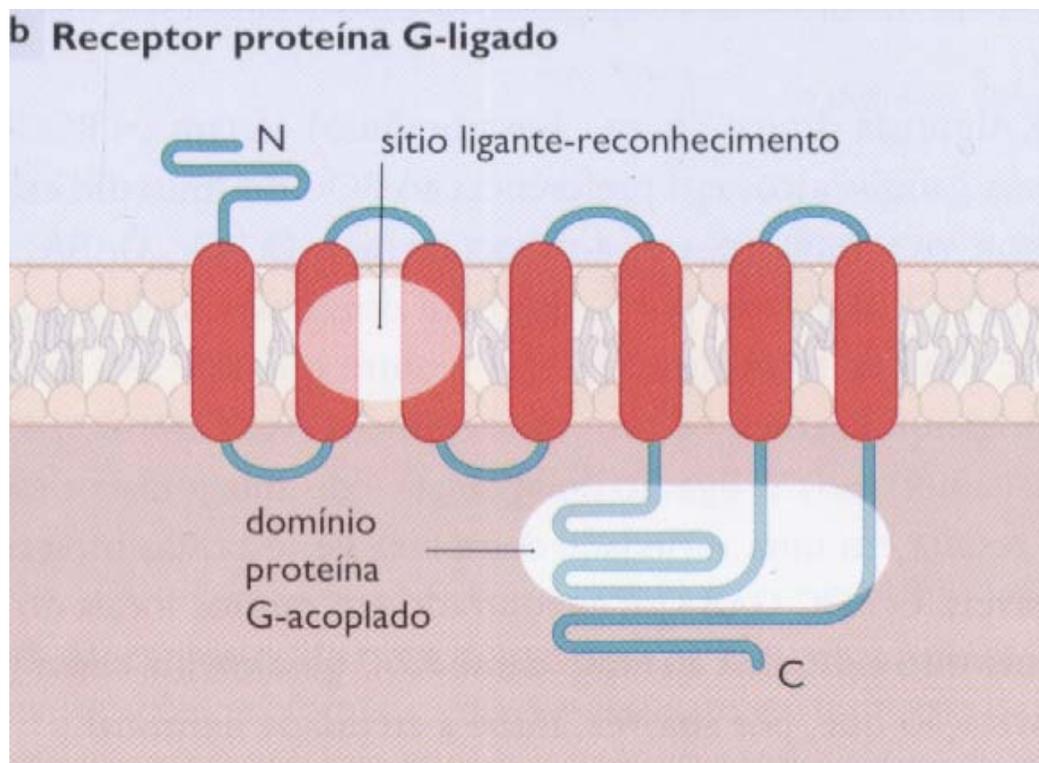
Os receptores  $\beta_2$  são largamente distribuídos no trato respiratório, particularmente no músculo liso das vias respiratórias (Johnson, 1998). Estudos autoradiográficos do pulmão humano, têm sugerido que os  $\beta_2$ -AR são distribuídos, ocorrendo não somente na musculatura aérea lisa, que é hiperreativa em asmáticos, mas também em outras células pulmonares, como células epiteliais e endoteliais, células inflamatórias, nas paredes alveolares e nos terminais nervosos pré-sinápticos (Hadcock & Malbon 1988; Nishikawa et al. 1996; Malcon, J., 1998; Thakkinstian et al., 2005).

Os  $\beta_2$ -AR são membros de uma família de sete receptores transmembrana, com domínios extensos, sendo 3 extracelulares e 3 intracelulares, uma cauda amino terminal extracelular e uma cauda intracelular carboxiterminal (Figura 1), acoplado à proteína G (Figura 2), codificados por um gene localizado no braço longo cromossomo 5 (5q31.32) (Kobilka et al. 1987). Os  $\beta_2$ -AR são compostos por 413 resíduos de aminoácidos, de aproximadamente 46.500 daltons (Da) (Henderson et al. 1990).

Depois da ativação, o efeito clínico mais relevante no músculo liso pulmonar é o relaxamento, que pode ser causado por agonistas  $\beta_2$ -AR as drogas mais efetivas utilizadas contra os sintomas agudos da asma. A exposição crônica a estes agonistas, leva a uma redução significativa no número de  $\beta_2$ -AR na superfície celular (Hadcock & Malbon 1988; Nishikawa et al. 1996). Esta regulação negativa é refletida in vivo, para uma tolerância aos efeitos dos agonistas  $\beta_2$ -AR (Barnes 1995; Bhagat et al. 1995; Cheung et al. 1992; van Veen et al. 2003; Yates et al. 1996).

Os agonistas  $\beta_2$ -AR nas células da musculatura aérea, via mecanismo proteína G acoplada à membrana, causam a ativação da adenilato ciclase, resultando num aumento da concentração intracelular do AMPc (monofosfato de adenosina cíclico) e relaxamento do tônus das vias aéreas (Liggett SB, Raymond J 1993). Os agonistas  $\beta_2$ -AR também podem ter efeitos diretos sobre canais de  $Ca^{2+}$  e  $K^+$  nos músculos lisos, e produzir relaxamento independente do AMPc (Kume et al. 1994).





**Figura 2** – Farmacologia integrada – Clive Page et al. – 2ª Edição – 2004.

### 7.6 – Ativação do $\beta$ 2-AR

Após a ativação do  $\beta$ 2-AR ocorre aumento do AMPc intracelular; o pareamento do  $\beta$ 2-AR com a adenilato ciclase é afetado pela proteína G, que consistem em unidades alfa, beta e gama (Robison et al, 1968).

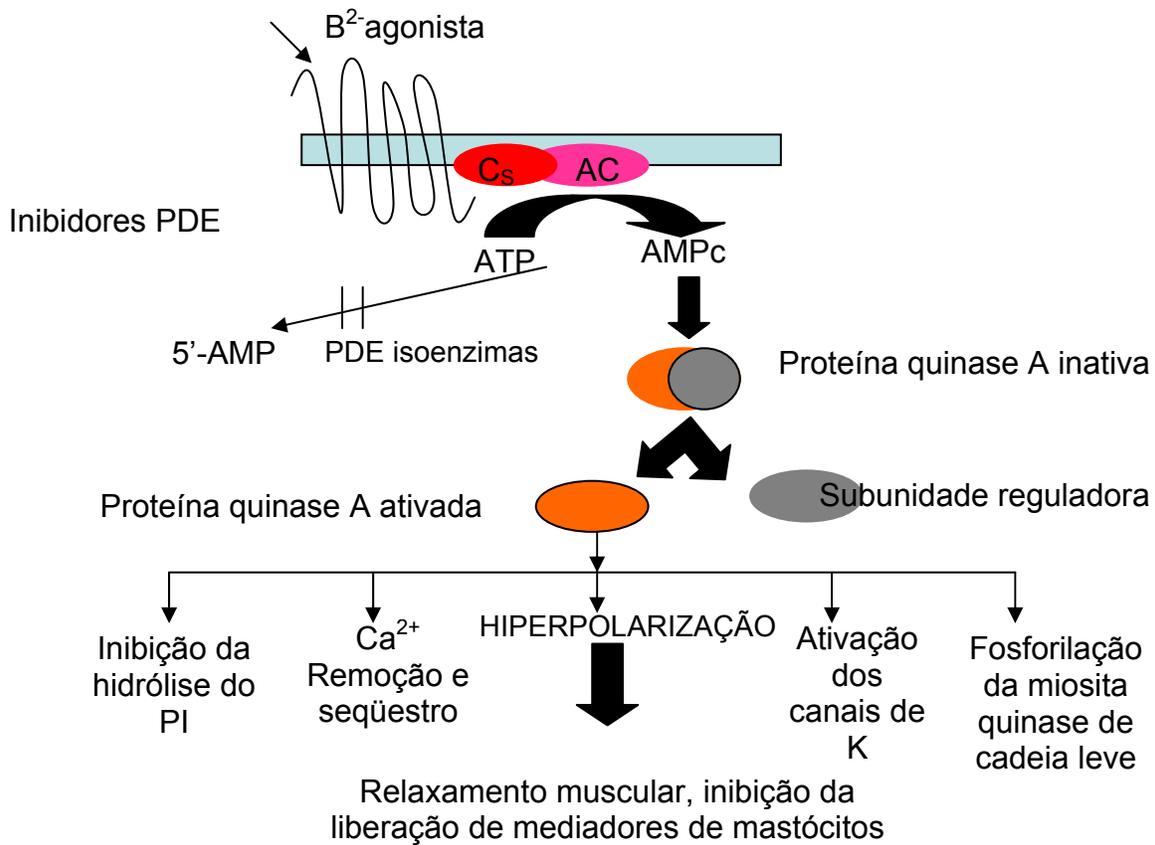
Não há evidência que  $\beta$ 2-AR existem em duas formas, ativada e inativada, e em condições de descanso; essas duas formas estão em equilíbrio, mas o estado inativado parece ser o predominante (Onaram et al, 1993). O  $\beta$ 2-AR está na forma ativada, quando está associado com a subunidade  $\alpha$  da proteína G, junto com a molécula de GTP, e esta através da subunidade  $\alpha$  do receptor, é pareada com a adenilato ciclase. A recolocação do GTP pela GDP, cataliza a conversão do ATP em AMPc pela enzima e dramaticamente reduz a afinidade da subunidade  $\alpha$  do receptor, causando dissociação; o receptor retorna a forma de baixa energia, inativado.

É provável que os beta-2-agonistas tenham seus efeitos, não através da indução da mudança conformacional do receptor, mas ligando-se e temporariamente estabilizando os receptores em seus estados ativados, mas num limite Gs-GTP, e conseqüentemente deslocando o equilíbrio (Onaram et al, 1993). Está implícita que esta é uma possibilidade espontânea e que a frequência de interconversão entre as formas ativadas e inativadas do  $\beta$ 2-AR, podem ocorrer na ausência de um agonista beta-2-adrenérgico resultando em um nível de atividade basal (Onaram et al, 1993).

#### 7.7 – Mecanismo de ação do $\beta$ 2-AR:

O  $\beta$ 2-AR presentes na superfície celular das vias aéreas superiores, mecanismo via proteína G acoplada à membrana, quando exposto aos  $\beta$ -agonistas, ativa a AMPc, que cataliza a ativação da proteína quinase A (PKA), que por sua vez é a chave regulatória da fosforilação das proteínas envolvidas no controle do tônus muscular. O AMPc também resulta na inibição da liberação do  $\text{Ca}^{2+}$ , redução na entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  pela membrana e seqüestro intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , levando a um relaxamento da musculatura lisa pulmonar (Johnson, M. & Coleman, R. A., 1995). Entretanto, foi sugerido que o relaxamento em resposta a  $\beta$ 2-agonistas, pode ser mediada através de mecanismos independentes de AMPc, envolvendo interações diretas da  $\text{Gs}\alpha$  com canais de potássio, que estão presentes nas membranas celulares das células da musculatura aérea lisa (Cook et al., 1993).

O mecanismo esta resumido no esquema 1.



**Esquema 1-** Efeito da ativação dos receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos. (Adaptado de Cruz –2005).

### 7.8 – Ações do $\beta_2$ -AR:

De acordo com Cruz (2005), os  $\beta$ -agonistas desempenham muitas ações que podem afetar as funções das vias aéreas. As principais são as seguintes:

- **Relaxamento da musculatura lisa:** os  $\beta$ -agonistas são antagonistas funcionais de grande variedade de agentes broncoconstritores, tanto *in vivo* quanto *in vitro*.

- Inibição da liberação de mediadores das células inflamatórias: basófilos, mastócitos, além de inibir o aumento de mediadores circulantes, como ocorre na asma induzida pelo exercício e/ou broncoprovocação, com uso de antígenos na asma.
- Inibição da neurotransmissão colinérgica: os  $\beta$ -agonistas inibem a neurotransmissão *in vitro* e este pode ser o mecanismo pelo qual as drogas  $\beta$ -bloqueadoras venham a causar bronco espasmo.
- Redução da permeabilidade vascular; embora os  $\beta$ -agonistas possam reduzir a permeabilidade vascular ou em animais sob ação de leucotrienos e histamina, isto não é consistente e sua aplicação clínica é inconsistente.
- Aumento do *clearance* mucociliar: este efeito, provavelmente, pode ocorrer como resultado do aumento da frequência dos batimentos ciliares, bem como o aumento da produção do citosol.

## 8 – Genética

### 8.1 – Clonagem

A clonagem completa da seqüência de nucleotídeos de cDNA do  $\beta$ 2-AR foi relatada por Kobilka et al. 1987. A seqüência deduzida de 413 resíduos de aminoácidos, codifica uma proteína que contém 7 sítios hidrofóbicos sugestivos de expansão de domínios de membrana. Enquanto a proteína mostra 87% de identidade total com o gene do receptor beta-adrenérgico previamente clonado em hamster, as regiões mais altamente conservadas são as hélices transmembrana (95% idênticas) e as voltas citoplasmáticas (93% idênticas), sugerindo que essas regiões da molécula portam importantes domínios funcionais.

## 8.2 – Polimorfismos:

### 8.2.1 – Região Codificadora:

Nove substituições de base foram encontradas e identificadas na região codificadora do gene beta-2-adrenorreceptor; 5 delas são neutras. As restantes demonstraram efeitos deletérios *in vivo*.

As duas mutações deletérias mais frequentes são: Arg -> Gly 16 (46 A->G) e Gln -> Glu27 (79C->G), que estão próximas ao sítio ligante do receptor, enquanto que as mutações Thr->Ile (491C->T) e Val->Met34 (100G->A) são raras (Fenech & Hall 2002).

A ocorrência da Gly 16 no receptor é alta; maior que a Arg 16 considerada como o alelo normal. A frequência alélica descrita desta variante está entre 67% e 72% em diferentes populações (Liggett 1997; Tan et al. 1997; Green et al. 1997; Green et al. 1995).

Estudos utilizando mutagênese em sítios específicos e transfecção, expressaram diferentes formas do beta-adrenorreceptor em fibroblastos de hamster, bem como que a variante Gly 16 do receptor, apresentava um maior efeito agonista na regulação, quando comparada ao alelo normal (Green et al. 1994).

A mutação Gln -> Glu27(79C->G) confere ao receptor uma forte resistência para dessensibilização e regulação. O alelo Glu 27 parece ser protetor contra a asma, reduzindo o risco desta em cerca de 27%. Isto faz sentido porque a variante Glu 27 é resistente à regulação negativa *in vitro*, e é possível que estes indivíduos expressem maior número de receptores B2AR no contexto inflamatório. Isto é sugerido em populações adultas e pediátricas, nas quais o modelo genético é diferente (Thakkinstian et al., 2005).

Enquanto a dessensibilização parece um mecanismo de proteção não bem conhecido, a Glu27 induz alterada regulação do receptor, que parece ocorrer devido a maior susceptibilidade do receptor a degradação da proteína, do que aos efeitos de síntese *de novo*.

O efeito protetor de Glu 27 parece ser devido ao haplótipo. Isto é provável porque não há efeitos isolados destes SNPs, mas ao contrário, reflete um haplótipo comum, que inclui este alelo (Thakkestian et al., 2005).

Haplótipos que incluem Gln 27 têm, em geral, uma resposta pobre ao agonista B2AR e baixos níveis de expressão. Presumivelmente, a boa resposta a agonistas exógenos reflete boa resposta à agonistas endógenos e, um efeito protetor contra asma (Drysdale et al., 2000).

Haplótipos com dois receptores mutantes Gly16/Glu27, mostraram que os efeitos da Gly 16 predominam sobre os da Glu27. Estes receptores submetem-se a maior regulação promovida por agonistas, que o alelo normal do receptor beta-adrenérgico.

Pode haver uma interação ou sinergismo entre os diferentes SNPs. A análise dos haplótipos levanta a possibilidade que o polimorfismo na posição 16 pode ter um efeito modificador: o efeito de proteção de Glu 27 é acentuado com Arg 16 quando comparado à Gly 16, o que mostra que o efeito de Glu 27 é dependente do polimorfismo da posição 16. Isto indica que é difícil prever o efeito do haplótipo (Thakkestian et al., 2005).

Existe um significativo desequilíbrio de ligação entre os sítios 16 e 27 (Bray et al, 2000; Drysdale et al, 2000; Taylor & Kennedy, 2001).

Em seu estudo de Hall, I. P., 1996, encontrou as seguintes frequências para Arg 16 de 35,0% e de Gly 16 de 65,0%.

A frequência de homocigotos Glu 27 descrita por Stephen B. Liggett, 1997 foi de 28,0% em saudáveis e 24,0 em asmáticos. As frequências por Liggett encontram-se resumidas na Tabela 2.

**Tabela 2-** Frequência dos comuns genótipos do gene beta-2-adrenérgico em indivíduos sadios e asmáticos (Stephen B. Ligget, 1997).

Posição do aminoácido	Genótipo	Frequência (%)	
		Sadios	Asmáticos
16	Homozigotos Arg	13,5	14,6
	Heterozigotos	29,2	32,2
	Homozigotos Gly	57,3	53,1
27	Homozigotos Gln	28,0	26,0
	Heterozigotos	44,0	50,0
	Homozigotos Glu	28,0	24,0

A frequência alélica de Arg 16 varia em populações caucasianas de 42% a 56%. A do alelo Gln 27 varia de 57% a 92% (Thakkinstian et al., 2005).

As frequências do pool de alelos de Arg 16 e Gln 27 confirmam a presença de significante variações entre grupos raciais e valores similares conhecidos, como por exemplo em ALFRED (Allele frequency database). Estes resultados suportam a possibilidade de que estes polimorfismos influenciam na susceptibilidade à asma, dada à variação da incidência da asma em diferentes grupos étnicos (Thakkinstian et al., 2005)

### 8.2.2 – Região Promotora:

Um total de 8 polimorfismos na região de - 1470pb antes do códon iniciador do gene beta-2-adrenorreceptor foram identificados (Fenech and Hall 2002).

## 9 – Associação com Asma:

Pacientes com asma noturna, representam um subconjunto de pacientes que experimentam sintomas como, obstrução da vias aéreas e sintomas enquanto dormem. Asmáticos noturnos são mais expostos a hiperreatividade brônquica que asmáticos não noturnos.

Diversos estudos têm sugerido que a função autonômica deve ser diferente na asma noturna quando comparada a não noturna. Szeffler e colaboradores (1991) descobriram neutrófilos e linfócitos com receptores beta-adrenérgicos, os quais são potenciais marcadores para ADRB2s na musculatura brônquica e células pulmonares; diminuem entre as 4:00h da manhã e 4:00h da tarde em pacientes com asma noturna. Estes marcadores não foram encontrados em pacientes com asma não noturna ou normais.

Um grande número de estudos têm investigado polimorfismos no gene ADRB2 em relação à asma. Dois polimorfismos comuns são Arg/Gly 16 e Gln/Glu 27 (Barr et al., 2001; Santillan et al., 2003)

Estudos *in vitro* indicam que o alelo Gly 16 aumenta o efeito induzido pelo agonista de regulação negativa no receptor, enquanto o alelo Glu 27 aumenta a resistência contra regulação negativa (Hall, I. P., 1999)

Existe um estudo, que mostra evidências que o genótipo Gly16/Arg16 e Gln27/Glu27 estão associados à asma; asma noturna e às formas moderadas e graves da asma à hiper-responsividade brônquica (Contopoulos-Ioannides et al., 2005).

## **10 – Importância clínica:**

A asma tem um componente hereditário, mas isto não é tão simples. Dados atuais têm demonstrado que múltiplos genes podem estar envolvidos com a patogênese da asma, e diferentes genes estão envolvidos em diferentes grupos étnicos.

As pesquisas de genes ligados ao desenvolvimento da asma, têm se focado em quatro grandes áreas: produção de anticorpos específicos para alérgenos IgE (atopia); expressão da hiper-responsividade aérea; geração de mediadores inflamatórios, como citocinas e fatores de crescimento; e determinação do nível entre Th1 e Th2 na resposta imune (GINA).

Estudos com famílias e análise de associação caso-controle, têm identificado um número de regiões cromossômicas associadas com susceptibilidade a asma. Por exemplo, uma tendência de produzir um elevado nível sérico de IgE está ligado com hiper-responsividade aérea e um gene (ou genes) que governam a hiper-responsividade aérea; está localizado próximo ao locus que regula o nível sérico de IgE no cromossomo 5q. Entretanto, a pesquisa por um gene específico (ou genes) que envolvem a susceptibilidade a atopia ou asma contínua, resulta em dados inconsistentes (GINA).

Níveis séricos elevados de IgE têm sido encontrados em pacientes que carregam os genótipos Arg 16 ou Gln 27 em homozigose. Não foi encontrada ligação entre atopia e estes genótipos (Woszczeck et al., 2005)

Em adição com os genes que predispõe a asma, há genes associados com a resposta aos tratamentos para asma. Por exemplo, variações no gene que codifica o ADRB2 têm sido ligadas a diferenças subjetivas a resposta a agonistas beta-adrenérgicos comumente utilizados no tratamento da asma. Outros genes de interesse, são genes que codificam responsividade a leucotrienos e glicocorticóides. Estes marcadores genéticos, estão ligados apenas como fatores de risco na patogênese da asma e também na determinação da resposta ao tratamento (GINA).

A contribuição dos polimorfismos nos receptores beta-adrenérgicos para a asma parece ser como modulador de gravidade e não como agente causal da doença. Embora, muitos estudos tenham demonstrado uma fraca ou nenhuma associação entre os receptores beta-adrenérgicos e a presença da asma; ou marcadores fenotípicos como baixa reposta brônquica a metacolina, atopia e frequência de chiados (Dewar et al. 1998), outros têm demonstrado o contrário.

Os agonistas B2AR são a classe de drogas mais utilizadas no tratamento da asma. Polimorfismos funcionais deste gene podem influenciar a susceptibilidade à doença e a resposta ao tratamento (Thakkintian et al., 2005).

A substituição de adenina por guanina, no aminoácido 16, segundo Reishaus et al., 1993 sugere que a habilidade do receptor para dessensibilização está marcadamente influenciada pela presença de Gly 16.

A presença de Gly 16 no receptor causa regulação negativa após a exposição a um agonista numa extensão muito maior que Arg 16 (Reishaus et al., 1993).

Um estudo clínico recente, têm sustentado a possibilidade que a forma Gly 16 no receptor está associada como marcador da forma mais grave da asma. Dados preliminares do estudo de famílias holandesas com asma, sugerem que a forma Gly 16 está associada com hiper-reatividade das vias aéreas (Holroyd et al., 1995).

A resposta ao broncodilatador é significativamente maior em homozigotos Arg 16, que em homozigotos Gly 16. Isto têm demonstrado que pares de haplótipos homozigotos Arg16/Gln 27 e heterozigotos Arg 16 Gln27/Gly 16 Glu 27 tem maior resposta a broncodilatadores, e que haplótipos pares de Gly16/Gln 27 uma menor resposta (Cho et al., 2005).

Pacientes que apresentam beta-adrenorreceptor Gly16, são seis vezes mais propensos a sofrerem sintomas noturnos (Turki et al. 1995) e aparentam ter um maior grau de reatividade das vias aéreas a histamina (Holroyd et al. 1995).

Homozigotos Gly16 asmáticos, apresentam uma resposta mais baixa ao tratamento com formoterol (Aziz et al. 1998). Do mesmo modo, homozigotos Arg16 demonstram maior e mais rápida resposta ao salbutamol que Gly16 (Lima et al. 1999). Em adição, pacientes com significativa piora noturna estão mais propensas a ter a forma Gly16 no receptor, que pacientes sem asma noturna. As frequências alélicas de Arg 16 e Gly 16 são respectivamente 35 e 65% (Hall, I. P., 1996).

O segundo polimorfismo no códon 27, que existe na forma de glutamina (Gln) ou ácido glutâmico (Glu), possui frequência alélica de 55% e 45% respectivamente (Hall, I. P., 1996). Em contraste com Gly 16, a forma Glu 27 do receptor aparenta proteger contra a regulação negativa (Grenn et al., 1994).

Utizando-se uma cultura primária de células da musculatura lisa respiratória, seguida de uma exposição prolongada a beta-2-agonistas, a forma Glu 27 sofre menos regulação negativa que a forma Gln 27 no receptor, avaliados como mudanças no número de receptores (Green et al., 1995). Em adição, uma resistência similar relativa para regulação negativa foi observada, utilizando-se beta-2-agonistas mediados por AMPc formando um ponto final na área de acoplamento droga-receptor (Green et al., 1995).

Em um grupo de 65 pacientes com asma leve a moderada, indivíduos com a forma Glu 27 do receptor, tiveram quatro vezes menos reações das vias aéreas que aqueles com Gln 27, quando avaliados usando metacolina como desafio. Heterozigotos têm uma atividade intermediária (Hall et al., 1995). Onde homozigotos Glu 27, os quais são preditos como protetores contra dessensibilização, quando combinado a homozigotos Gly 16, os efeitos de Gly 16 são dominantes (Tan et al., 1997).

Pacientes homozigotos Glu27 induzem resistência e diminuem a reatividade a metacolina (Hall et al. 1995). Gln27 tem sido associado com níveis elevados de IgE no soro em famílias asmáticas (Dewar et al. 1997), e com um aumento da prevalência de asma em crianças (Hopes et al.1998).

O genótipo Gly16/Gln27 tem maior prevalência em asmáticos moderados. Também está relacionada à alta prevalência de hiper-responsividade brônquica (D'Amato et al. 1998).

No Brasil, não foi encontrado nenhum estudo sobre polimorfismos no gene dos receptores beta-2-adrenérgicos relacionado à asma.

Conhecer o genótipo do receptor beta-adrenérgico do paciente asmático, pode ser útil, para prever a resposta à terapia com broncodilatador, e também para tomar medidas adicionais ao tratamento (Fenech & Hall, 2002).



## ***OBJETIVOS***

- 1) Determinar o genótipo de pacientes asmáticos e voluntários sadios quanto aos polimorfismos Gln27, Glu27, Arg16 e Gly16.
- 2) Verificar a existência de correlação entre o genótipo estudado e a gravidade da asma.



***ASPECTOS ÉTICOS,  
CASUÍSTICA E  
MÉTODOS***

## **Aspectos éticos**

O trabalho foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da faculdade de ciências médicas da UNICAMP, conforme parecer CAAE: 0147.0.146.000-05 (Anexo I). Os pacientes preencheram o termo de consentimento livre e esclarecido.

## **Casuística e Métodos**

### **1 - Casuística**

Foram analisados 87 escolares e adolescentes, de 7 a 16 anos de idade (Média = 10,38 anos, desvio padrão = 2,93 anos), pacientes do Ambulatório de Imunologia, Alergia e Pneumologia do Departamento de Pediatria da FCM - UNICAMP. Todos os pacientes incluídos, tinham asma atópica definida conforme os critérios GINA: (história clínica, testes cutâneos de hipersensibilidade imediata, níveis séricos de IgE aumentados).

O grupo controle foi composto de 141 indivíduos adultos, doadores de sangue do Hemocentro da UNICAMP, cujo pré-requisito para doação é não ter asma atópica.

### **2 - Métodos**

Foi realizada a extração de DNA do sangue periférico através do método de Cloreto de Lítio (protocolo do Laboratório de Genética Molecular – DGM – FCM – UNICAMP) que em seguida foram processadas através do método de PCR-alelo específico (ARMS).

#### **ARMS PCR:**

Este método consiste em uma PCR alelo específico. Nela é utilizado um primer comum a todas as reações e um primer alelo específico, isto é, onde há a mudança de

apenas uma base nitrogenada. Neste método, também é utilizado um par de primers que anelam em uma outra região como controle interno de reação.

Procedemos as PCRs de acordo com o método descrito por Littlejohn et al. 2002, com algumas modificações.

Foram realizadas quatro reações (ARMS1a, ARMS2a, ARMS1b e ARMS2b), cada uma contendo um primer comum e um alelo específico (Tabela 1). As quatro reações utilizarão as mesmas condições. Cada reação consiste num total de 10µL contendo 1x4 tampão, 200µM dNTPs, 5,0mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4U Taq Polymerase e 1,0µL (aproximadamente 25-50ng) de DNA genômico. O ciclo consiste de 5 min a 94°C seguidos por 35 ciclos de 94°C por 1 min, 60°C (46 A ou G) ou 67°C (70 C ou G) e 72°C por 1 min e 72°C por 17 min para extensão final (esquemas 2 e 3). As amostras foram aplicadas em gel de agarose a 1,5% e submetidas à eletroforese e coradas com brometo de etídio para visualização dos resultados (figura3).

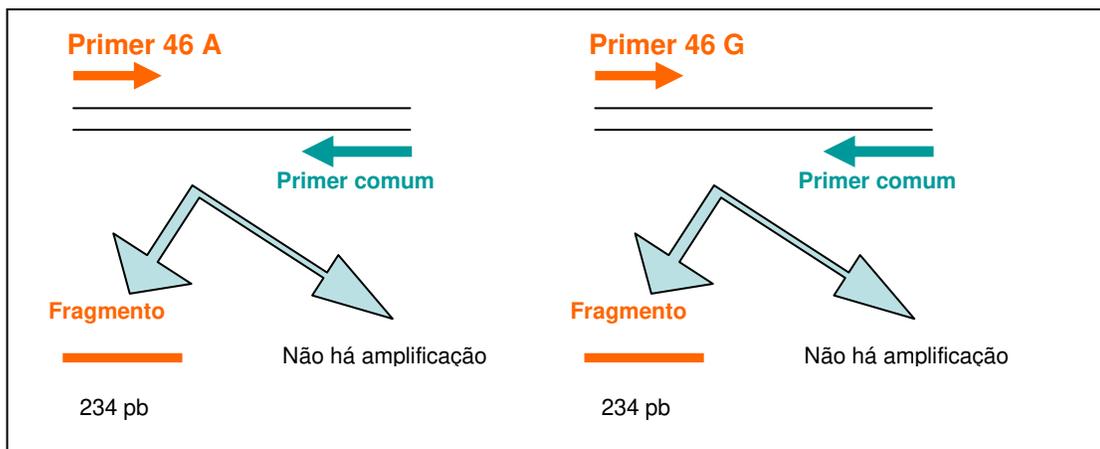
**Tabela 3-** Relação de primers que serão utilizados nos testes de ARMS.

Primer	Seqüência
<b>BADRACOM1</b>	5'-AGG CCC ATG ACC AGA TCA GCA CAG GCC AG-3'
<b>BAD +46A</b>	5'- ACG GCA GCG CCT TCT TGC TGG CAC CCA AAA-3'
<b>BAD +46G</b>	5'-ACG GCA GCG CCT TCT TGC TGG CAC CCA AAG-3'
<b>BAD +79C</b>	5'-GCC ATG CGC CGG ACC ACG ACG TCA CGC ATC-3'
<b>BAD +79G2</b>	5'-GCC ATG CGC CGG ACC ACG ACG TCA CGC AAG-3'

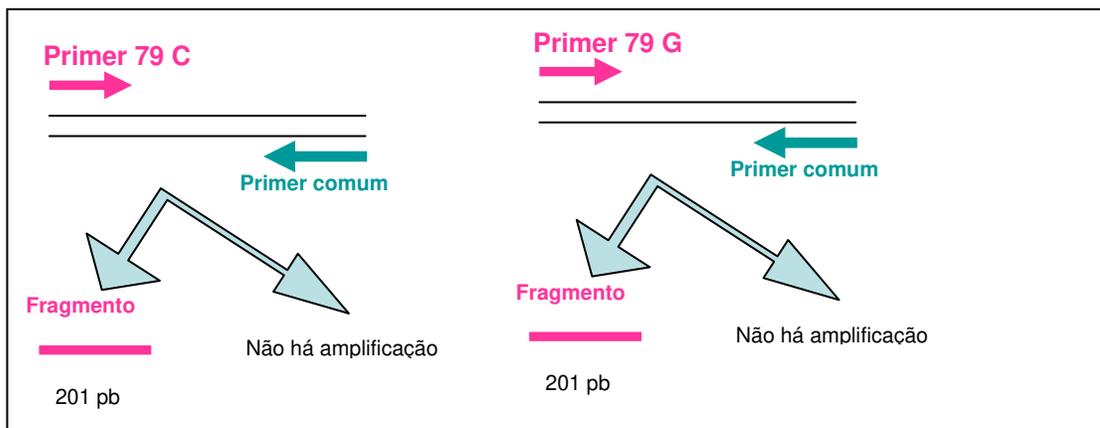
Siglas:

- BADRACOM 1: primer comum a todas as reações;
- BAD + 46 A: específico para o alelo arginina no códon 16;
- BAD + 46 G: específico para o alelo glicina no códon 16;
- BAD + 79 C: específico para o alelo glutamina no códon 27;
- BAD + 79 G: específico para o alelo ácido glutâmico no códon 27.

**Esquema 2 - anelamento de primer códon 16**

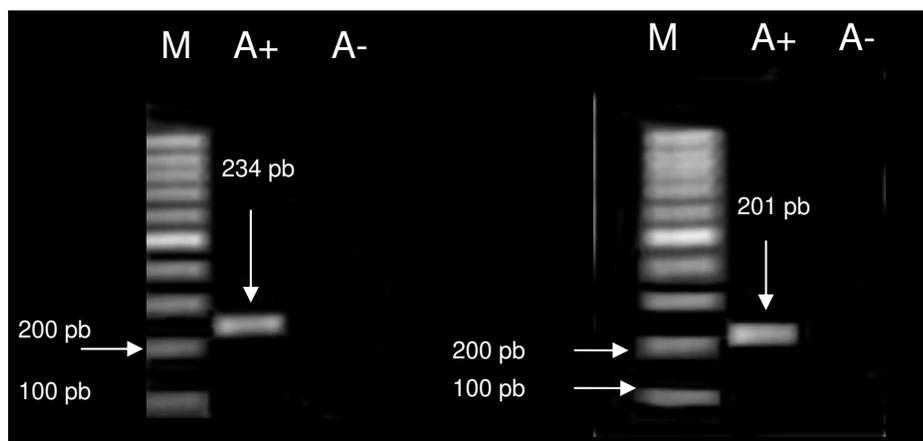


**Esquema 3 - anelamento de primer códon 27**



Reação 16 (Arg ou Gly)

Reação 27 (Gln ou Glu)



**Figura 3** – Fotos de PCRs

Legenda:

M: marcador de 100 pares de base;

A+: amostra positiva para o polimorfismo estudado;

A-: amostra negativa para o polimorfismo estudado.

### 3 – Análise Estatística

Foram utilizados os Teste de qui-quadrado (Epi Info 2000 program) utilizados para cálculo de proporções. P significativo menor ou igual à 0,05.



## ***RESULTADOS***

## 1 – Códon 16

Amostra de pacientes quanto ao códon 16 não está em equilíbrio segundo Hardy-Weinberg ( $\chi^2_{(2)} = 12,66$  e  $P=0,002$ ), entretanto a amostra controle está ( $\chi^2_{(2)}=3,15$  e  $P = 0,20$ ).

A frequência alélica no códon 16 encontrada foi de Arg 42,5% e Gly 16 57,5% na população de asmáticos estudada (Tabela 4). No grupo controle a frequência alélica encontrada foi 32,6% Arg 16 e 67,4% Gly 16 (Tabela 4). A diferença na frequência dos alelos no códon 16 entre os pacientes e o grupo controle foi significativa ( $\chi^2 = 4,14$  e  $P = 0,04$ ).

**Tabela 4-** Frequência dos alelos no códon 16 entre pacientes e controles

Alelos	Alelos de Pacientes	Alelos de Controles
Arg 16	74 (42,5%)	92 (32,6%)
Gly 16	100 (57,5%)	190 (67,4%)

Diferença estatisticamente significativa ( $\chi^2 = 4,14$   $P= 0,04$ )

Entre os 87 pacientes analisados para polimorfismos no códon 16 do gene ADRB2, 31,0% eram homozigotos para arginina, 46,0% homozigotos para glicina e 23,0% heterozigotos (Tabela 5)

Entre os 141 controles analisados no códon 16, 7,0% eram homozigotos para arginina, 41,0% homozigotos para glicina e 52,0% heterozigotos.

**Tabela 5-**Análise do genótipo no códon 16 de asmáticos e grupo controle

<b>Polimorfismo</b>	<b>Pacientes</b>	<b>Controle</b>
<b>Homozigotos Arg 16</b>	27 (31,0%)	9 (7,0%)
<b>Homozigotos Gly 16</b>	40 (46,0%)	58 (41,0%)
<b>Heterozigotos</b>	20 (23,0%)	74 (52,0%)
<b>Total</b>	87 (100%)	141 (100%)

Diferença estatisticamente significativa - Amostra x Grupo Controle:  $\chi^2_{(2)}=32.35$  e  $P=0,00000009$

Na comparação entre os diferentes genótipos no códon 16 dos asmáticos e do grupo controle foi observada diferença significativa. (Tabela 6,  $\chi^2_{(2)} = 32.35$  e  $P=0,00000009$ ).

Os 39 pacientes analisados para asma grave, 26,0% foram homozigotos para arginina, 51,0% homozigotos para glicina e 23,0% heterozigotos. Entre os 22 pacientes analisados para asma moderada no códon 16, 30,0% são homozigotos para arginina, 36,0% são homozigotos para glicina e 28,0% são heterozigotos. Dentre os 26 pacientes analisados no códon 16 para asma leve, 30,0% são homozigotos para arginina, 42,0% homozigotos para glicina e 28,0% são heterozigotos (Tabela 6).

Comparando-se os pacientes com asma grave e grupo controle, foi encontrado uma diferença significativa ( $\chi^2_{(2)} = 17,19$  e  $P = 0,00018$ ), assim como quando comparados os pacientes com moderada ( $\chi^2_{(2)} = 18,97$  e  $P = 0,00007$ ), também sendo encontrada diferença significativa quando comparados os pacientes leve ( $\chi^2_{(2)} = 15,79$  e  $P = 0,003$ ) (Tabela 6).

Analisando o códon 16, entre os pacientes de asma grave e moderada não foi encontrada diferença significativa ( $\chi^2_{(2)} = 1,33$  e  $P = 0,51$ ), assim como também não foi encontrada entre os pacientes de asma grave e leve ( $\chi^2_{(2)} = 0,51$  e  $P = 0,77$ ) e asma moderada e leve ( $\chi^2_{(2)} = 0,22$  e  $P = 0,89$ ) (Tabela 6).

**Tabela 6-**Análise do genótipo de pacientes com asma grave, moderada e leve no códon 16.

<b>Polimorfismo</b>	<b>Asma grave</b>	<b>Asma moderada</b>	<b>Asma leve</b>	<b>Controles</b>
<b>Homozigotos Arg 16</b>	10 (26,0%)	8 (36,0%)	8(30,0%)	9 (7,0%)
<b>Homozigotos Gly 16</b>	20 (51,0%)	8 (36,0%)	11 (42,0%)	58 (41,0%)
<b>Heterozigotos</b>	9 (23,0%)	6 (28,0%)	7 (28,0%)	74 (52,0%)
<b>Total</b>	39 (100%)	22 (100%)	26(100%)	141 (100%)

Com relação à comparação com o grupo controle temos asma grave  $\chi^2_{(2)} = 17.19$ ,  $P=0.00018$ , asma moderada  $\chi^2_{(2)}=18,97$ ,  $P=0.00007$  e asma leve  $\chi^2_{(2)}= 15.79$ ,  $P=0.003$ , todas diferenças estatisticamente significativas.

Já comparando entre os grupos de asma temos:

Asma Grave x Asma Moderada:  $\chi^2_{(2)} = 1.33$ ,  $P=0.51$ ; Asma Grave x Asma Leve:  $\chi^2_{(2)}=0.51$ ,  $P=0.77$  e Asma Moderada x Asma Leve:  $\chi^2_{(2)}=0.22$ ,  $P=0.89$ , onde não nenhuma diferença estatisticamente significativa.

## **2- Códon 27**

No códon 27, ambas as amostras estão em desequilíbrio segundo Hardy-Weinberg (pacientes:  $\chi^2_{(2)}=11,58$  e  $P = 0,003$ ; controles:  $\chi^2_{(2)}=12,15$  e  $P = 0,002$ ).

No códon 27 as frequências alélicas encontradas em asmáticos foram 62,0% Gln 27 e 38,0% Glu. No grupo controle no códon 27 foram encontradas as frequências de 60,0% Gln 27 e 40,0% Glu 27 (Tabela 7). A diferença encontrada não foi significativa ( $\chi^2 = 0,13$  e  $P = 0,72$ ).

Analisando-se os mesmos 87 pacientes para o códon 27, foi verificado que 51,0% são homozigotos para glutamina, 26,0% são homozigotos para ácido glutâmico e 23,0% são heterozigotos.

**Tabela 7-** Frequência dos alelos no códon 27 entre pacientes e controles

<b>Alelos</b>	<b>Alelos de Pacientes</b>	<b>Alelos de Controles</b>
<b>Gln 27</b>	108 (62,0%)	169 (60,0%)
<b>Glu 27</b>	66 (38,0%)	113 (40,0%)

Não há diferença estatisticamente significativa ( $\chi^2 = 0,13$  P= 0,72).

No grupo controle de 141 voluntários foi verificado no códon 27 que 26,0% são homozigotos para glutamina, 6,0% homozigotos para ácido glutâmico e 68,0% são heterozigotos. Verificou-se diferença significativa entre os genótipos dos pacientes e voluntários ( $\chi^2_{(2)} = 45,40$  e P = 0,000000) (Tabela 8).

**Tabela 8-** Análise do genótipo no códon 27 de asmáticos e grupo controle

<b>Polimorfismo</b>	<b>Pacientes</b>	<b>Controles</b>
<b>Homozigotos Gln 27</b>	44 (51,0%)	37 (26,0%)
<b>Homozigotos Glu 27</b>	23 (26,0%)	9 (6,0%)
<b>Heterozigotos</b>	20 (23,0%)	95 (68,0%)
<b>Total</b>	87 (100%)	141(100%)

Diferença estatisticamente significativa - Amostra x Grupo Controle:  $\chi^2_{(2)}=45,40$  e P=0,000000

Entre os 37 pacientes analisados para os polimorfismos no códon 27 do gene ADRB2, para asma grave, 72,0% são homozigotos glutamina, 20,0% homozigotos ácido glutâmico e 8,0% heterozigotos. Nos 22 pacientes analisados para asma moderada foram encontrados 41,0% homozigotos para glutamina, 36,0% homozigotos para ácido glutâmico e 23,0% são heterozigotos. Na análise dos pacientes de asma leve, dentre os 28 asmáticos, 32,0% são homozigotos para glutamina, 36,0% homozigotos para ácido glutâmico e 32,0% heterozigotos.

Comparando-se os pacientes com asma grave e grupo controle foi encontrado uma diferença significativa ( $\chi^2_{(2)} = 41,88$  e  $P = 0,00000$ ), assim como quando comparados os pacientes com moderada ( $\chi^2_{(2)} = 24,04$  e  $P = 0,0000006$ ), também sendo encontrada diferença significativa quando comparados os pacientes leve ( $\chi^2_{(2)} = 22,89$  e  $P = 0,00001$ ) (Tabela 9).

Comparando-se entre os grupos de asma para o códon 27, não foram encontradas diferenças significativas, comparando-se pacientes de asma grave e moderada ( $\chi^2_{(2)} = 5,29$  e  $P = 0,07$ ), e asma moderada e leve ( $\chi^2_{(2)} = 0,65$  e  $P = 0,72$ ) (Tabela 9). Foi encontrada diferença significativa quando comparamos os pacientes asma grave e leve ( $\chi^2_{(2)} = 10,43$  e  $P = 0,0054$ ).

**Tabela 9-** Análise dos genótipos dos pacientes com asma grave, moderada e leve no códon 27.

<b>Polimorfismo</b>	<b>Asma grave</b>	<b>Asma moderada</b>	<b>Asma leve</b>	<b>Controles</b>
<b>Homozigotos Gln 27</b>	26 (72%)	9 (41%)	9 (32%)	37 (26,0%)
<b>Homozigotos Glu 27</b>	8 (20%)	8 (36%)	10 (36%)	9 (6,0%)
<b>Heterozigotos</b>	3 (8%)	5 (23%)	9 (32%)	95 (68,0%)
<b>Total</b>	37 (100%)	22 (100%)	28(100%)	141(100%)

Com relação à comparação com o grupo controle temos asma grave  $\chi^2_{(2)} = 41.88$ ,  $P=0.00000$ , asma moderada  $\chi^2_{(2)}=24.04$ ,  $P=0.0000006$  e asma leve  $\chi^2_{(2)}= 22.89$ ,  $P=0.00001$ , todas diferenças estatisticamente significativas.

Já comparando entre os grupos de asma temos:

Asma Grave x Asma Moderada:  $\chi^2_{(2)} = 5.29$ ,  $P=0.07$ , não houve diferença estatisticamente significativa, assim como Asma Moderada x Asma Leve:  $\chi^2_{(2)}=0.65$  ,  $P=0.72$ , e houve não há diferença significativa estatisticamente quando comparamos o pacientes de Asma Grave x Asma Leve:  $\chi^2_{(2)}=10.43$ ,  $P=0.0054$ .

### **3 – Análise dos diferentes genótipos entre pacientes e controles sadios**

Na verificação dos genótipos do grupo controle e do total de pacientes temos uma diferença significativa ( $\chi^2_{(8)} = 61,99$  e  $P = 0,00000$ ).

Com relação ao grupo controle e pacientes de asma grave temos diferença significativa ( $\chi^2_{(8)} = 75,33$  e  $P = 0,000000$ ), assim como comparados ao grupo de asma moderada ( $\chi^2_{(8)} = 34,63$  e  $P = 0,00003$ ) e leve ( $\chi^2_{(8)} = 31,52$  e  $P = 0,00011$ ).

Na comparação entre os grupos de asmáticos só tivemos diferença significativa entre o grupo de asma grave e leve ( $\chi^2_{(8)} = 17,88$  e  $P = 0,02$ ). Na comparação de asma grave e moderada não tivemos diferença significativa ( $\chi^2_{(8)} = 13,43$  e  $P = 0,09$ ) e moderada e leve ( $\chi^2_{(8)} = 1,57$  e  $P = 0,99$ ) (Tabela 10).

**Tabela 10-** Frequência dos diferentes genótipos entre os pacientes de asma grave, moderada e leve.

<b>Genótipo</b>	<b>Total entre todos os pacientes</b>	<b>Asma Grave</b>	<b>Asma Moderada</b>	<b>Asma Leve</b>	<b>Controles</b>
<b>Gly16 –Gln27</b>	19 (22,0%)	13 (35,0%)	5 (23,0%)	3 (11,0%)	20 (14,0%)
<b>Arg16 –Glu27</b>	5 (6,0%)	2 (5,0%)	2 (9,0%)	2 (7,0%)	0
<b>Arg16 –Gln27</b>	15 (17,0%)	12 (32,0%)	3 (13,0%)	4 (18,0%)	5 (3,0%)
<b>Gly16 –Glu27</b>	9 (10,0%)	4 (11,0%)	2 (9,0%)	3 (11,0%)	9 (6,0%)
<b>Het16 –Gln27</b>	4 (5,0%)	0	2 (9,0%)	3 (11,0%)	12 (9,0%)
<b>Het16 –Glu27</b>	4 (5,0%)	3 (8,0%)	1 (5,0%)	1 (4,0%)	0
<b>Het16 – Het27</b>	5 (6,0%)	0	2 (9,0%)	3 (11,0%)	61 (43,0%)
<b>Arg16 –Het27</b>	4 (5,0%)	0	2 (9,0%)	2 (7,0%)	4 (3,0%)
<b>Gly16 – Het27</b>	9 (10,0%)	3 (8,0%)	2 (9,0%)	4 (18,0%)	30 (21,0%)

Comparando total de pacientes com o grupo controle temos  $\chi^2_{(8)}=61.99$ ,  $P=0.00000$  Com relação à comparação com o grupo controle temos asma grave  $\chi^2_{(8)}= 75.33$ ,  $P=0.000000$ , asma moderada  $\chi^2_{(8)}=34.63$ ,  $P=0.00003$  e asma leve  $\chi^2_{(8)}= 31.52$ ,  $P=0.00011$ , todas estatisticamente significativas.

Já comparando entre os grupos de asma temos:

Asma Grave x Asma Moderada:  $\chi^2_{(8)} = 13.43$ ,  $P=0.09$ ; e Asma Moderada x Asma Leve:  $\chi^2_{(8)}=1.57$ ,  $P=0.99$ , sem diferença estatisticamente significativa e Asma Grave x Asma Leve:  $\chi^2_{(8)}=17.88$ ,  $P=0.02$  significativa estatisticamente.



## *DISCUSSÃO*

## 1 – Códon 16

Analisando-se o códon 16 para os aminoácidos Arg e Gly, foi encontrada diferença significativa quando comparados os pacientes ao grupo controle.

A presença do alelo Arg 16 em asmáticos em homozigose, possui uma frequência de 31,0%, em contraste com 7,0% na população sadia, o que corrobora com as frequências alélicas que sugerem que a presença de Arg 16 no receptor está envolvida na etiologia da asma.

Já o alelo Gly 16, aparece nas duas populações estudadas com frequência semelhante, sendo 46,0% em asmáticos e 41,0% em indivíduos sadios, o que leva a concluir que este alelo não está relacionado à etiologia da asma.

Os indivíduos heterozigotos no códon 16, possuem uma diferença grande na sua frequência, comparando-se asmáticos e voluntários sadios, cujas frequências são, respectivamente, 23,0% e 52,0%. A análise destes dois grupos mostrou uma diferença estatisticamente significativa.

A ocorrência de Arg 16 no receptor é menor entre os pacientes asmáticos (31,0%) que a de Gly 16 (46,0%), mas mesmo assim a frequência encontrada de Gly 16 é menor que em outros estudos (Liggett 1997; Tan et al. 1997; Green et al. 1997; Green et al. 1995; Thakkinstian et al., 2005), onde a ocorrência da Gly 16 no receptor é alta; maior que a Arg 16 considerada como o alelo normal. A frequência alélica descrita desta variante está entre 67% e 72% em diferentes populações, o que em nosso estudo difere, pois as frequências alélicas encontradas são Arg 16 38,0% e Gly 16 62,0%, sendo a presença do alelo considerado normal maior em nossos pacientes.

Neste estudo foi encontrada a prevalência entre os 87 pacientes asmáticos de Arg 16, como 31,0% e em 141 indivíduos sadios de 7,0%, e de heterozigotos de 23,0% na população de asmáticos e de 52,0% em indivíduos sadios, o que contrasta com estudo de Stephen B. Liggett, 1997, onde foram analisados 123 pacientes; a prevalência dos polimorfismos encontrados foram homozigoto Arg 16 de 13,5% em indivíduos normais e 14,6% em indivíduos asmáticos.

Ainda no estudo de Stephen B. Ligget, 1997, a frequência de heterozigotos na população sadia foi de 29,2% e 32,2% em indivíduos asmáticos.

A frequência de homozigotos Gly 16 foi encontrada em 46,0% em asmáticos e de 41,0% em indivíduos sadios, enquanto a de homozigotos Gly 16 foi de 57,3 em indivíduos sadios e de 53,1 em asmáticos no estudo de Stephen B. Ligget, 1997.

O genótipo Gly 16, é o mais prevalente em pacientes de asma grave (46,0%), assim como no estudo de Holroyd et al., 1995, que sugere que esta forma está associada com a hiper-responsividade das vias aéreas. O mesmo autor ainda considera a possibilidade de estes pacientes serem mais reativos a histamina.

Segundo Aziz et al., 1998, pacientes homozigotos Gly16 apresentam uma resposta mais baixa ao formoterol, o que leva a crer que pacientes com asma moderada de nosso estudo, também não tenham uma boa resposta ao formoterol, pois 36,0% deles são homozigotos Gly 16. Ainda as frequências encontradas para Arg 16, de 31,0% em asmáticos e de Gly 16 46,0% diferem das encontradas no estudo de Hall, I. P., 1996, que encontrou as seguintes frequências para Arg 16 de 35,0% e de Gly 16 de 65,0%.

## **2 – Códon 27**

A análise da frequência alélica no códon 27, comparando-se pacientes asmáticos e grupo controle, não foi estatisticamente significativa.

Analisando-se o genótipo Gln 27 em homozigose em indivíduos asmáticos e sadios, foram encontradas as seguintes frequências, respectivamente, 51,0% e 26,0%.

Os homozigotos Glu 27 aparecem em 26,0% dos pacientes e em 6,0% dos sadios, enquanto que os indivíduos heterozigotos no códon 27 apresentam uma grande variação em suas frequências, sendo de 23,0% em asmáticos e de 68,0% em voluntários sadios. Analisando-se estes dados é provável que o polimorfismo Gln no códon 27, quando em homozigose, esteja associado à gravidade da asma.

Para o aminoácido na posição 27, foram encontradas frequências de homozigotos Gln de 51,0% em asmáticos e de 26,0% entre os indivíduos controles, enquanto o estudo de Stephen B. Ligget, 1997 encontrou a frequência de homozigotos Gln 27 em indivíduos sadios de 28,0% e em asmáticos de 26,0%.

Ainda esta pesquisa contrasta na frequência de heterozigotos que foi encontrada como 68,0% em sadios e 23,0% em asmáticos com a frequência de heterozigotos na posição 27 encontrada por Stephen B. Ligget, 1997 foi de 44,0% em indivíduos sadios e de 50,0% em asmáticos.

O estudo realizado também contrasta com as frequências de Glu no códon 27, a frequência de homozigotos em voluntários sadios é de 6,0% e de 26,0% em asmáticos, e a frequência de homozigotos Glu 27 descrita por Stephen B. Ligget, 1997 foi de 28,0% em sadios e 24,0 em asmáticos.

As proporções de Gln 27 e Glu 27, encontradas, foram de respectivamente 51,0% e 26,0% em pacientes asmáticos, contra 26,0% de Gln 27 em voluntários sadios e 6,0% de Glu 27. As frequências encontradas diferem do estudo de Hall, I. P., 1996, que encontrou 55,0% de Gln 27 e 45,0% de Glu 27.

Segundo nosso estudo a presença de Gln 27, considerado o alelo normal, tem maior prevalência em pacientes com asma grave (72,0%) que nos voluntários sadios estudados (26,0%), isto indica que este polimorfismo esta associado à gravidade da asma. Este achado contradiz com o estudo de Hall et al., 1995, no qual pacientes com asma moderada e leve com Glu 27 tiveram quatro vezes menos reações das vias aéreas que aqueles com Gln 27 quando avaliados usando metacolina como desafio.

### **3 – Análise dos diferentes genótipos entre pacientes e controles sadios:**

O genótipo mais prevalente na população asmática estudada é Gly 16 – Gln 27 (22,0%). Entre os pacientes de asma grave o genótipo de maior prevalência é Gly 16 – Gln 27 (35,0%), assim como entre os pacientes de asma moderada (23,0%), e com menor

prevalência no grupo controle (14,0%) e finalmente entre os pacientes de asma leve os genótipos mais prevalentes são Arg 16 – Gln27 (18,0%) e Gly 16 – Het 27 (18,0%), sendo no grupo controle de 3,0% e 21,0% respectivamente. No grupo controle o genótipo prevalente é Het 16 – Het 27.

Só existe diferença significativa entre os genótipos quando são comparados pacientes e grupo controle, com exceção da diferença significativa entre pacientes de asma grave e leve ( $\chi^2_{(8)} = 17,88$  e  $P = 0,02$ ).

O genótipo Gly 16 – Gln 27 é prevalente em pacientes com asma moderada (23,0%), o que concorda com o estudo de D'Amato et al., 1998.



## *CONCLUSÃO*

- O genótipo homocigoto Arg 16 parece estar associado com a asma.
- Homocigotos no códon 27 Gln são mais frequentes entre pacientes com asma grave.
- Não encontramos em nossa amostra uma correlação entre a gravidade da asma e o genótipo do polimorfismo avaliado para o códon 16.



***REFERÊNCIAS  
BIBLIOGRÁFICAS***

**ALFRED: The ALlele FREquency Database.** New Heaven, CT: department of Genetics, Yale University School of medicine, 2005 (<http://alfred.med.yale.edu/alfred>).

Aziz I.; Hall I. P.; McFarlane L. C.; Lipworth B. J.: **Beta-2-adrenoceptor regulation and bronchodilator sensitivity after regular treatment of formoterol in subjects with stable asthma.** *J. Allergy Clin. Immunol.* 1998, 101: 337-341.

Barne P. J.(1995): **beta-adrenergic receptors and their regulation.** *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 152: 838-860.

Barr, R. G.; Cooper, D. M.; Speizer, F. E.; et al. – **Beta-2-adrenoceptor polymorphism and body mass index associated with adult-onset asthma in sedentary but not active woman.** – *Chest*, 2001; 120:1474-9.

Bhagat R.; Kalra S.; Swystun V. A. Cockcroft D. W.: **Rapid onset of tolerance to the bronchoprotective effect of salmeterol.** *Chest* 1995, 108: 1235-1239.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria nacional de Ações Básicas. **Estatísticas de Saúde e Mortalidade.** Brasília: Ministério da Saúde; 2005.

Bray, M. S.; Kruskal, J.; Li, L. – **Positional genomic analyses identifies the B2-adrenergic receptor genes a susceptibility locus for human hypertension** – *Circulation* – 2000; 101:2877-2882.

Cheung D.; Timmers M.C.; Zwinderman A. H.; Bel E. H. ; Dijkman J. H. Sterk P. J.: **Long terms effect of a long-actin beta-2-adrenoceptor agonist, salmeterol, on airway hiperresponsiveness in patients with mild asthma.** *N. Engl. J. Med.* 1992; 327: 1198-1203.

Cho, S. H., Oh, S. I., Bahn, J. W., Choi, J. Y., Chang, Y. S., kim, Y. K., Min, K. U., kim, Y. Y. – **Association between bronchodilating response to short-acting beta-agonist and non-synonymous single-nucleotide polymorphism of beta-adrenoceptor gene** – *Clin. Exp. Allergy* – 2005 Sep; 35(9):1162-7.

Contapoulos-Ioannidis, D.G.; Manoli, E. N; Ionnidis, J. P. A. – **Meta-analyses of association of  $\beta_2$ -adrenergic receptor polymorphisms with asthma phenotypes** – Ioannina, Grécia; Washington D. C., Boston, Mass, 2005.

Cook, S. J.; R. C. Small; J. L. Berry; P. Chiu; S. J. Downing and R. W. Foster –  **$\beta$ -Adrenoceptor subtypes and plasmalemmal  $K^+$ -channels in trachealis muscle** – *Br. J. Pharmacol.* 109: 1149-1156, 1993.

Cruz, A. – **Asma: um grande desafio** – Editora Atheneu – 2005.

D'Amato M.; Vitiani L. R.; Petrelli G., et al.: **Association of persistent bronchial hiperresponsiveness with beta-2-adrenoceptor (ADRB2) haplotypes. A population study.** *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 1998, 158: 1968-1973.

Dewar J. C.; Wheatley A. P.; Venn A.; Morrison J. F.; Briton J.; Hall I. P.: **Beta-2-adrenoceptor polymorphisms are in linkage disequilibrium, but are not associated with asthma in adult population.** *Clin. Exp. Allergy* 1998; 28: 442-448.

Dewar J. C.; Wilkinson J.; Wheatley A., et al.: **The glutamine 27 beta-2-adrenoceptor polymorphism is associated with elevated IgE levels in asthmatic families.** *J. Allergy Clin. Immunol.* 1997, 100: 261-265.

Drysdale, C. M.; McGraw, D. W.; Stack, C. B.; Stephens, J. C.; Judson, R. S.; Nandabalan, K.; Arnold, K.; Ruano, G.; Liggett, S. B. : **Complex promoter and coding region beta-2-adrenergic receptor haplotypes alter receptor expression and predict in vivo responsiveness.** *Proc. Nat. Acad. Sci.* 2000; 97: 10483-10488.

Fenech A.; Hall I. P.: **Pharmacogenetics of asthma.** *J. Clin. Pharmacol.* 53, 3-15, 2002.

Frielle, T.; K.W. Daniel; M. G. Caron and R. J. Lefkowitz: **Structural Basis of  $\beta$ -adrenergic receptor subtype specificity studies with chimeric  $\beta_2/\beta_2$  – adrenergic receptors.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:9494-9498, 1988.

**Global Initiative for Asthma (GINA)** – [homepage on the internet]. [Update Sep 2006; cited 2006 Sep 27]. Bethesda: NHLBI/WHO; 2006. Available from: [www.ginasthma.com](http://www.ginasthma.com)

Green S. A.; Turki J.; Bejarano P.; Hall I. P.; Liggett S. B.: **Influence of beta-2-adrenergic receptor genotypes and signal transduction in human smooth muscle cells.** *Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.* 1995; 13: 25-33.

Green S. A.; Turki J.; Hall I. P.; Liggett S. B.: **Implications of genetic variability of human beta-2-adrenergic receptor structure.** *Pulm. Pharmacol.* 1995; 8: 1-10.

Green S. A.; Turki J.; Innis M.; Liggett S. B.: **Amino-terminal polymorphisms of the human beta-2-adrenergic receptor impact distinct agonist-promoted regulatory properties.** *Biochemistry* 1994, 33: 9414-9419.

Hadcock J.R.; Malbon C. C.: **Down-regulation of beta-adrenergic receptors: agonist-induced reduction in receptor mRNA levels.** *Proc. Natl. Acad. Science USA*, 1998; 85: 5021-5025.

Hall, I. P. –  **$\beta_2$ -adrenoceptor polymorphisms: are they clinically important?** – *Thorax* 51:351-353, 1996.

Hall I. P.; Wheatley A.; Wilding P.; Liggett S.B.: **Association of Glu27 beta-2-adrenoceptor polymorphisms with lower airway reactivity in asthmatic subjects.** *Lancett* 1995, 345:1213-1214.

Hall, I. P. – **Beta-2-adrenoceptor polymorphisms and asthma.** – *Clin Exp Allergy*, 1999; 29:1151-4.

Hall, I. P. – **Genetics and pulmonary medicine: asthma.** – *Thorax*, 1999; 54:65-9.

Henderson R.; Baldwin J. M.; Ceska T. A.; Zemlin F.; Beckmann E.; Downing K. H.: **Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cyro-microscopy.** *J. Mol. Biol.* 1990; 213: 899-929.

Holroyd, K. J.; R. C. Levitt; C. Dragawa; P. J. Amelung; ; C. M. Panhuysen and D. A. Meyers – **Evidence for  $\beta_2$ -adrenergic receptor polymorphism at amino acid 16 as a risk factor for bronchial hiper-responsiveness** – *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 151:A673, 1995.

Hopes, E.; McDougall, C.; Christie, G.; Dewar, J.; Wheatley, A.; Hall, I. P.; Helms, P. J. : **Association of glutamine 27 polymorphism of beta-2 adrenoceptor with reported childhood asthma: population based study.** *Brit. Med. J.* 316: 664 only, 1998.

Horold K. J.; Levitt R.; Dragwa C., et al. **Evidence of beta-2-adrenergic receptor polymorphism at amino acid 16 as a risk factor for bronchial hiperresponsiveness.** *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 1995, 151: A673.

Johnson M.: **The beta-adrenoceptor.** *Am. J. Resp. Crit. Care Med.*, 1998; vol 158. pp S146-S153.

Johnson M.: **Machanims of action of  $\beta$ -adrenoceptor agonists.** In J. F. Costello and R. D. Man, editors. *Beta-agonists in the Treatment os Asthma.* Parthenon, Carnforth. 27-42, 1992.

Johnson M. and R. A. Coleman: **mechanisms of action  $\beta_2$ -adrenoceptor agonists.** In W. Busse and S. T. Holgate editors. *Asthma and Rhinits.* Blackwell, Cambridge. 1278-1295, 1995.

Kobilka B. K.; Frielle T.; Dohlman H. G.; Bolanowski M. A.; Dixon R. A.; Keller P.; Caron M. G.; Lefkowits R. J.: **Delineation of the intronless nature of the genes for the human and hamster beta-2-adrenergic receptor and their putative promoter regions.** *J. Biol. Chem.* 1987; 262: 7321-7327.

Kobilka, B. K.; Dixon, R. A. F.; Frielle, T.; Dohlman, H. G.; Bolanowski, M. A.; Sigal, I. S.; Yang-Feng, T. L.; Francke, U.; Caron, M. G.; Lefkowits, R. J. : **cDNA for the human beta-2-adrenergic receptor: a protein with multiple membrane-spanning domains and encoded by a gene whose chromosomal location is shared with that of the receptor for platelet-derived growth factor.** *Proc. Nat. Acad. Sci.* 84: 46-50, 1987.

Kumar, R. K. – **Understanding airway wall remodelation in asthma: a basis for improvement in therapy?** – *Pharmacol Ther.*; 2001 – 91(2): 93-104.

Kume H.; Hall I. P.; Washabau R. J.; Takagi K.; Kotlikoff M. I.: **Beta-adrenergic agonists regulate KCa channels in airway smooth muscle by cAMP dependent and independent mechanisms.** *J. Clin. Invest.* 1994, 93: 371-379.

Liggett S. B.: **Polymorphisms the beta-adrenergic receptor and asthma.** *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1997, 156: S156-S162.

Liggett S. B.; Raymond J.: **Pharmacology and molecular biology of adrenergic receptors.** *London: Saunders, 1993: 279-306.*

Lima J. J.; Thomason D. B.; Mohamed M. H.; Eberle E. V.; Self T. H.; Johnson J. A.: **Impact of genetic polymorphisms of the beta-2-adrenergic receptor on albuterol bronchodilator pharmacodynamics.** *Clin. Pharmacol. Ther.* 1999; 65: 519-525.

Littlejohn M. D.; Taylor D. R.; Miller A. L.; Kennedy M. A.: **determination of beta-2-adrenergic receptor (ADRB2) haplotypes by a multiplexed polymerase chain reaction assay.** *Mutation in Brief* 2002; 562.

Nishikawa M.; mark J. C.; Barnes P. J.: **Effect of short- a long-acting beta-2-adrenoceptor agonists on pulmonary beta-2-adrenoceptor expression in human lung.** *Eur. J. Pharmacol.* 1996; 318: 123-129.

Onaran, H. O., T. Costa, and Rodbard: **Subunits of guanine nucleotide-binding proteins and regulation of spontaneous receptor activity: thermodynamic model for the interaction between receptors and guanine nucleotide biding protein subunits.** *Mol. Pharmacol.* 43:245-256, 1953.

Page, C. et al – **Farmacologia Integrada** – 2<sup>a</sup> Ed. – Editora Manole – 2004.

Rheislaus, E.; M. Innis; N. MacIntyre and S. B. Liggett – **Mutations in the gene in the encoding for the  $\beta_2$ -adrenergic receptor in normal and asthmatics subjects** – *Am. J. respire. Cell Molecular. Biol.* 8:334-339, 1993.

Robison, G. A., T. Costa and E. W. Sutherland: **Adenyl ciclase as an adrenergic receptor.** *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 319:703-723, 1967.

Santillan, A. A.; Camargo, C. A.; Ramirez-Rivera A., et al. – **Association between beta-2-adrenoceptor polymorphisms and asthma diagnosis in Mexican adults.** – *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2003; 112:1095-100.

Szeffler, S. J.; Ando, R.; Cicutto, L. C.; Surs, W.; Hill, M. R.; Martin, R. J.: **Plasma histamine, epinephrine, cortisol, and leukocyte beta-adrenergic receptors in nocturnal asthma.** *Clin. Pharm. Therap.* 49: 59-68, 1991.

Tan S.; Hall I. P.; Dewar J.; Dow E.; Lipworth B. **Association between beta-2-adrenoceptor polymorphism and susceptibility to bronchodilator desensitization in moderately severe stable asthmatics.** *Lancet* 1997; 350:995-999.

Taylor, D. R.; Kennedy, M. A. – **Genetic variation of the b2-adrenoceptor: it's a functional and clinical importance in bronchial asthma** – *Am. J. pharmacogenomics* – 2001; 1: 165-174.

Turki J.; Park J.; Green S.A.; Martin R. J.; Liggett S. B.: **Genetic polymorphisms of beta-2-adrenergic receptor in nocturnal and non nocturnal asthma. Evidence of Gly 16 correlates with the nocturnal phenotype.** *J. Clin. Invest.* 1995, 95: 1635-1641.

van Veen A.; Weller F. R.; Wierenga E. A.; Jansen H. M.; Jonkers R. E.: **A comparison of salmeterol and formoterol in attenuating airway responses to short-acting beta-2-agonists.** *Pulm. Pharmacol. Ther.* 2003; 16: 153-161.

Vanhoutte, P. M. – **Endotelial adrenoceptors** – *J. of Cardiovascular Pharmacol*, 38: 796-808, 2001.

Vignola, A. M.; Chanez, P.; Campbell, A. M.; Souques, F.; Lebel, B.; Enander, I., et al – **Airway inflammation in mild intermittent and persistent asthma.** – *Am J. Respir Crit Care Med.* 1998; 157: 403-9.

**Worldwide variations in the prevalence of asthma symptoms: the International Study of asthma and Allergies in Childhood (ISAAC)** – *Eur Respir J.*, 1998; 12(2):315-35.  
*Comment in: Eur Respir J.*, 1998; 12(4):1000.

**Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivities, and atopic eczema: ISACC. : The International Study of asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) – Steering Committee. *Lancet*, 1998; 351(111):125-32.**

Woszczek, G., Borowiec, M., Ptasińska, A., Kosinski, S., Pawliczack, R., Kowalski, M. L. – **Beta2-ADR haplotypes/polymorphisms associate with bronchodilator response and IgE in grass allergy** – *Allergy*, 2005 nov; 60(11):1412-7.

Yates D. H.; Kharitonov S. A.; Barne J. P.: **an inhaled glucocorticoid does not prevent tolerance to the bronchoprotective effect as a long-acting inhaled beta-2-agonist.** *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1996; 154: 1603-1607.



***ANEXOS***



**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

☒ Caixa Postal 6111, 13083-970 Campinas, SP

☎ (0\_19) 3788-8936

FAX (0\_19) 3788-8925

🌐 [www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html](http://www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html)

✉ [cep@fcm.unicamp.br](mailto:cep@fcm.unicamp.br)

CEP, 18/08/05.  
(Grupo I)

**PARECER PROJETO:** Nº 267/2005  
**CAAE:** 0147.0.146.000-05

### **I-IDENTIFICAÇÃO:**

**PROJETO: “ASSOCIAÇÃO DAS MUTAÇÕES GLN27, GLU27, ARG16 GLY16 DO GENE ADR COM ASMA”**

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** Ana Carolina Zimiani de Paiva

**INSTITUIÇÃO:** Departamento de Genética Médica/FCM/UNICAMP

**APRESENTAÇÃO AO CEP:** 08/06/2005

### **II - OBJETIVOS**

O estudo pretende genotipar pacientes asmáticos e voluntários sadios quanto aos haplótipos Gln27, Glu27, Arg16 e Gly16 e correlacionar o genótipo com o fenótipo e a resposta às drogas, geralmente utilizadas no tratamento da asma.

### **III - SUMÁRIO**

O estudo pretende conhecer o genótipo do receptor beta adrenérgico e correlacionar com o fenótipo do paciente asmático, pois pressupõe-se ser útil para prever a resposta à terapia comumente adotada como também adotar medidas complementares ao tratamento. Segundo a pesquisadora, serão analisados 93 escolares e adolescentes entre 7 e 20 anos de idade, pacientes do ambulatório de Imunologia, Alergia e Pneumologia do Depto. de Pediatria da FCM/UNICAMP.

### **IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES**

O referido estudo tem estrutura adequada pelo referencial teórico adotado. A pesquisadora esclareceu as questões levantadas e apresentou um TCLE adequado às normas.

### **V - PARECER DO CEP**

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

## **VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES**

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

## **VII - DATA DA REUNIÃO**

Homologado na VII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 26 de julho de 2005.

  
**Prof. Dr. Sebastião Araújo**

VICE-PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FCM / UNICAMP