

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS ALELOS S E Z DO GENE
DA ALFA-1-ANTITRIPSINA EM UM GRUPO DE PACIENTES
PORTADORES DE DOENÇA PULMONAR CRÔNICA**

**BC/34517
IB/80323**

HELIANE GUERRA SERRA

Este exemplar corresponde à redação final
da tese de doutorado apresentada ao
Heliane Guerra
Serra
e aprovada pela Comissão Julgadora

06/03/98

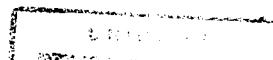
TESE APRESENTADA AO INSTITUTO DE
BIOLOGIA, DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
CAMPINAS, PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, ÁREA DE
CONCENTRAÇÃO : GENÉTICA.

Orientadora: Profa. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
Co-orientadora: Profa. Dra. Ilma Aparecida Paschoal

Campinas/SP
1998

T/UNICAMP

Se68_i



Serra, Heliane Guerra

Sc496i

Orientadora: Carmen Silvia Bertuzzo

Co-orientadora: Ilma Aparecida Paschoal

1. Mutação. 2. Portadores. 3. Pulmões. I. Bertuzzo, Carmen Silvia.
II. Paschoal, Ilma Aparecida. II. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia. III. Título.

UNIDADE IB
N.º CHAMADA
34517
395/98
R\$ 11,00
DATA 21/07/98
N.º CPD 20023327-5

Local e Data: Campinas, 06 de março de 1998

Banca Examinadora:

Titulares:

Profa. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo (Orientadora)

Assinatura

Assinatura

Prof. Dr José Dirceu Ribeiro

Profa. Dra. Maria de Fátima Sonati

Assinatura

Prof. Dr. Lair Zambom

Assinatura

Profa. Dra. Denise Pontes Cavalcanti

Assinatura

APROVADA

LISTA DE FIGURAS

	Pg
Fig. 01- Localização cromossômica de alguns genes da família serpina	04
Fig. 02- Mapa do “cluster” da família serpina localizado no braço longo do cromossomo 14	06
Fig. 03a- O gene da A1AT	07
Fig. 03b- A proteína A1AT	07
Fig. 04- Origem dos alelos da A1AT	12
Fig. 05- Gel de focalização isoeletrica utilizado para identificação dos alelos da A1AT	30
Fig. 06- Distribuição dos pacientes segundo o sexo	40
Fig. 07- Distribuição dos pacientes segundo a raça	37
Fig. 08- Distribuição dos pacientes segundo a faixa etária	41
Fig. 09- Distribuição dos pacientes segundo o hábito de fumar	41
Fig. 10- Estratégia para a detecção do alelo S do gene da A1AT	47
Fig. 11- Estratégia para a detecção do alelo Z do gene da A1AT	49
Fig. 12- Gel de poliacrilamida apresentando o alelo normal e o alelo S do gene A1AT	51
Fig. 13- Gel de poliacrilamida apresentando o alelo normal e o alelo Z do gene A1AT	51
Fig. 14- Distribuição das duas populações quanto ao sexo	59
Fig. 15- Distribuição das duas populações estudadas quanto a raça	59
Fig. 16- Distribuição dos pacientes sem os alelos investigados segundo a faixa etária	60
Fig. 17- Distribuição dos pacientes com os alelos investigados segundo a faixa etária	60

Fig. 18-	Distribuição dos pacientes segundo o hábito de fumar	71
Fig. 19-	Distribuição dos pacientes segundo a intensidade do hábito de fumar	71
Fig. 20-	Presença de tosse nas duas populações estudadas	72
Fig. 21-	Presença de catarro nas duas populações estudadas	72
Fig. 22-	Presença de chiado nas duas populações estudadas	73
Fig. 23-	Presença de dispnéia nas duas populações estudadas	73
Fig. 24-	Presença de infecções broncopulmonares nas duas populações estudadas	74
Fig. 25-	Presença de bronquectasia nas duas populações estudadas	74
Fig. 26-	Presença de bronquectasia e enfisema nas duas populações estudadas	74

LISTA DE TABELAS

	Pag.
Tabela 01- Cinética de inibição da elastase neutrofílica pelas antiprotease presentes no pulmão e sua concentrações	4
Tabela 02- Alelos normais do gene da A1AT	11
Tabela 03- Alelos deficientes e disfuncionais do gene da A1AT	14
Tabela 04- Frequência de alelos do gene da A1AT em populações selecionadas	20
Tabela 05- Mutações do gene da A1AT associadas com o risco aumentado de desenvolver enfisema	23
Tabela 06- Concentração sérica de A1AT em determinados genótipos e o risco de desenvolver enfisema comparado com a população geral	25
Tabela 07- Valores observados e esperados dos genótipos encontrados	53
Tabela 8- Valores observados e esperados dos pacientes portadores (mutantes) e dos pacientes não portadores (não mutantes) dos alelos investigados	54
Tabela 9- Valores observados e esperados dos pacientes mutantes pertencentes ao grupo S, dos pacientes mutantes pertencentes ao grupo Z e dos pacientes não mutantes (não portadores dos alelos investigados)	54
Tabela 10- Pacientes com valores séricos de A1AT normais, inferiores superiores ao normal (83-199mg/dl)	55
Tabela 11- Distribuição dos pacientes segundo o sexo	57
Tabela 12- Distribuição dos pacientes segundo a raça	58
Tabela 13- Distribuição dos pacientes segundo a média de idade	58
Tabela 14- Distribuição dos pacientes segundo o hábito de fumar	61
Tabela 15- Distribuição dos pacientes segundo a intensidade do hábito de fumar	62

LISTA DE TABELAS (continuação)

	Pg
Tabela 16- Presença de tosse nas duas populações estudadas	63
Tabela 17- Presença de catarro nas duas populações estudadas	63
Tabela 18- Presença de chiado nas duas populações estudadas	64
Tabela 19- Presença de dispnéia nas duas populações estudadas	64
Tabela 20- Presença de infecções respiratórias de repetição nas duas populações estudadas	65
Tabela 21- Presença de bronquectasia nas duas populações estudadas	65
Tabela 22- Presença de enfisema nas duas populações estudadas	66
Tabela 23- Presença de restrição ($CVF < 80$) nas duas populações estudadas	66
Tabela 24- Presença de obstrução ($VEF_1 < 50$) nas duas populações estudadas	67
Tabela 25- Relação entre $CVF/VEF_1 < 80$ ou > 80 nas duas populações	67
Tabela 26- Diagnóstico de doença brônquica (DB) nas duas populações	68
Tabela 27- Diagnóstico de doença parenquimatosa (DP) nas duas populações	68
Tabela 28- Diagnóstico de doença brônquica e parenquimatosa (DB/DP) nas duas populações	69
Tabela 29- Diagnóstico de outras (OUTRAS) doenças nas duas populações	69
Tabela 30- Valores de PO_2 nas duas populações estudadas	70
Tabela 31- Valores de PCO_2 nas duas populações estudadas	70

LISTA DE ABREVIATURAS

A1AT- alfa-1-antitripsina
A1ACT- alfa-1-antiquimotripsina
ab- abolido
abl- abolido
acinz - acinzentado
act - acentuação
Ala- alanina
amr - amarelado
Arg- arginina
Asp-asparagina
atop - atópica
ba - base
bcts - bronquectasia
bd - base direita
be - base esquerda
bil - bilateral
blh - bolha
bqc - brônquico
bqt - bronquite
brco - branco
brqlite - bronquiolite
C- citosina
carnf - carneificação
CBG- globulina de ligação ao corticóide
cDNA- ácido desoxirribonucleico complementar
centrl - centrolobular
cist - cística
cmd - campo médio direito
consd - consolidação
cr - crônica
db- doença brônquica
DNA- ácido desoxirribonucleico
db - doença brônquica
def Ig - deficiência de imunoglobulina
def im humo - deficiência imunológica humoral
dif - difuso
dim - diminuído
discn - discinesia
dNTP- desoxirribonucleotídeos
dp- doença parenquimatosa
ec - estertores creptantes

LISTA DE ABREVIATURAS (continuação)

EDTA- ácido etilenodiaminotetracético

ELF- líquido superficial das vias aéreas

enf - enfisema

esbrq - esbranquiçada

esc- estertores subcrepantes

esp - espessamento

esvd - esverdeado

fav - faveolamento

fc - fibrose cística

G- guanina

glb - globalmente

Glu- ácido glutâmico

grn - granular

hiperinsufl - hiperinsuflação

His- histidina

hmp - hemoptise

hprbqc - hiperreatividade brônquica

htd - hemitórax direito

hte - hemitórax esquerdo

htg - heterogêneo

IgA- imunoglobulina A

IgG- imunoglobulina G

IgM- imunoglobulina M

im - imagem

inft - infiltrado

interst - intersticial

KCl- cloreto de potássio

kDa- kilo Dalton

kb- kilo bases

Leu- leucina

lid - lobo inferior direito

lie - lobo inferior esquerdo

ling - lingula

lsd - lobo superior direito

Lys- lisina

μl- microlitro

μM- micromolar

M- molar

Met- metionina

MgCl₂ - cloreto de magnésio

mg/dl- miligramas por decilitro

mm- massa molecular

LISTA DE ABREVIATURAS (continuação)

mM- milimolar
mvd - murmúrio vesicular diminuído
mv+ - murmúrio vesicular presente
NaCl- cloreto de sódio
nl - normal
nod - nódulo
op - opacidade
overnight-pernoite
pb- pares de base
PCI- inibidor da proteína C
PCR- “polymerase chain reaction” ou reação em cadeia de polimerase
“pellet”- glóbulo
Phe- fenilalanina
PI- gene inibidor de protease (A1AT)
PIL- pseudo gene da A1AT
pmol- picomol
pnm rep - pneumonia de repetição
pulm - pulmonar
perib - peribrônquico
pnmpat - pneumopatia
ret - reticular
RNAm- ácido ribonucleico mensageiro
ro - roncos
rpm- rotação por minuto
SDS- Sódio Dodecil Sulfato
seq tbc - seqüela de tuberculose
Ser- serina
sib - sibilos
sg - sanguinolento
sinusobqt - sinusobronquite
SLPI- inibidor do mucobronquial
T- timina
TBE- tampão Tris-Borato-EDTA
tbg - tabágica
TIMP- inibidor de metaloprotease
trambqc - trama brônquica
Tyr- tirosina
Val- valina
velam - velamento
v/v- volume a volume

RESUMO

A alfa-1-antitripsina (A1AT) é uma glicoproteína sintetizada principalmente pelos hepatócitos e tem como principal função proteger as fibras elásticas do pulmão contra o ataque vindo da elastase neutrofílica, uma potente protease de serina.

O gene da A1AT é polimórfico, está localizado no cromossomo 14 na posição q31-31.2, possui 12,2 kb com 7 éxons e 3 íntrons. Dentre os alelos deficientes, destacam-se os alelos S e Z que atingem frequências polimórficas em muitas populações mundiais. A deficiência grave de A1AT no soro (<80 mg/dl) leva a um desequilíbrio entre o inibidor e a elastase no trato respiratório inferior e pode ocasionar o enfisema devido a degradação das fibras elásticas nesse local. Além disso, algumas formas de A1AT podem também resultar em doença hepática devido ao acúmulo da proteína nos hepatócitos de indivíduos portadores da mutação.

O nosso estudo teve como propósito a determinação da prevalência dos alelos S e Z do gene da A1AT e dos níveis séricos de A1AT, bem como realizar uma associação do quadro clínico/radiológico com cada mutação em um grupo de 121 pacientes portadores de doença pulmonar crônica, atendidos pelos ambulatórios da Disciplina de Pneumologia do HC-Unicamp.

Esse grupo de 121 indivíduos era constituído por 71 homens e 50 mulheres com a idade variando de 16 a 79 anos (média de 53 anos), a maioria era fumante. A avaliação de cada paciente incluiu os sintomas clínicos, radiograma de tórax, tomografia do tórax, espirometria e gasometria arterial em repouso. Todos os pacientes tiveram o DNA investigados quanto a presença dos alelos S e Z do gene da A1AT. Essa investigação utilizou a técnica modificada da reação em cadeia de polimerase (PCR) que cria sítios de restrição para a enzima XmnI (alelo S) e para a enzima de restrição TaqI (alelo Z).

Dentre os 121 pacientes que tiveram o DNA analisado, 28 apresentaram pelo menos uma das duas mutações (S e/ou Z). Nesse grupo, 23 pacientes apresentaram o alelo S e outro alelo que não o alelo Z (*S); dois tinham o genótipo SZ; dois apresentavam o alelo Z e um outro alelo diferente o S (*Z); um tinha o genótipo SS. Quando foi realizada a comparação dos achados nesse estudo com as frequências dos dois alelos (S e Z) na população brasileira foi observada um aumento significativo da prevalência do grupo mutante causada principalmente pelo alelo S ($p < 0,001$).

Dos 23 pacientes com o alelo S, 12 apresentavam bronquectasia (7 não fumantes e 5 fumantes ou ex-fumantes) e, dois deles apresentavam níveis alterados de sódio e cloro no suor. Entre esses 12 pacientes com bronquectasia, 2 grandes tabagistas apresentavam também enfisema, um deles inclusive em oxigenioterapia. Excluindo-se os doze pacientes com bronquectasia, foi ainda observado nesse grupo de 23 com o alelo S: dois pacientes com sinais de bronquiolite no CT de tórax; dois com enfisema e sinais importantes de comprometimento de vias aéreas tais como hemoptise ou DPOC grave; 5 pacientes com sinais de bronquite crônica; um paciente faleceu vitimado por silicose aos 38 anos de

idade; um paciente com radiograma de tórax normal e diagnóstico de hiperreatividade brônquica.

Dos últimos 5 paciente pertencentes ao grupo de 28 com mutações foram observados dois pacientes heterozigotos duplos (SZ). Ambos eram grandes tabagistas, um deles tinha bronquite crônica e necessitava de oxigenioterapia. O outro tinha história de infecções broncopulmonares de repetição e bronquectasia. Outros dois pacientes tinham o alelo Z sem o alelo S. Um deles apresentava bronquectasia disseminada, e o outro, DPOC. Finalmente, foi encontrado um paciente homozigoto SS. Era um caucasóide de 58 anos que havia deixado de fumar há 25 anos atrás. Apresentava episódios frequentes de chiado no peito, hiperinsuflação ao radiograma de tórax e bronquectasia na base do pulmão esquerdo. Além disso, foi submetido a cirurgia para tratamento de sinusite polipóide crônica.

Quanto aos níveis séricos, somente os pacientes heterozigotos duplos apresentaram valores inferiores ao normal. Em oito casos de pacientes sem mutação foram observados níveis séricos superiores ao normal.

Os dois grupos de pacientes (com mutação e sem mutação) diferiram apenas quanto à presença de chiado e de bronquectasia cuja prevalência no grupo mutante foi significativamente superior a encontrada no grupo sem mutação ($p < 0,01$). Além disso, dos 26 pacientes (26,88%) pertencentes ao grupo sem mutação e que apresentavam bronquectasia, três tinham história de tuberculose, um tinha diagnóstico de discinesia ciliar, quatro apresentavam níveis de sódio e cloro alterado no suor e um apresentava seqüela de pneumonia estafilocócica. Dos 15 pacientes com bronquectasia (53,57%) pertencentes ao grupo com mutação apenas dois apresentavam teste de suor alterado.

É importante também ressaltar que as duas populações foram diferentes frente aos níveis séricos de A1AT, por conta principalmente dos oito pacientes com níveis séricos superiores ao normal. Essa ocorrência é explicada por ser a A1AT uma proteína de fase aguda e ter seus níveis séricos elevados em condições de inflamação e de infecções como as observadas nos oito pacientes acima citados.

Através da análise dos resultados obtidos nesse estudo pode-se sugerir que a bronquectasia faça parte do espectro de alterações associadas com a deficiência de A1AT. Além disso, é provável que a elastase neutrofílica inadequadamente inibida, bem como fatores étnicos, familiares e/ou ambientais tenham contribuído para o desenvolvimento das alterações pulmonares observadas nesse grupo de pacientes brasileiros portadores de doença pulmonar crônica.

ÍNDICE

I-	INTRODUÇÃO	1
I.1-	Considerações iniciais	1
I.2--	Alfa-1-antitripsina (A1AT)	1
I.3-	Estrutura do gene e da proteína da A1AT	4
I.4-	Polimorfismo e o gene da A1AT	9
I.5-	Principais mutações do gene da A1AT	14
I.5.1-	Mutação Z	15
I.5.2-	Mutação S	17
I.6-	Doenças associadas com a deficiência de A1AT	19
I.7-	Métodos laboratoriais utilizados na análise da A1AT	28
I.8-	Tratamento da deficiência de A1AT	30
II-	OBJETIVOS	36
III-	CASUÍSTICA E MÉTODOS	37
IV-	RESULTADOS	52
V-	DISCUSSÃO	76
VI-	CONCLUSÕES	86
VII-	ABSTRACT	89
VIII-	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
IX-	ANEXOS	

I- INTRODUÇÃO

I.1- CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A deficiência de alfa-1-antitripsina é uma alteração clinicamente reconhecida desde 1963 quando Laurell e Eriksson demonstraram o estado deficiente hereditário em pacientes suecos. Desde então, as pesquisas se voltaram, principalmente nos países da Europa e Estados Unidos da América, para o estabelecimento do quadro clínico associado à doença, de métodos diagnósticos mais precisos, bem como das possibilidades terapêuticas.

Como os trabalhos em nosso país, em sua maioria, apenas se detiveram no estudo da frequência dos alelos do gene da alfa-1-antitripsina, resolvemos investigar a contribuição dos dois principais alelos deficientes (S e Z) em pacientes portadores de sintomas de doença pulmonar crônica e demonstrar a eventual associação entre os diferentes alelos e os achados clínicos/radiológicos.

I.2- ALFA-1-ANTITRIPSINA (A1AT)

De todos os inibidores de proteases, a alfa-1-antitripsina (A1AT) é aquele com maior concentração no plasma humano. Essa proteína pode formar complexos com grande espectro de proteases tais como a elastase, a tripsina (de onde se originou seu nome), a quimotripsina, a catepsina G, e a collagenase da pele e do líquido sinovial. Além disso, a A1AT pode também ligar-se à plasmina, à trombina e ao fator XI, que são proteases pertencentes ao sistema fibrinolítico e de coagulação (Cox, 1994).

No pulmão humano, as principais antiproteases encontradas são a A1AT, o inibidor de Leucoprotease (SLPI), o inibidor de metaloproteinase (TIMP), a alfa-1-antiquimotripsina e a

alfa-2-macroglobulina (tabela 1). De acordo com pesquisas realizadas por Barret e col., 1986, a A1AT e o SLPI são considerados especificamente inibidores de proteases de serina e agem principalmente contra a elastase neutrofílica e a catepsina G (Hohn e col., 1989). Ambos inibidores desempenham papel de maior relevância no pulmão devido a maior taxa de associação com a elastase neutrofílica ($10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), e a alta concentração observada no líquido superficial das vias aéreas (ELF). Foi verificado por Barret e col., (1986) que a A1AT e o SLPI atingem, respectivamente, níveis de 2,5 uM e 0,6 uM no ELF.

Apesar de a A1AT ser um inibidor de grande espectro de ação, seu principal papel é inibir a elastase neutrofílica, glicoproteína de 29 kDa, com a qual forma um complexo com alta taxa de associação ($10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Note-se que a elastase neutrofílica é uma protease extracelular produzida por células precursoras da medula óssea e armazenada nos neutrófilos que a libera quando ativados ou no final de suas vidas ao se desintegrarem. Essa protease extracelular desempenha importante papel na origem de várias desordens do pulmão humano devido à sua capacidade de degradar não só a elastina, mas também os outros componentes importantes da matriz do tecido conjuntivo (Buhl, 1986; Wewers e col., 1987).

A alfa-1-antitripsina pertence a uma importante família gênica de inibidores de proteases de serina, denominada Serpina (figura 1), cujos componentes são derivados de um gene ancestral comum através de uma evolução divergente ocorrida a cerca de 500 milhões de anos (Crystal, 1991). Até o presente momento foram identificados na literatura mais de 40 membros dessa família em vírus, em plantas e em outros organismos superiores (Cox, 1989; Huber e col., 1989). Entretanto, os inibidores mais estudados são aqueles encontrados no plasma humano, ou seja, a alfa-1-antitripsina (inibidor da elastase neutrofílica), o inibidor de leucoprotease (também inibidor da elastase neutrofílica), a alfa-1-antiquimotripsina (inibidor da catepsina G), a antitrombina III (inibidor da trombina), o inibidor C1 (do componente C1s do

complemento e da calicreína), a alfa-2-antiplasmina (inibidor da plasmina), o cofator II da heparina (inibidor da trombina), o inibidor da proteína C (da proteína C ativada), o inibidor do ativador do plasminogênio e o angiotensinogênio (não se conhece seu substrato) (Carrel e col., 1986).

No pulmão humano, as principais antiproteases encontradas são a A1AT, o inibidor de leucoprotease (SLPI), o inibidor de metaloproteinase (TIMP), a alfa-1-antiquimotripsina (A1ACT) e a alfa-2-macroglobulina (tabela 1). De acordo com pesquisas realizadas por Barret e col., 1986, a A1AT e o SLPI são considerados especificamente inibidores de proteases de serina e agem principalmente contra a elastase neutrofílica e a catepsina G (Hohn e col., 1989). Ambos inibidores desempenham papel de maior relevância no pulmão devido a maior taxa de associação com a elastase neutrofílica ($10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), e a alta concentração observada no líquido superficial das vias aéreas (ELF). Foi verificado por Barret e col., (1986) que a A1AT e o SLPI atingem, respectivamente, níveis de 2,5 uM e 0,6 uM no ELF.

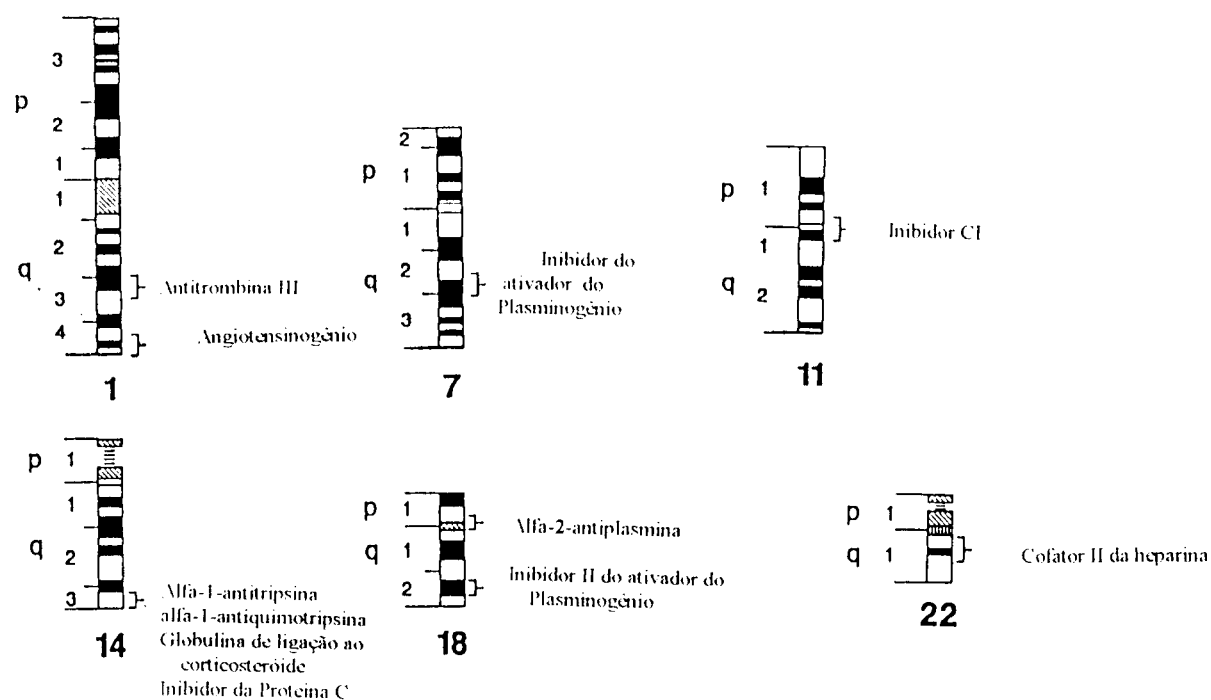
Tabela 1- Cinética de inibição da elastase neutrofílica pelas antiproteases presentes no pulmão e suas concentrações (Crystal e col., 1991).

A1AT	10^7	0,08-0,25	20-53	2 - 6
SLPI	10^7	0,45-0,50	0,004-0,007	1 - 1,2
A1ACT	0	-	6-8	0,5 - 1
TIMP	0	-	0,03	ND
A2Macroglobulina	4×10^7	6	2,5-5	0,01

* Tempo de inibição in vivo se refere ao tempo estimado em segundos em que uma antiprotease leva para inibir 97% da atividade de uma protease em igual concentração no ELF.

ELF- Líquido superficial das vias aéreas

Figura 1- Localização cromossômica de alguns genes da família Serpina (Cox, 1989)



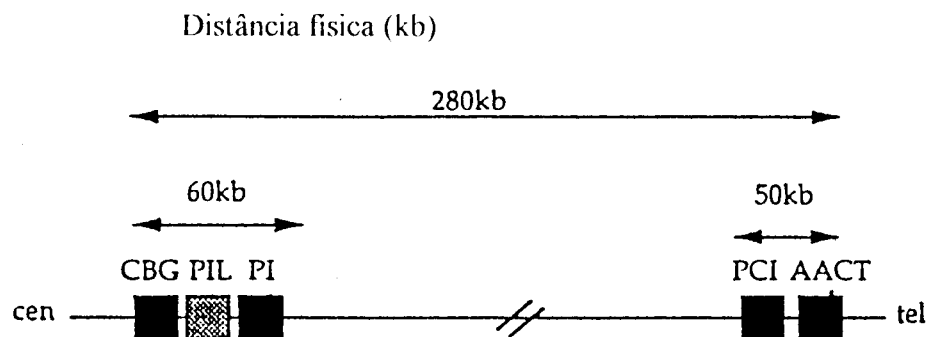
I.3- ESTRUTURA DO GENE E DA PROTEÍNA A1AT

O gene que codifica a A1AT (PI) está localizado no braço longo do cromossomo 14 (14q 31 - 32.3), contém 12,2 kb de DNA incluindo 7 éxons e 6 íntrons. Esse segmento de DNA se encontra dentro de um agrupamento de genes (“cluster”) inibidores de proteases de serina com cerca de 280 kb (Billingsley, 1993; Byth e col., 1994). Conforme podemos observar na figura 2, esse agrupamento gênico é composto (a partir do centrômero para o telômero do cromossomo 14) pelo gene da globulina de ligação ao corticosteróide (CBG), pelo pseudo gene da A1AT (PIL), pelo gene da A1AT (PI), pelo gene inibidor da proteína C (PCI) e pelo gene da alfa-1-antitripsina (AACT). O pseudo gene da A1AT é um gene não funcional que sofreu mutação após ter sido originado da duplicação do gene A1AT verdadeiro, está localizado a cerca de 12 kb do gene verdadeiro (Kidd e col., 1983; Sefton e col., 1990). Na figura 3a podemos ainda observar, com detalhes, a representação gráfica do gene da A1AT. Os éxons I_A, I_B e I_C codificam regiões não traduzidas do RNAm e toda a informação estrutural para a proteína é codificada pelos outros 4 éxons (II-V). Existe uma sequência de 72 pares de base responsável por um peptídeo sinalizador de 24 aminoácidos localizado na porção N-terminal da proteína A1AT e que posteriormente é removido da proteína recém-sintetizada, resultando na molécula madura de 394 aminoácidos. A proteína madura se liga com três carboidratos através das asparaginas (Asn⁴⁶, Asp⁸³ e Asp²⁴³). Tanto o códon para o ácido glutâmico iniciador da proteína madura como os códons para o sítio de ligação da Asn⁴⁶ e Asn⁸³ estão no éxon II. O códon para o sítio de ligação do carboidrato com a terceira Asn²⁴³ está localizado no éxon III. Todos eles desempenham importante função na manutenção da estrutura tridimensional da proteína. As sequências que codificam o sítio ativo

da proteína (Met³⁵⁸) estão no éxon V onde está localizado o códon de terminação TAA que interrompe a tradução do RNAm (Perlino e col., 1987).

processo de controle da expressão do gene da A1AT não é totalmente conhecido, porém, sua expressão é observada principalmente em hepatócitos e, em menor extensão, nos fagócitos mononucleares, nos neutrófilos e nas células do epitélio intestinal (Perlmutter, 1989). O RNAm no fígado possui 1,4 kb e é codificado por seqüências que começam no meio do éxon I_C e segue em direção ao éxon V. A transcrição do gene nos hepatócitos é controlada por uma seqüência de 750 pares de base localizada na região 5' em relação ao meio do éxon I_C. Sua primeira porção serve de evidenciadora da expressão gênica e a região proximal é essencial para a expressão do gene nos hepatócitos. Já os monócitos do sangue possuem pelo menos duas formas de RNAm, maior do que a do fígado (1,6 e 1,9 kb). As duas são codificadas por seqüências que começam na porção 5' do éxon I_A seguindo em direção ao éxon V. Talvez o menor transcrito, de 1,6 kb, resulte da remoção de seqüências do éxon I_B após a transcrição gênica (Ciliberto e col., 1985; Perlino e col., 1987).

Figura 2- Mapa do “cluster” da família Serpina localizado no braço longo do cromossomo 14 (Byth e col., 1994)



CBG- Gene da proteína de ligação ao corticóide; PIL- Pseudo-gene da A1AT; PI- Gene da A1AT; PCI- Gene do Inibidor da proteína C; AACT- Gene da Alfa-1-antiquimotripsina

Figura 3 a - O gene da A1AT; Figura 3b- A proteína A1AT (Crystal,1991)

Figura (a)

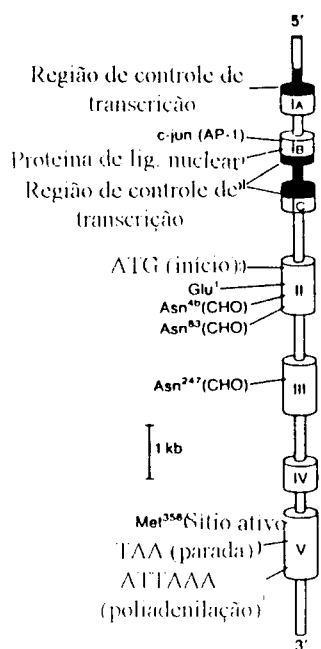
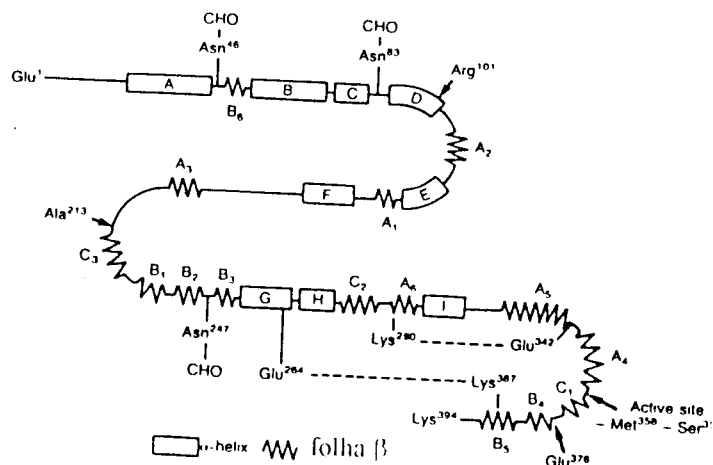


Figura (b)



A A1AT é uma glicoproteína de 52 kDa (figura 3b) que consiste de uma cadeia polipeptídica única de 394 aminoácidos. A análise por cristalografia de raio X da proteína madura revela uma estrutura globular de 6,7nm por 3,2nm com 3 carboidratos na porção externa de uma das pontas da molécula. A estrutura interna é altamente ordenada com 30% na forma de hélice alfa e 40% em folhas beta. Existem duas pontes de salinas internas (Glu³⁴² - Lys²⁹⁰ e Glu²⁶⁴ - Lys³⁸⁷) que ajudam a manter a estrutura tridimensional da proteína e cuja alteração pode levar ao desenvolvimento de estados deficientes, com suas eventuais consequências para o organismo (Loebermann e col., 1984; Crystal, 1991).

A maior parte da proteína circulante provém dos hepatócitos, que liberam cerca de 2g da proteína na circulação por dia, com vida média de 4-5 dias. Através do plasma, a A1AT segue para a maioria dos órgãos onde irá proteger estruturas extracelulares contra o ataque da elastase neutrofílica, com a qual forma um complexo de ligação (na proporção de 1:1), que depois é removido e catabolizado no sistema circulatório. Em condições normais a interação entre as duas moléculas é considerada suicida para ambas; a elastase é inibida e fica ligada à A1AT. A localização da Met na posição 358 (centro ativo da A1AT), em uma alça exposta da molécula, contribui para a formação desse complexo. Essa região está numa conformação física tensionada e faz com que a ligação Met³⁵⁸ - Ser³⁵⁹, no centro ativo da A1AT, se ajuste precisamente ao sítio ativo das proteases de serina, particularmente da elastase leucocitária. Algumas vezes a ligação Met³⁵⁸ - Ser³⁵⁹ é hidrolisada pela elastase neutrofílica durante a formação do complexo, a tensão é liberada e os dois resíduos são separados. A elastase neutrofílica continua ligada à porção N-terminal da A1AT com Met³⁵⁸, e o fragmento de 36 aminoácidos C-terminal (Ser³⁵⁹ - Lys³⁹⁴) é liberado (Travis e col., 1983).

É importante ressaltar que os níveis de A1AT no pulmão são modulados pelos níveis no plasma, os quais, por sua vez, são modulados pelos hepatócitos. No pulmão, a proteína se difunde através do endotélio dos capilares alveolares para o interstício e, em seguida, grande parte segue para os vasos linfáticos, enquanto que uma pequena quantidade se dirige através da barreira epitelial para o ELF. A concentração média de A1AT no plasma de indivíduos normais é estimada em 20-50 μM (150-350 mg/dl) e nos alvéolos é de 10-40 μM . Seu nível nos fluidos do interstício pulmonar é de 50-70% do nível plasmático e no líquido superficial das vias aéreas (ELF) é da ordem de 2-5 μM . Desse modo, devido a grande abundância de A1AT no pulmão, sua maior taxa de associação para com a elastase e massa molecular que permite sua difusão nos tecidos alveolares, a A1AT é responsável por mais de 90% da proteção antielastase nesse local. O restante do processo de inibição da elastase no pulmão é realizado pelo inibidor de leucoprotease (SLIP) e, em menor quantidade, pela alfa-2-macroglobulina (Ogushi e col., 1987; Rennard, 1990).

Sabe-se que a A1AT pode ser inativada pela oxidação provocada por radicais encontrados na fumaça de cigarro, bem como pelos radicais de oxigênio liberados por neutrófilos (Crystal, 1991). O átomo de enxofre contido na metionina do centro ativo da proteína é rapidamente oxidado, e forma um derivado cuja conformação não mais irá se ajustar ao centro ativo da elastase. Com isso, ocorrerá uma diminuição na taxa de associação da A1AT para com a elastase neutrofilica em cerca de 2000 vezes, como também o aumento na taxa de dissociação para com essa protease. Consequentemente, a elastase ficará apta para quebrar a A1AT oxidada nesse sítio e essa A1AT não poderá mais manter sua interação com outras proteínas (Johnson e col., 1979).

Por outro lado, devido a A1AT ser uma proteína de fase aguda da inflamação, ela tem a capacidade de responder a estímulos através do aumento de sua síntese, como ocorre em condições inflamatórias, infecciosas, nas neoplasias, na gravidez e na terapia com estrógenos ou com corticosteróides (Laurell e col., 1968; Fagerhol, 1981). Entretanto, a diminuição de seus níveis séricos abaixo do normal são observados nos estados de deficiência enzimática, bem como na síndrome da angústia respiratória do recém-nascido, em situações de grande perda protéica, na fase terminal da falência hepática e durante o curso de fibrose cística (Evans e col., 1970).

I.4- POLIMORFISMO E O GENE DA A1AT

O gene da A1AT é polimórfico e possui mais de 75 variantes alélicas descritas na literatura, as quais se originaram a partir do gene M1 (Ala²¹³) através de diferentes mutações (figura 4). Dentre os vários alelos existentes, os mais comuns são o M1 (Val²¹³), o M3 e o M2, que evoluíram do alelo M1 (Ala²¹³) através da substituição de um par de bases nas respectivas seqüências gênicas o que acarretou na mudança de um aminoácido nas respectivas proteínas, tornando-as estruturalmente diferentes, mas funcionalmente normais. As variantes M1 (Val²¹³), M3 e M2 são responsáveis por cerca de 95% do total de alelos na maioria das populações humanas (Cox, 1985; Nukiwa e col., 1987; Carrel e col., 1988).

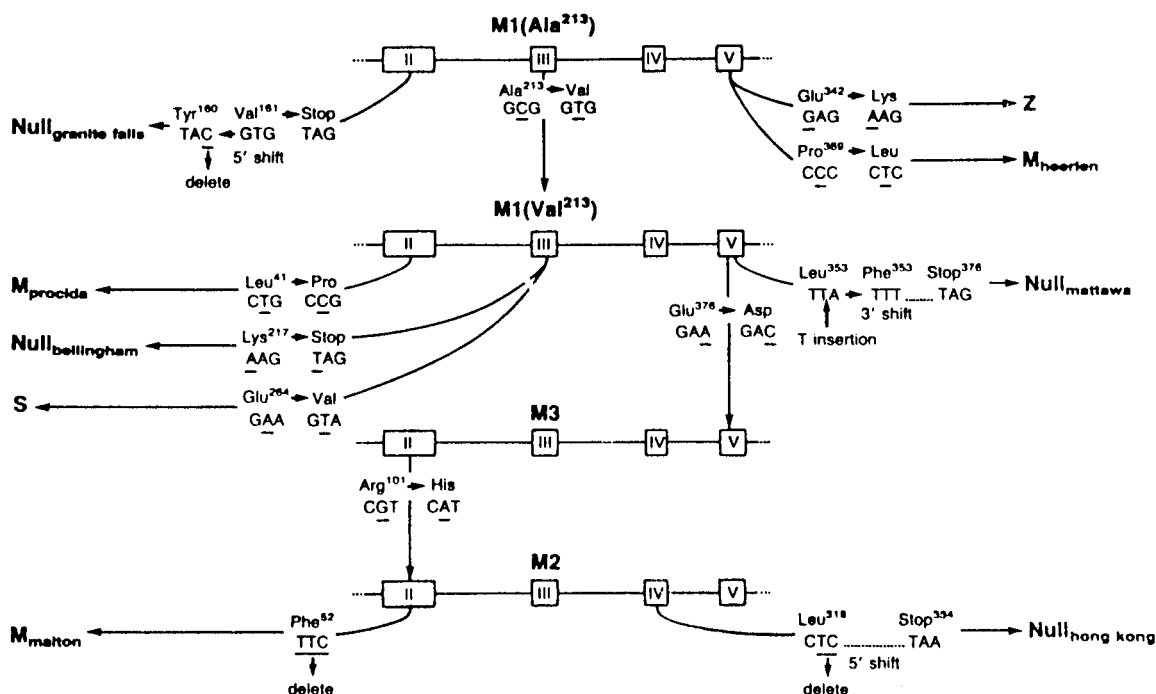
Conforme podemos observar nas tabelas 2 e 3, além das variantes normais, existem aquelas associadas com a deficiência da proteína, tais como os alelos S e Z que alcançam freqüências polimórficas em populações caucasóides e o alelo nulo onde se observa a falta total de produção da proteína. Essas variantes do gene da A1AT se originaram dos alelos normais através de substituições, deleções ou adições de pares de bases que levaram a diferentes

alterações em sua estrutura proteica e, conseqüentemente, em sua atividade inibitória (Crystal, 1991).

Tabela 2. Alelos normais da alfa-1-antitripsina (Modificado de Cox, 1994)

Alelo	Substituição	Frequência	Alelo Anterior
M1Ala	Ala ²¹³		
M1Val	Ala ²¹³ → Val	3	M1Ala ²¹³
M3	Glu ³⁷⁶ → Asp	5	M1Val ²¹³
M2	Arg ¹⁰¹ → His	2	M3
M4	Arg ¹⁰¹ → His	2	M1Val ²¹³
F	Arg ²²³ → Cys	3	M1Val ²¹³
P_{Saintalbans}	Asp ^{256 (si)} → Asp	3	M1Val ²¹³
	Asp ³⁴¹ → Asn	5	
V_{Munich}	Asp ² → Ala	2	M1Val ²¹³
X	Glu ²⁰⁴ → Lys	3	M1Val ²¹³
X_{Christchurch}	Glu ³⁶³ → Lys	5	?

Figura 4- Origem dos alelos da A1AT (Brantly e col., 1988)



Na figura podemos observar os alelos normais, deficientes e nulos, cujas seqüências gênicas são conhecidas. No centro, ao alto temos os 4 éxons codificadores do alelo normal M1(Ala²¹³). Logo abaixo vemos os 4 éxons codificadores dos alelos M1(Val²¹³), M3, e M2. Entre eles são especificados os códons mais importantes e os resíduos de aminoácidos que determinam as diferenças entre os genes normais. As mutações que determinam os alelos deficientes e os alelos nulos estão indicadas com setas originadas do éxon do alelo normal que serviu como seqüência base para a mutação. As bases nitrogenadas que sofreram alterações estão grifadas e, se for o caso, especificado se houve uma deleção ou uma inserção.

Polimorfismo genético é a ocorrência de múltiplos alelos num locus onde pelo menos dois deles aparecem com frequências superiores a 1%.

Devido ao grande número de alelos existentes, as variantes da A1AT são distribuídas, de acordo com os níveis séricos alcançados, em quatro diferentes grupos (Brantly e col., 1988):

1) Alelos normais são aqueles que, quando herdados em homozigose, estão associados a níveis séricos normais (150-350 mg/dl ou 20-48 uM). Juntos, formam o maior grupo de alelos do gene da A1AT. Apesar de diferirem quanto a estrutura do gene e a sequência de aminoácidos, eles produzem quantidade e qualidade normal de A1AT no soro. Nesse grupo, os alelos comuns têm frequência acima de 10% e os raros, possuem frequência igual ou inferior a 1% na população européia (Klasew e col., 1982).

2) Alelos deficientes são aqueles que, quando herdados em homozigose, estão associados a níveis séricos abaixo de 20 uM e podem ou não funcionar normalmente. Nesse grupo se encontra a maioria das variantes de importância clínica, tais como os alelos S e Z (Carlson e col. 1989).

3) Alelos nulos são alelos raros que produzem menos de 1% da concentração normal da proteína no plasma, ou mesmo nenhuma. Juntos representam menos de 1% de todos os alelos de A1AT (Takahashi, 1990).

4) Alelos disfuncionais são alelos que produzem quantidade normal de proteína, porém com atividade inibitória de elastase diminuída. Como exemplo temos a proteína Pittsburgh, que resultou da substituição de uma metionina na posição 358 por arginina. Essa variante está associada com problemas de coagulação devido à transformação de sua molécula em um potente inibidor de trombina e do fator XI (Scott e col., 1986).

Tabela 3- Alelos deficientes e disfuncionais da A1AT (Stoller, 1997)

Alelo	Alelo funcional	Grado de mutação	Mutação
Deficiente			
*F	M1Val ²¹³	III	R223C (<u>C</u> GT→ <u>T</u> GT)
Z	M1Ala ²¹³	V	E342K (<u>G</u> AG→ <u>A</u> AG)
T	M2	III	E264V (<u>G</u> AA→ <u>G</u> TA)
S	M1Val ²¹³	III	E264V (<u>G</u> AA→ <u>G</u> TA)
M_{herien}	M1Ala ²¹³	V	P369L (<u>C</u> CC→ <u>C</u> TC)
M_{malton}	M2	II	F52 (<u>T</u> TC→Deleção)
M_{m.spring}	M1Ala ²¹³	II	G67E (<u>G</u> GG→ <u>G</u> AG)
M_{procida}	M1Val ²¹³	II	L41P (<u>C</u> TG→ <u>C</u> CG)
W_{bethesda}	M1Ala ²¹³	V	IA336T (<u>G</u> CT→ <u>A</u> CT)
I	M1Val ²¹³	II	R39C (<u>C</u> GC→ <u>T</u> GC)
M_{palermo}	M1Val ²¹³	II	F51 (<u>T</u> TC→Deleção)
M_{nichinan}	M1Val ²¹³	II	F52 (<u>T</u> TC→Deleção)/G148R (<u>G</u> GG→ <u>A</u> GG)
P_{lowell}	M1Val ²¹³	III	D256V (<u>G</u> AT→ <u>G</u> TT)
P_{duarte}	M4	III	D256V (<u>G</u> AT→ <u>G</u> TT)
S_{iiyama}	M1 Val ²¹³	II	F53S (<u>T</u> TC→ <u>T</u> CC)
Z_{ausburg}	M2	V	E342K (<u>G</u> AG→ <u>A</u> AG)
Disfuncional			
Pittsburgh	Desconhecido	V	M358R

I.5- PRINCIPAIS MUTAÇÕES DO GENE DA A1AT

Com base na metodologia do DNA recombinante, muitas variantes do gene da A1AT foram descobertas (Matsunaga e col., 1990). As variações que deram origem a esses diferentes alelos podem ocorrer ao longo da extensão de 12,2 kb do gene, incluindo éxons, íntrons, região promotora e nas seqüências não traduzidas da região 3' após o éxon V (Cox, 1981; Kid e col., 1983). Porém, conforme podemos observar na tabela 4, as mutações de importância clínica, isto é, aquelas cujos portadores estão sob risco aumentado de desenvolverem as alterações clínicas discutidas no item I.6, são mais freqüentes nos éxons, muitas delas através de substituições de uma única base. Embora nenhuma publicação tenha explicado a razão, essas mutações ocorrem mais frequentemente em caucasóides e são raras entre negróides e asiáticos (Gadek e col., 1982). De todos esses alelos, os mais comuns são os alelos S e Z que surgiram por substituições de bases nos éxons III e V, respectivamente, e que serão comentados com maiores detalhes nas unidades seguintes deste trabalho (Crystal, 1989).

Além do que foi mencionado no parágrafo anterior, podem também ocorrer inserções ou deleções ao longo da seqüência do gene da A1AT, originando outras variantes associadas com risco de desenvolvimento de doença (tabela 4). É o caso, por exemplo, do alelo M_{malton}, que surgiu por uma deleção no éxon II levando à remoção da fenilalanina na posição 52 da cadeia polipeptídica (Graham, 1989). Uma deleção maior, isto é, de todos os éxons codificadores (cerca de 10 kb), deu origem à variante Nulo_{isola de procida}. Os alelos denominados nulos são encontrados em todas as raças e determinam a forma mais grave da deficiência (menos de 1% da concentração normal do plasma ou mesmo nenhuma). Como consequência, as alterações

pulmonares determinadas por esses alelos são geralmente mais precoces e mais graves do que as associadas com as outras mutações (Takahashi, 1990).

1.5.1- MUTAÇÃO Z

O alelo Z tem alta prevalência em populações do norte da Europa onde atinge a frequência de 0,26 (Sveger, 1976). Normalmente, esse alelo está presente em populações brancas, inclusive aquelas do Oriente Médio, e está praticamente ausente entre negróides e orientais. É importante ressaltar, entretanto, que o alelo Z pode também ser encontrado com frequência de 0.004 em populações negróides como a existente nos Estados Unidos da América em que, reconhecidamente, ocorre uma contribuição caucasóide. Na população caucasóide dos EUA, o alelo Z atinge a frequência de 0,014 (Cox e col., 1994). No estudo realizado por Paggoto (1994) na população da região de Ribeirão Preto-Brasil esse alelo atingiu a frequência de 0,03. A tabela 5 apresenta a frequência de diferentes alelos em diferentes populações do mundo.

A variante Z originou-se de uma mutação no éxon V do gene da A1AT, onde uma guanina na posição 9985 do gene foi substituída por uma adenina (G^{9985} para a A), ocasionando a troca do ácido glutâmico na posição 342 da cadeia polipeptídica pela lisina. Essa troca impossibilita a formação de uma ponte de sal entre esse mesmo ácido glutâmico e uma outra lisina, e interfere na estabilidade da molécula da proteína. Embora o número de transcritos de RNAm nas células sintetizadoras de homozigotos Z seja normal, essas células secretam apenas 10-15% da proteína produzida devido ao acúmulo de moléculas de A1AT no retículo endoplasmático rugoso das células hepáticas (Carlson e col., 1989). O mecanismo responsável pelo acúmulo intracelular dessa proteína mutante não está bem claro (Sifers e col.,

1989). Sabe-se, entretanto, que seu acúmulo no fígado é observado em forma de corpúsculos de inclusão, que são formados pela agregação das moléculas de proteína mutante (Bellingsley e col., 1982). Supõe-se que a proteína Z dobra-se lentamente na sua forma tridimensional, o que permite que as moléculas se agreguem através de interações de resíduos hidrofóbicos internos, normalmente escondidos, evitando assim que a A1AT seja transportada para o complexo de Golgi. Outra hipótese sugerida é que a mutação pode levar a perda de um sinal dentro da estrutura primária ou terciária da molécula, o que evitaria seu transporte para o complexo de Golgi e, conseqüentemente, sua secreção (Loebermann e col., 1984). Além disso, esse defeito na secreção da proteína Z mutante também é observada em monócitos e macrófagos de indivíduos portadores dos alelos da deficiência (Mornex, 1986). É importante enfatizar que o aumento da concentração da proteína mutante bem como a elevação da temperatura corpórea (41°C) favorecem a polimerização da proteína Z. Portanto, como a A1AT é uma proteína de fase aguda, a polimerização poderá ocorrer em condições inflamatórias onde se observam o aumento de sua síntese e a elevação de temperatura. A proteína Z que é liberada na circulação não funciona normalmente como inibidor da elastase neutrofílica. Segundo Ogushi e col. (1987), essa molécula leva um período de tempo 12 vezes superior àquele utilizado pela forma normal para inibir igual quantidade de elastase. Esse alelo, quando herdado em homozigose, leva os indivíduos a apresentarem somente 10-15% do nível normal do inibidor no soro (15-50 mg/dl) e, conseqüentemente, tais portadores poderão desenvolver enfisema (Crystal, 1991).

1.5.2- MUTAÇÃO S

Segundo Jugend (1980), o alelo S é o segundo mais freqüente em todas as populações do mundo, perdendo apenas para o alelo M ($M1 + M2 + M3$). É importante ressaltar sua alta freqüência nas populações de Portugal e Espanha onde atinge a freqüência de 0,15 (Fagerhol e Tenfjord, 1968; Martin e col., 1976; Cox, 1994). Na Grécia e Itália, esse alelo atinge a marca de 0,028 e 0,029, respectivamente, e sua freqüência decresce da Península Ibérica em direção ao norte da Europa (Fetarkis e col., 1974; Klasen e col., 1978). Nas populações brancas dos Estados Unidos da América, essa variante gênica atinge valores de freqüência de 0,02 a 0,03 (Cox, 1994). Entretanto, de maneira semelhante à mutação Z, a mutação S é raramente observada entre negróides e orientais da população mundial. Na população da região de Ribeirão Preto-Brasil, o alelo S alcança freqüência de 0,05 (Pagotto, 1994; tabela 4).

O alelo S tem seqüência de éxons igual ao do alelo M1(Val²¹³), com exceção de um códon localizado no éxon III do gene, onde ocorreu a substituição de uma adenina por timina e a conseqüente troca de ácido glutâmico, na posição 264 da cadeia polipeptídica, por valina. Assim como a mutação que deu origem ao alelo Z, essa mutação modifica a arquitetura interna da proteína e está associada a quantidade normal de RNAm. A diferença entre as duas proteínas mutantes está no fato de que algumas das moléculas S recém-sintetizadas são degradadas nos lisossomos antes de serem glicosiladas e não formam agregados semelhantes aos da proteína Z. A análise de cristalografia estrutural da proteína S sugere que o resíduo 264 está envolvido na formação de uma ponte salina com o resíduo 387 e, portanto, a substituição do ácido glutâmico nessa posição (264) quebraria essa ponte, levando a proteína S a se tornar menos estável e mais susceptível à proteólise intracelular (Jeppsson e col., 1978; Curiel e col., 1989; Crystal, 1991).

Por outro lado, as moléculas que não sofrem degradação são normalmente glicosiladas e liberadas para a corrente sanguínea, onde irão inibir a elastase neutrofílica dentro de um limite que, embora próximo, é inferior à normalidade. A proteína S leva um período de tempo 5 vezes superior ao da forma normal (M1) para inibir igual quantidade de elastase no pulmão, e apresenta uma taxa de associação para com a elastase ($7,1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) inferior ao da molécula normal M1 que é da ordem de $9,6 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Ogushi e col., 1989).

As células de homozigotos SS secretam cerca de 40% menos A1AT do que as células normais e atingem níveis séricos de 100-200 mg/dl (15-33 μM) (Curiel e col., 1989). Também, a quantificação da A1AT no líquido superficial das vias aéreas de indivíduos portadores de dois alelos S demonstrou valores intermediários entre os níveis alcançados por indivíduos homozigotos M1 e homozigotos Z. Embora inferiores ao normal, esses níveis alcançados pelos homozigotos S parecem ser suficientes para proteger o pulmão contra a ação proteolítica da elastase neutrofílica (Ogushi e col., 1989; Crystal e col., 1989). Todavia, quando o alelo S é herdado juntamente com a variante Z ou a variante Nula, a produção de A1AT torna-se insuficiente e o indivíduo fica sujeito a desenvolver doença pulmonar (Crystal e col., 1989).

Tabela 4- Frequências de alelos da A1AT em populações selecionadas (modificada de Cox, 1994).

População	Nº de indivíduos	M ¹	M ²	M ³	M ⁴	M ⁵
Dinamarca	909	0,72	0,13	0,08	0,02	0,02
Portugal	900	0,51	0,26	0,05	0,15	0,009
Brasil	786	0,73	0,15	0,06	0,05	0,03
EUA (brancos)	904	0,72	0,13	0,09	0,02	0,014
EUA (negros)	549	0,98	-	-	0,015	0,004
Japão	746	0,78	0,15	0,06	-	-

I.6 - DOENÇAS ASSOCIADAS COM A DEFICIÊNCIA DE A1AT

As principais manifestações clínicas associadas com a deficiência de A1AT estão relacionadas com a função e o local de produção desse inibidor de proteases. Dessa maneira, o trato respiratório inferior é particularmente vulnerável à deficiência de A1AT devido ao fato desse inibidor ser responsável por mais de 90% da proteção contra a elastase neutrofílica nas paredes alveolares. O enfisema pulmonar é a manifestação clínica mais comumente observada na deficiência de A1AT, e foi essa a alteração clínica observada por Laurell e Eriksson (1963) quando descreveram pela primeira vez o estado deficiente. Além do enfisema, embora com menor ênfase, outras manifestações pulmonares foram associadas com a deficiência de A1AT tais como a bronquectasia e a asma (Colp e col., 1993; King e col., 1996; Stoller, 1997).

Segundo Crystal (1991), um indivíduo deficiente de A1AT desenvolve sintomas pulmonares entre os 25-40 anos de idade. Geralmente, o primeiro sintoma é a dispnéia aos esforços que com a progressão da doença tende a se agravar. Em 50% dos casos se observa tosse produtiva, infecções pulmonares freqüentes e grande número deles apresenta reatividade das vias aéreas tais como o chiado. Ao exame físico nota-se diminuição do murmúrio vesicular, principalmente em bases pulmonares. O radiograma de tórax apresenta destruição pulmonar freqüentemente associada com bolhas, principalmente em região basal. Observa-se também diminuição simétrica da vasculatura periférica, mais evidente nas regiões inferiores do pulmão. Entretanto, esse achado radiológico somente é observado em pacientes com enfisema bem estabelecido e não em indivíduos ainda assintomáticos. Estudos mais recentes têm demonstrado que as alterações determinadas pelo estado deficiente são mais prontamente observadas através do exame de tomografia computadorizada do tórax (Guest e col., 1992; King, 1996). As provas de função pulmonar revelam limitação de fluxo aéreo e redução na capacidade de difusão para o monóxido de carbono. Um estudo longitudinal realizado por Wu e col. (1988) com adultos deficientes de A1AT sugere que esses pacientes apresentam sobrevida reduzida em torno de 10 a 15 anos quando comparados com a população saudável e, caso esses indivíduos tenham o hábito de fumar, sua sobrevida será reduzida cumulativamente em pelo menos 10 anos. Entretanto, esse prognóstico é baseado apenas em indivíduos deficientes já afetados por alterações pulmonares. A melhor avaliação da taxa de sobrevivência entre os indivíduos deficientes foi realizada por Seersholm e col.(1994) que acompanharam indivíduos suecos com fenótipo PI ZZ ao longo de 21 anos. Esse estudo mostrou que a sobrevivência entre os casos índices (indivíduo com fenótipo ZZ e doença pulmonar) era pior do que os não índices (indivíduo com fenótipo ZZ sem a doença pulmonar) e que o fumo realmente aumentava o risco de mortalidade especialmente entre os casos não índices. Entre os

casos não índices que não apresentavam o hábito de fumar a sobrevivência se assemelhava a da população sueca saudável. Este fato sugere a possibilidade de uma sobrevivência assintomática em um subgrupo de indivíduos PI ZZ.

A destruição das paredes alveolares ocorre devido ao desequilíbrio na relação entre inibidor/elastase no pulmão. Quando a taxa de protease sobrepõe a de seu inibidor, ela será capaz de atacar e degradar as proteínas da matriz extracelular e culminar com o desenvolvimento de enfisema (Kramps e col., 1980). No pulmão normal, existem células inflamatórias (macrófagos alveolares e neutrófilos) que têm a capacidade de liberar proteases com potencial de destruir a matriz extracelular. Porém, normalmente ocorre um excesso de antiproteases que funciona como proteção do pulmão contra esse nível crônico e baixo de elastase. Nos estados deficientes de A1AT, os baixos níveis no plasma são refletidos nos baixos níveis na região inferior do pulmão, ocorre, então, o desequilíbrio na relação inibidor/elastase nas paredes alveolares, levando à destruição lenta e progressiva do parênquima pulmonar. Esse quadro poderá ser agravado pelo hábito de fumar devido estar associado com a elevação do número de neutrófilos no pulmão em cerca de 10 vezes e, com isso, ocasionar uma inflamação crônica do trato respiratório inferior (Hunninghake, 1979). Também, a fumaça de cigarro inalada gera grande sobrecarga de agentes oxidantes que além de inativarem a A1AT através da oxidação da metionina na posição 358 em seu sítio ativo, também podem alterar o SLPI, outro inibidor de grande importância no pulmão (Vogelmeier e col., 1990; Buhl e col., 1996). Desse modo, o fumo não só potencializa os efeitos

Tabela 5- Mutações do gene da A1AT associadas com risco aumentado para desenvolver enfisema (Modificado de Crystal, 1991)

Frequência	Alelo	Alelo Anormal	Risco de desenvolver enfisema
Comum*	Z	M1Ala ²¹³	V
Comum*	S	M1Val ²¹³	III
Raro	M _{heerlen}	M1Ala ²¹³	V
Raro	M1 _{malton}	M2	II
Raro	M _{mspring}	M1Ala ²¹³	II
Raro	M _{procida}	M1Val ²¹³	II
Raro	M _{nichinan}	Desconhecido	II
Raro	M _{riyama}	Desconhecido	II
Raro	I	M1Val ²¹³	II
Raro	P _{lowel}	M1Val ²¹³	III
Raro	W _{bethesda}	M1Ala ²¹³	V
Raro	Null _{e.falls}	M1Ala ²¹³	II
Raro	Null _{bellinghan}	M1Val ²¹³	III
Raro	Null _{mattawa}	M1Val ₂₁₃	V
Raro	Null _{iprocida}	Desconhecido	II-V
Raro	Null _{HongKong}	M2	IV
Raro	Null _{bolton}	M1Val ²¹³	V
Raro	Null _{devon}	Desconhecido	II
Raro	Null _{ludwigshaf}	?	II
Raro	Null _{clayton}	M1Val ²¹³	V

*Alelo comum é aquele com frequência maior ou igual a 1%

da elastase nos indivíduos deficientes de A1AT, como também favorece o surgimento de um estado deficiente adquirido em indivíduos sem a alteração genética.

Como o gene da A1AT se expressa de maneira codominante, existem diferentes níveis séricos associados à herança de diferentes alelos. Após esses mesmos níveis séricos terem sido relacionados com a possibilidade de desenvolvimento de enfisema, foram estabelecidos níveis séricos limítrofes abaixo dos quais os indivíduos estariam sob risco aumentado de desenvolverem essa alteração (Ogushi e col.,1988). O Grupo de Estudos de Registro de Deficientes de A1AT (1994) considera o estado deficiente sob risco de desenvolver enfisema aquele com níveis séricos menores ou iguais a 80mg/dl, ou ainda, menores ou iguais a 11uM (tabela 6). Para a maioria dos autores, somente indivíduos com fenótipos Nulo-Nulo e ZZ estão sob maior risco de desenvolver doença pulmonar (níveis séricos inferiores a 11 uM). Para esses autores os fenótipos MM, MZ e SS (com níveis séricos superiores a 12 uM) têm o mesmo risco da população geral de desenvolver enfisema (Crystal e col.,1990; Cox, 1994).

Tabela 6 - Concentração de A1AT sérica em determinados genótipos e o risco de desenvolver enfisema comparado com a população geral (Sociedade Torácica Americana, 1989)

Fenótipo	Nível Sérico (g/dl)	Valor Sérico (mg/dl)	Risco de enfisema
MM*	20-48	150-350	não aumentado
MZ#	12-35	90-210	não aumentado
SS	15-33	100-140	não aumentado
SZ	8-19	75-120	discreto aumento
ZZ	2,5-7	20-45	alto risco
Nulo-Nulo	0	0	alto risco

* Inclui todas as combinações dos alelos normais da família M (M1, M2, M3).

Inclui todas as combinações dos alelos normais da família M com o alelo Z.

Uma segunda alteração clínica associada com a deficiência de A1AT é a hepatite neonatal (Sharp e col., 1969). Cerca de 10% das crianças com fenótipo PI ZZ apresentam sinais de disfunção hepática no período neonatal caracterizada por icterícia persistente, transaminases séricas discretamente elevadas e hiperbilirrubinemia conjugada. Os sinais de colestase aparecem por volta dos 2 a 4 meses e podem persistir por até 8 meses (Moroz e col., 1986; Cox, 1994). Foi, no entanto, observado em um importante estudo prospectivo envolvendo 200.000 crianças suecas com fenótipo PI ZZ, que pelo menos 75% dessas crianças não apresentavam qualquer evidência de alteração hepática na idade de 12 anos (Sveger, 1988). Por outro lado, os adultos com fenótipo PI ZZ apresentam risco significativamente elevado em relação a população total para desenvolver cirrose e câncer de fígado (Eriksson,

1986). A cirrose do adulto tem curso insidioso, é mais freqüente nos mais idosos e está associada com o acúmulo da proteína Z nos hepatócitos. Para Eriksson (1996), o risco de cirrose antes dos 20 anos é de 3% e no homem adulto passa a ser em torno de 30-50%.

Dentre os vários mecanismos sugeridos para justificar o desenvolvimento de lesão hepática, o mais provável é aquele que propõe ser a lesão dos hepatócitos secundária ao acúmulo intracelular da proteína mutante. O acúmulo das moléculas de A1AT é observado nos hepatócitos de indivíduos com fenótipos PI Z, M_{malton}, M_{duarte} e S_{siyama} sob a forma de corpúsculo de inclusão descrito por Sharp e col em 1971. Segundo Perlmutter (1990), a proteína mutante dobra-se lentamente para atingir sua configuração tridimensional e, com isso, permite a inserção não covalente da alça que contém o centro ativo de uma molécula de A1AT na alça de uma outra molécula vizinha formando, dessa maneira, dímeros e polímeros em cerca de 85% das moléculas recém-sintetizadas. Somente 15% das moléculas recém-sintetizadas conseguem passar pelo lúmen do retículo endoplasmático. O contingente de moléculas polimerizadas por influência de fatores genéticos e/ou ambientais poderá sofrer degradação no retículo endoplasmático ou ficar armazenada em corpúsculo de inclusão nesse local. Para Perlmutter (1990) esse mecanismo explicaria assim o fato de somente uma subpopulação PI ZZ desenvolver alteração hepática. A hipótese da retenção intracelular das moléculas de proteína mutante ser a causa da lesão hepática é reforçada pelo fato de que nenhum indivíduo com fenótipo PI Nulo descrito na literatura tenha apresentado alteração hepática apesar da grande deficiência de A1AT circulante (Crystal, 1990).

Quanto aos indivíduos heterozigotos para o alelo Z da deficiência de A1AT (MZ e SZ), não se sabe com certeza na literatura vigente se estão realmente predispostos a desenvolverem lesão hepática. Um estudo realizado por Propst (1992) sugere que talvez a doença hepática em

heterozigotos ocorra devido associação com infecção por hepatite B e C, ou por doença autoimune. Além disso, existe ainda a possibilidade da lesão hepática ser iniciada nos indivíduos susceptíveis através da associação com outros agentes do ambiente tais como o álcool.

Além das doenças pulmonar e hepática anteriormente discutidas, outras alterações foram também relacionadas com a deficiência de A1AT. Geralmente, essas doenças são observadas em pessoas que apresentam uma diminuição da habilidade de controlar a inflamação no tecido local e /ou hiperatividade do sistema imunológico. Talvez essa alteração no sistema imunológico seja uma consequência da capacidade das proteases e de seus inibidores de afetar o mesmo, muito embora não se conheça o mecanismo básico e a extensão desse envolvimento (Breit e col., 1985). Também é possível que a associação da deficiência de A1AT com outros tipos de doença ocorra pela proximidade do seu gene com os outros genes localizados no mesmo agrupamento (figura 2). Dessa maneira, uma alteração na estrutura do gene da A1AT poderia acarretar alterações nos genes vizinhos como, por exemplo, o gene da proteína de ligação ao corticosteróide (Humbert e col., 1991).

Como exemplo de outras alterações associadas com a deficiência de A1AT podemos citar a glomerulonefrite membranoproliferativa que pode surgir em indivíduos com fenótipo PI ZZ e doença hepática (Milford, 1975; Moroz e col., 1976; Strife, 1983). Essa nefropatia é acompanhada por depósitos de A1AT, de IgG, de IgM, de IgA e do componente C3 do complemento na região subendotelial da membrana basal glomerular. Isso tudo pode representar uma resposta imunológica à proteína Z circulante e, sendo assim, a A1AT participaria da formação de um complexo imunológico tendo como consequência a alteração renal.

Outras alterações de natureza imunológica e/ou inflamatória também foram associadas com a deficiência de A1AT. É o caso da granulomatose de Wegener (Elzouki, 1994), paniculite ulcerativa grave (Pottage, 1983; Pittelkon, 1988), da uveíte anterior (Brewerton e col., 1978; Walkerfield, 1982) e a sinusite polipóide crônica (Maune, 1985). De acordo com cada uma dessas alterações são observadas elevações nas frequências de homozigotos PI Z e/ou heterozigotos dos alelos mutantes do gene da A1AT.

Dentro da literatura, ainda existe a possibilidade de ocorrer um desequilíbrio na relação protease/inibidor e este se relacionar com o desenvolvimento de doenças tais como a artrite reumatóide (Buisseret, 1977; Billingsley, 1982; Breit, 1985), aneurisma da aorta abdominal (Cohen, 1990) e no câncer de bexiga (Benkmann, 1987).

Embora certo número de proteases pertencentes ao sistema de coagulação e fibrinólise sejam inibidas pela A1AT, parece não existir a associação entre a deficiência de A1AT e as anormalidades na coagulação e fibrinólise. Essas reações não parecem ter importância fisiológica significativa, provavelmente devido à presença de outros inibidores mais efetivos (Cox, 1994). Contudo, a mudança de um aminoácido no centro ativo da A1AT (PI Pittsburgh) converte essa proteína em um inibidor potente da trombina e do fator XI, levando a um sangramento grave durante a resposta da fase aguda (Scott e col., 1986).

1.7- MÉTODOS LABORATORIAIS UTILIZADOS NA ANÁLISE DA A1AT

A análise laboratorial clássica empregada na detecção dos alelos do gene da A1AT é geralmente realizada utilizando-se o método da eletroforese em gel de focalização isoeletrica (IEF) juntamente com a dosagem de níveis séricos.

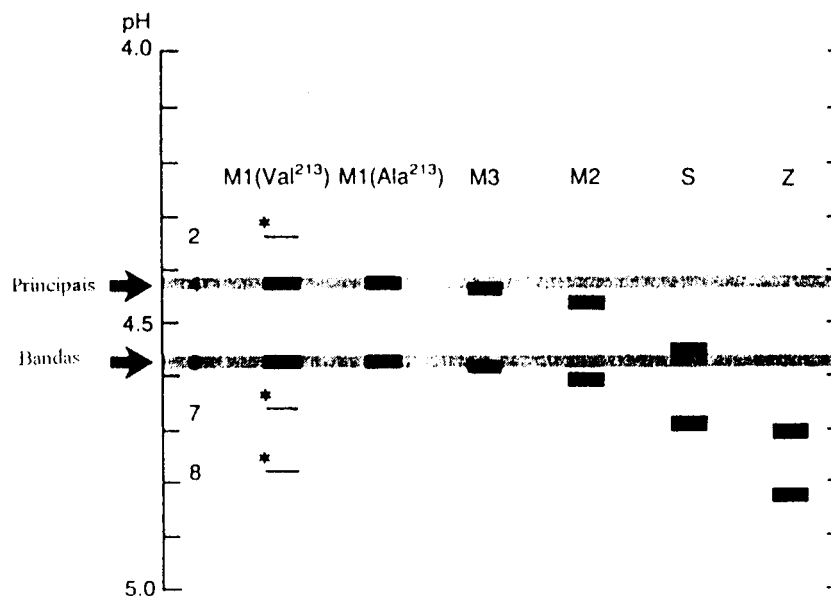
A dosagem dos níveis séricos da A1AT pode ser realizada por métodos imunoquímicos, tais como a imunodifusão radial ou a nefelometria (Mancini e col. 1965; Laurell, 1966). Cada um desses métodos usa reagentes diferentes que estabelecem, por sua vez, diferentes faixas de normalidade para os níveis séricos de A1AT. Geralmente, na imunodifusão radial, os valores séricos normais de A1AT têm sido considerados entre 150 a 350 mg/dl. Pelo método de nefelometria, os valores séricos normais de A1AT usualmente estão entre 83 a 199 mg/dl.

A fenotipagem é convencionalmente feita pela focalização isoeletrica do soro entre o pH 4 (ânodo) e o pH 5 (cátodo) em gel de poliacrilamida. Dessa maneira, os alelos são separados de acordo com suas diferentes cargas elétricas (figura 5), e designados com letras do alfabeto (A-Z) de acordo com seu ponto isoeletrico. As variantes comuns normais migram no meio do gel e, por isso, são consideradas como pertencentes à família M (middle). Por outro lado, a variante deficiente descrita originalmente por Laurell e Eriksson (1963) migra em direção ao cátodo e por isso é chamada de Z. A variante S recebe essa denominação devido ao fato de apresentar uma mobilidade lenta (slow) no gel. Os subtipos comuns são indicados com números seguindo a designação das letras. Como exemplo temos os alelos M1, M2 e M3. Os alelos raros (incluindo os alelos nulos, os alelos M deficientes e os alelos compostos de variações de DNA silenciosas) são também designados com o local de nascimento do primeiro portador conhecido. Como exemplo podemos citar os alelos W_{bethesda} e $Nulo_{\text{hongkong}}$. No caso de

dois alelos apresentarem padrões de focalização isoeletrica idênticos e a diferença na sequência de aminoácidos ser conhecida, esses resíduos são especificamente indicados como, por exemplo, M1Ala²¹³ e M1Val²¹³ (Brantly e col., 1988).

O genótipo pode ser estudado através de vários métodos, mas a maioria dos laboratórios usa o método de amplificação dos éxons do gene pela reação em cadeia de polimerase (PCR). Em seguida, o amplificado é avaliado através de sondas radioativas ou por digestão enzimática. Uma outra opção para a identificação de um determinado alelo é o método do sequenciamento gênico, realizado através de métodos químicos previamente estabelecidos (Ogushi e col., 1988; Andressen e col., 1992).

Figura 5- Gel de focalização isoeletrica utilizado para identificação dos alelos da A1AT (Cox, 1994)



Na figura acima estão representadas as bandas dos principais alelos do gene da A1AT observadas na focalização isoeletrica do soro em um pI de 4,0 a 5,0.

I.8 - TRATAMENTO DA DEFICIÊNCIA DE A1AT

O tratamento visando o controle de alterações no pulmão deve utilizar, além das medidas preventivas e paliativas (eliminação do hábito de fumar, utilização de agentes antioxidantes e de antiinflamatórios), alternativas para corrigir o desequilíbrio entre a taxa de elastase e a de seu inibidor, mecanismo fisiopatogênico básico (Wilson, 1993). A elevação dos níveis séricos do inibidor pode ser obtida utilizando-se diferentes estratégias tais como a modulação da expressão gênica, a reposição do inibidor, o uso de formas recombinantes dos inibidores de elastase, o uso de antiproteases químicas e, finalmente, a terapia gênica (Crystal, 1991). Como último recurso, isto é, quando todas as demais alternativas anteriormente citadas não se fizerem eficazes, resta a opção do transplante de pulmão (Gadek e col., 1996; Trulock, 1996).

Estudos têm demonstrado que o uso de agentes antioxidantes tais como a glutathione (GSH, reduced glutathione methionine) e seus precursores adequadamente utilizados pode transformar radicais livres em moléculas menos reativas e, portanto, menos tóxicas (Borok e col., 1991; Meyer e col., 1994). Sendo assim, a elevação do nível de glutathione no fluido que permeia o epitélio do trato respiratório inferior (ELF) poderá ser obtida através com precursores da glutathione (n-acetilcisteína, erdoseína) ou eventualmente até com SLPI recombinante via aerosol, por fornecer aminoácidos da sua própria estrutura para a síntese da glutathione. Além disso, o uso de SLIP irá também aumentar a atividade antielastase neutrofílica da região (Vogelmeier e col., 1990; Gillissen e col., 1993).

Uma outra possibilidade de tratamento é o aumento dos níveis séricos de A1AT através do uso de agentes farmacológicos. Infelizmente, esses agentes, ao serem empregados in vivo, demonstraram pouco resultados positivos. Foram utilizados hormônios tais como a associação

entre estrógeno e progesterona, danazol (derivado da 17- α -etnil testosterona) e tamoxifen. Entretanto, é importante lembrar que a utilização de drogas como o danazol e o tamoxifen em indivíduos homozigotos (ZZ) visando a elevação da síntese de A1AT poderá trazer efeitos secundários mais graves, ou seja, o agravamento do acúmulo dessa proteína nos hepatócitos, uma vez que tais drogas são incapazes de estimular sua liberação pelas células produtoras (Gadek e col., 1980; Wewers e col. 1987; Eriksson, 1996).

A terapia de reposição com A1AT humana (Prolastin ®) para pessoas deficientes e com enfisema é aplicada nos Estados Unidos da América desde 1988. A proteína utilizada é um concentrado purificado do plasma humano adequadamente tratado através de elevação de temperatura. A terapia pode ser realizada através de infusões semanais de A1AT humana purificada (60 mg/kg) ou mensalmente com infusões de 250 mg/kg. Essa reposição poderá ser realizada em hospitais (pequena estadia) ou mesmo em casa. Tanto na terapia semanal como na mensal é observado um aumento nos níveis séricos de A1AT e na atividade antielastase no pulmão acima do nível mínimo necessário para sua proteção. É uma terapia segura, com poucos efeitos colaterais e sem evidências de anticorpos anti-A1AT ou de complexos imunes. Existem, entretanto, duas grandes desvantagens dessa terapia, ou seja, seu alto custo financeiro e o grande desperdício da proteína administrada via endovenosa (Wewers e col., 1987; Hubbard e col., 1988). Na tentativa de atingir diretamente o trato respiratório inferior e evitar perda substancial da proteína utilizada na terapia, foi realizada a administração de A1AT via aerosol em duas doses diárias de 200 mg. Embora tenha sido observado um aumento dos níveis do inibidor no interstício pulmonar e no plasma humano, existem dúvidas se tais níveis conseguem chegar ao limite mínimo necessário para proteger o interstício pulmonar das alterações provocadas pela elastase, que é da ordem de 5-7 μ M (Hubbard e col., 1989).

A proteína A1AT humana recombinante já foi produzida em *E. coli* e em levedura utilizando-se o cDNA do tipo M1 (Val²¹³). Essa forma recombinante da proteína possui atividade inibitória próxima àquela da forma normal e, por não possuir as três cadeias laterais de carboidrato (m.m de 45 kDa), tem a desvantagem de apresentar grande instabilidade térmica. Quando esta forma da proteína é introduzida por via venosa, apresenta vida média reduzida no plasma (90 min) e a maior parte dela sofre rápida excreção renal. Sua administração via aerosol também foi testada em ovelhas e apresenta o mesmo problema da forma não recombinante, isto é, parece não atingir os níveis mínimos necessários para a proteção do pulmão (Bollen e col., 1984; Courtney e col., 1985; Hubbard e col., 1989; Schnebli, 1991). Os resultados obtidos em humanos são limitados. Contudo, não há relatos de alterações imunológicas e a atividade antielastase exercida pelo inibidor (pelo menos na administração por aerosol) é semelhante à atividade observada nos experimentos citados anteriormente (Casolaro e col., 1987; Rosenfeld e col., 1991; Stribling e col., 1992; Canonico e col., 1994).

Através da técnica de mutagênese sítio-dirigida foi modificado o sítio inibitório da A1AT (Met³⁵⁸ por Leu³⁵⁸) o que tornou essa proteína recombinante resistente aos agentes oxidantes. Essa forma modificada da A1AT apresenta, além de grande capacidade anti-elastase neutrofílica, uma atividade inibitória da protease catepsina G. Essa molécula modificada terá grande uso em situações onde ocorrem sobrecarga de elastase neutrofílica e de agentes oxidantes como é o caso da síndrome de desconforto respiratório do adulto, da doença pulmonar induzida por cigarro e da fibrose cística (Courtney e col., 1985; Carrel e col., 1986; Janoff e col., 1985).

É importante ressaltar o uso atual da reposição de A1AT via aerosol no tratamento de doença pulmonar em pacientes com fibrose cística. Essa terapia visa diminuir os efeitos causados pelo excesso de elastase neutrofílica geralmente associado com a aceleração do comprometimento pulmonar (destruição tecidual, aumento do número de leucócitos via citocinas, interferência na habilidade do hospedeiro de resistir a infecções por *P. aeruginosa*). Em pacientes com fibrose cística e com comprometimento moderado dos pulmões, a terapia com A1AT recombinante via aerosol (1,5 - 3,0 mg/kg, 2 vezes ao dia por 1 semana) mostrou-se eficiente na atividade antielastase do ELF (McElvaney, 1991; Allen, 1996).

Outras tentativas de inibir a atividade da elastase foram realizadas utilizando-se antiproteases químicas tais como o bovorol (metoxi-succinil-alanil-alanil-propil-boronil-valil-pinacol éster), o clorometil cetona e os compostos derivados de beta-lactam. Além da toxicidade própria de cada um desses compostos o que inviabiliza seu uso clínico, alguns, como o bovorol, demonstraram exacerbar o enfisema por serem inibidores reversíveis de elastase. Além disso, moléculas pequenas como as citadas acima podem atingir locais inacessíveis aos inibidores naturais (A1AT e SLPI) e, ao mesmo tempo, inibir a elastase em áreas que realmente necessitem de sua ação (Powers e col., 1986; Bonney e col., 1989; Stone e col., 1990).

A terapia gênica como tratamento para a deficiência de A1AT ainda se encontra em fase experimental e, portanto, não aplicada em humanos. O estágio em que se encontram os trabalhos nessa área está defasado em relação a terapia gênica na fibrose cística devido ainda não ter sido decidido qual o melhor alvo a ser atingido (fígado ou pulmão), como também devido à incerteza da progressão da doença mesmo na ausência do hábito de fumar (Mulligan, 1993; Alton, 1995). O ideal nessa terapia seria inativar o gene mutante e introduzir o gene

normal em grande número de células humanas para se obter quantidade suficiente de A1AT e, com isso, proteger os pulmões adequadamente. A inserção do gene normal tem sido realizada em animais de laboratório utilizando-se diferentes vetores tais como o retrovírus recombinante, o adenovírus e os plasmídios. Essa inserção foi obtida em fibroblastos, no sistema vascular, no trato respiratório e nos hepatócitos (Lemarchand e col., 1993). Segundo Crystal (1991), um outro alvo adequado para a terapia gênica seriam os macrófagos alveolares por expressarem normalmente o gene da A1AT. Seu acesso se daria através da inserção do cDNA do gene normal em células precursoras de monócitos na medula óssea que dariam origem aos macrófagos alveolares no trato respiratório inferior.

Segundo Alton (1995), em 1995 foi submetido às autoridades norte americanas um protocolo para a aplicação da terapia gênica em humanos deficientes de A1AT. Embora não o tenhamos observado na literatura vigente, esse trabalho tinha a finalidade de avaliar a eficácia da aplicação tópica de lipossomos carreando o gene normal da A1AT no epitélio nasal, através da observação dos níveis de RNAm e da proteína.

Quanto ao tratamento visando a correção das alterações hepáticas associadas à deficiência de A1AT, o estágio atual da pesquisa ainda é muito limitado, sendo o transplante de fígado a única opção existente (Gartner, 1984). Nesses casos, a taxa de sobrevivência tem sido de 1 ano em 80% dos casos transplantados e de 5 anos em 70% dos casos transplantados com ótima qualidade de vida e níveis normais de A1AT circulante (Sveger, 1976).

A terapia gênica visando a correção da doença hepática é baseada no fato de ser essa alteração secundária ao acúmulo intracelular da A1AT mutante. Dessa maneira, o objetivo da terapia é transformar indivíduos ZZ em MZ através da inserção do cDNA normal em hepatócitos possuidores da mutação. O problema reside no fato de como conseguir esse

objetivo *in vivo* em humanos (Li Q e col., 1993). Uma outra possível estratégia para substituir o gene defeituoso por um normal *in situ* seria a recombinação homóloga. Embora seja esta uma terapia possível, ainda está muito distante de sua aplicação em humanos (Savransky e col., 1994; Knoell, 1995).

Em termos atuais, a correção da deficiência de A1AT é uma meta possível de ser alcançada visto ser essa doença autossômica cujo gene tem expressão codominante. Além disso, o gene pode se expressar numa variedade de células e a concentração da proteína não necessita de um controle rígido. O grande problema, entretanto, é conseguir a produção estável da concentração dessa proteína funcionante. Pesquisas futuras devem ser direcionadas no sentido de resolver o problema da estabilidade da expressão gênica, da regulação da expressão gênica e a eventual toxicidade causada pela terapia. É importante ainda ressaltar a dificuldade em se estabelecer a eficácia da terapia gênica para a correção da deficiência de A1AT, visto ser essa uma doença com desenvolvimento insidioso. Desse modo, seria necessária uma comparação com a terapia de administração de proteína exógena em termos de eficácia, segurança e custos (Knoell e col., 1995; Sallenave e col., 1997).

Em face das considerações iniciais em que se destaca a necessidade de uma investigação sobre a participação dos dois principais alelos mutantes do gene da alfa-1-antitripsina (A1AT) no desenvolvimento de doença pulmonar crônica em pacientes brasileiros, o presente estudo tem o intuito principal de determinar, através da análise de DNA, a prevalência dos alelos S e Z do gene da A1AT em um grupo de 121 pacientes portadores de doença pulmonar crônica e demonstrar uma eventual associação entre as mutações observadas nesses pacientes e o quadro clínico-radiológico apresentados por eles.

O estudo de coleta de dados foi realizado entre março de 1994 e maio de 1996 e seus objetivos são enumerados a seguir.

II- OBJETIVOS

O presente estudo teve por objetivos específicos:

- 1) Determinar, através da técnica de análise de DNA, a prevalência dos alelos S e Z do gene da alfa-1-antitripsina (A1AT) em uma amostra de pacientes com sintomas de doença pulmonar crônica atendidos pelo ambulatório de Pneumologia do HC-Unicamp;
- 2) Realizar a análise da concentração enzimática da alfa-1-antitripsina nesse grupo de pacientes com doença pulmonar crônica e correlacionar com os achados dessa população estudada;
- 3) Realizar, ainda nesse grupo de pacientes, uma associação do quadro clínico-radiológico com as respectivas mutações de modo a possibilitar a detecção de uma eventual influência dos alelos investigados na determinação da alteração pulmonar.

III- CASUÍSTICA E MÉTODOS

1. CASUÍSTICA

Participaram desta investigação 121 pacientes atendidos nos ambulatórios da disciplina de Pneumologia da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp que apresentavam queixas respiratórias persistentes há pelo menos mais de um ano, e cujos diagnósticos mais comuns foram DPOC (bronquite crônica e enfisema pulmonar), asma brônquica e bronquectasia.

Foram excluídos do estudo 18 pacientes por não terem comparecido à época da reconvocação para que fosse realizada a análise da concentração enzimática ou por serem filhos ou parentes de indivíduos participantes da casuística.

O grupo de pacientes estudado foi constituído por 71 homens (58,67%) e 50 mulheres (41,32%), com média de idade de 52,38 anos (variando entre 16 e 79 anos). A maioria dos participantes do estudo era fumante (60,33%). Essa população era constituída de 78,5% caucasóides e 21,5% negróides.

As informações mais relevantes dos pacientes foram computadas em um protocolo que pode ser observado no anexo 2 desse trabalho.

Figura 6- Distribuição dos pacientes segundo o sexo



Figura 7- Distribuição dos pacientes segundo a raça

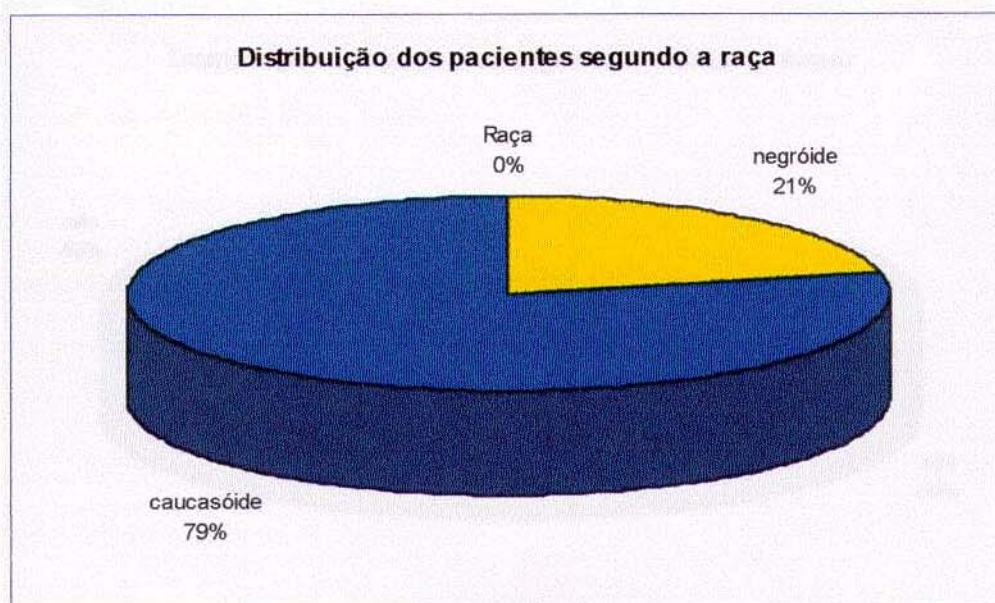


Figura 10- Distribuição dos pacientes segundo a faixa etária

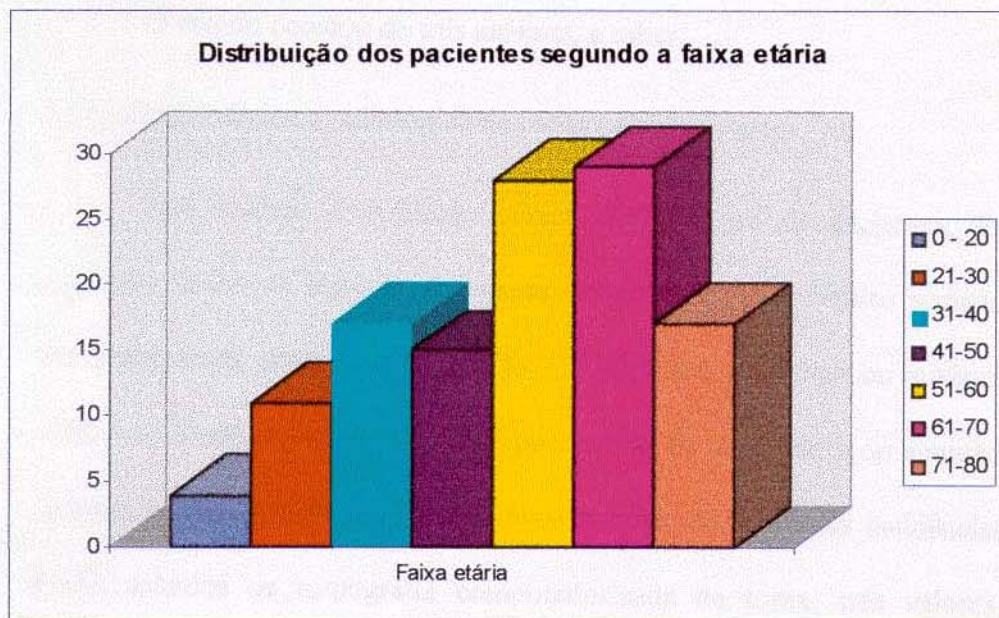
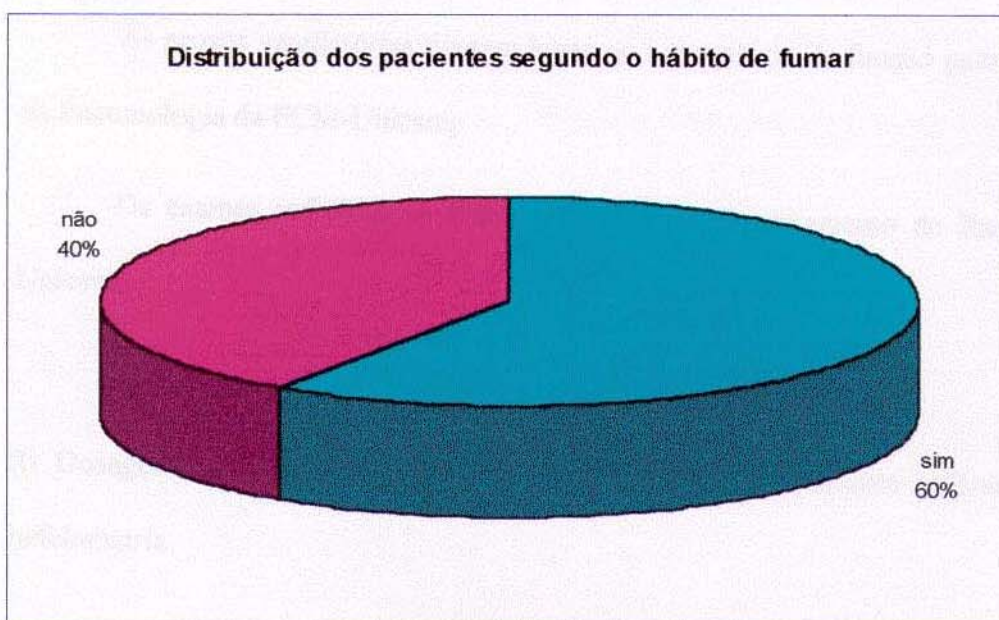


Figura 11- Distribuição dos pacientes segundo o hábito de fumar



2. MÉTODOS

O estudo constou de três análises, a saber:

1) Avaliação clínica e radiológica de todos os participantes.

Para realizar a avaliação clínica desse grupo de pacientes, foram valorizados os seguintes dados de história, de exame clínico e de propedêutica armada: idade; sexo; raça; antecedentes de tabagismo (intensidade e duração); presença ou ausência de tosse, catarro, chiado ou dispnéia; antecedentes de pneumonia de repetição e ou sinusite; ausculta pulmonar quando relevante; achados radiográficos simples de tórax nas incidências pósterio-anterior e perfil; achados de tomografia computadorizada de tórax; três valores de espirometria (capacidade vital forçada, volume expiratório forçado no primeiro segundo, relação entre o volume expiratório forçado no primeiro segundo e a capacidade vital forçada); pressão parcial de gás carbônico no sangue arterial e pressão parcial de oxigênio no sangue arterial; diagnóstico clínico laboratorial mais provável.

As provas ventilatórias tiveram lugar no Laboratório de função pulmonar da Disciplina de Pneumologia da FCM-Unicamp.

Os exames radiológicos foram realizados no Departamento de Radiologia da FCM-Unicamp.

2) Dosagem da concentração sérica da A1AT em cada paciente utilizando a técnica de nefelometria.

A dosagem da concentração sérica de A1AT foi realizada através do método de nefelometria no Departamento de Patologia Clínica da FCM-Unicamp utilizando-se o equipamento Array 360 system (Beckman Instruments, Inc., USA). Nesse método, os níveis séricos de A1AT normais estavam situados entre os valores de 83-199 mg/dl.

3) Análise do DNA de cada paciente através da reação em cadeia de polimerase (PCR) e digestão enzimática desse amplificado com as enzimas de restrição XmnI e Taq I para detecção dos alelos deficientes S e Z do gene da alfa-1-antitripsina.

Para a investigação das mutações S e Z do gene da A1AT realizou-se a extração de DNA de leucócitos pelo método modificado de Woodhead e col.(1986), descrito adiante, e em seguida, realizou-se a amplificação gênica de cada DNA através do método modificado da reação em cadeia de polimerase (PCR) que cria sítios de restrição para as enzimas XmnI (alelo S) e TaqI (alelo Z). O fragmento de DNA assim amplificado foi depois digerido com a enzima de restrição específica sob temperatura adequada e, posteriormente, essa amostra foi submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida a 16% (Andreson e col. 1992).

A seguir são descritos os procedimentos técnicos utilizados na análise de DNA de cada paciente.

a) Extração de DNA de leucócitos do sangue periférico

Procedeu-se à extração de DNA conforme o método descrito por Woodhead e col. (1986), com algumas modificações.

Dois tubos Vacutainer com cerca de 5 ml de sangue periférico foram coletados, contendo, cada um deles, 54 µl de EDTA 15% para impedir a coagulação sangüínea. Após 10 min de centrifugação a 2.000 r.p.m. à temperatura ambiente para a separação do plasma e a retirada do mesmo, foram adicionados 5 ml de tampão de lise I (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; KCL 10 mM; MgCl₂ 10 mM; EDTA 2 mM) e 125 µl de Triton 100 X. Esta mistura foi centrifugada a 2.000 r.p.m. a 4⁰C por 10 min.

O “pellet” formado devido ao processo de centrifugação foi ressuspenso com o auxílio de uma pipeta Pateur em 5 ml do mesmo tampão (tampão de lise I), e nova centrifugação foi efetuada, seguindo as mesmas condições descritas acima. Este processo foi realizado continuamente até a obtenção de um “pellet” extremamente limpo. Uma vez obtido o “pellet” limpo, este foi ressuspenso em 800 µl de tampão de lise II (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; KCl 10 mM; MgCl₂ 10 mM; NaCl 0,4 M; EDTA 2 mM) e 25 µl de SDS 20%, incubando-se a 55⁰C por 10 min.

Após esta incubação, foram adicionados 300 µl de NaCl 5M e foram feitas duas extrações com 0,5 volume de fenol (previamente equilibrado com Tris-HCl pH 8,0) e 0,5 volume da mistura clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) v/v. Após delicada inversão para a mistura homogênea de todos os reagentes, prosseguiu-se com uma centrifugação a 12.000 r.p.m. por 5 min à temperatura ambiente.

Após o processo de extração com fenol/clorofórmio, foram feitas mais duas lavagens com clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Em seguida, o DNA foi precipitado da fase aquosa com a adição de 0,1 volume de acetato de sódio 3M pH 5,5 e 2 volumes de etanol absoluto gelado e mantido em freezer, a -20⁰C, por uma hora. Após este período, centrifugou-se a solução a 12.000 r.p.m. por 5 min a temperatura ambiente. Esta mistura de etanol absoluto e

acetato de sódio foi vertida de modo a possibilitar a lavagem do “pellet” com 1 ml de etanol 70%, sendo a mistura centrifugada a 12.000 r.p.m. por 5 min a temperatura ambiente. Após a retirada do etanol 70%, o “pellet” de DNA foi deixado a temperatura ambiente para secagem.

Uma vez seco, O DNA foi ressuspenso em água MiliQ estéril, em um volume que deixasse a amostra em uma concentração final de aproximadamente 100 ng/μl. Este DNA, agora em água, foi colocado em banho-maria a 37°C “overnight” para que pudesse entrar em solução. A seguir, o DNA dissolvido foi submetido a gel de agarose 0,8% contendo brometo de etídio, em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X para subsequente visualização sob iluminação ultravioleta.

b) Amplificação Gênica

A técnica de reação em cadeia de polimerase (denominada de PCR, abreviatura do nome desta técnica em inglês, “Polymerase chain reaction”) descrita por Saiki e colaboradores (1989), possibilita a amplificação de uma pequena sequência de DNA através do uso de dois iniciadores (“Primers”) que flanqueiam a região do DNA a ser amplificada, onde se hibridizam devido à complementariedade de bases de suas sequências. A amostra de DNA é misturada em uma solução com os iniciadores e, logo em seguida, são realizados, em um aparelho ciclador de temperatura, repetidos ciclos de desnaturação térmica do DNA, anelamento dos iniciadores em temperaturas adequadas e a extensão dos iniciadores promovida pela enzima Taq DNA polimerase, levando ao acúmulo exponencial da sequência de DNA alvo.

As duas amplificações foram otimizadas para que fossem realizadas no mesmo programa de PCR. A reação foi realizada em volume de 100 μl, com a seguinte concentração de reagentes: 100 μM de cada desoxirribonucleotídeo trifosfato (dATP, dTTP, dGTP, dCTP);

40 pmoles de cada iniciador; 2,5 unidades de Taq DNA polimerase (Centbio-UFRGS); 1,5 mM de MgCl₂ presentes no tampão específico da enzima, e 1 µg de DNA genômico.

A reação de amplificação foi realizada em aparelho ciclador de temperatura e consistiu numa desnaturação inicial de 94⁰C por 7 min seguida de 1 ciclo de 95⁰C por 5 min; 50⁰C por 1 min (anelamento) e 74⁰C por 2 min (extensão). Seguiram-se 34 ciclos de 95⁰C por 1 min; 50⁰C por 1 min e 74⁰C por 2 min e, por fim, 1 ciclo de 74⁰C por 9 min (terminalização).

Abaixo são descritos com maiores detalhes os iniciadores (“primers”) e a metodologia empregada para cada mutação investigada.

Mutação S

Para a identificação da mutação S a PCR foi realizada com 2 “primers” (p7553 e p7702) produzindo um fragmento de 149 pares de base (pb) correspondente a uma parte do éxon III do gene da A1AT.

5'-CGTTTAGGCATGAATAACTTCCAGC- 3' p7553 (base 7553 à base 7577 do gene)

5'-GATGATATCGTGGGTGAGAACATTT- 3' p7702 (base 7678 à base 7702 do gene)

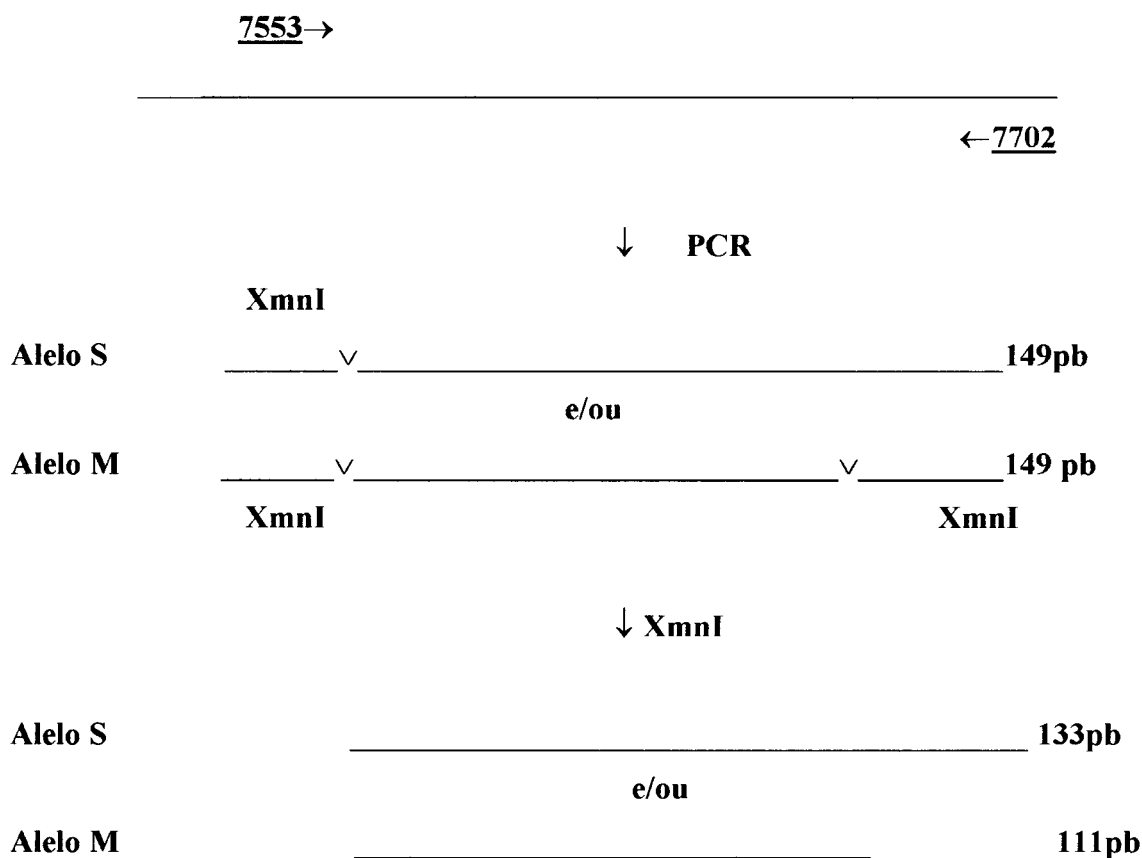
O p7702 (antisense) contém um dinucleotídeo AA no lugar de TT na posição 7683-7684 do gene. Essa mudança faz com que somente seja introduzido um sítio diagnóstico para a enzima XmnI (GAANNNTTC) somente no produto da PCR de alelos normais, mas não naqueles oriundos de alelos com mutação S pelo fato de uma timina (T) ser inserida na posição 7677.

Os alelos com a mutação S, por seu turno, tem um adenina (A) nessa posição (7677) e o sítio de restrição não é criado quando eles são copiados. A presença ou ausência do sítio de restrição permite a distinção entre o amplificado normal e o que carrega a mutação S, após clivagem com a enzima XmnI (Biolabs).

O primer p7553 (sense) introduz um sítio de restrição para a enzima XmnI em ambos os produtos amplificados (normal e mutante) e, assim, esse sítio funciona como controle interno para a digestão com a enzima de restrição XmnI em todos os alelos copiados.

Após a clivagem com a enzima XmnI, os alelos que carregam a mutação S apresentarão 133 pares de bases (pb) enquanto que os normais, 111 pares de bases (pb).

Figura 10- Estratégia para a detecção do alelo S do gene da A1AT



Mutação Z

Para a detecção da mutação Z a reação em cadeia de polimerase (PCR) foi realizada com dois “primers” (p9966 e p10063) produzindo um fragmento de 97 pares de bases correspondente a uma parte do éxon V do gene da A1AT.

p9966 5'- ATAAGGCTGTGCTGACCATCGTC-3' (base 9966 à base 9988 do gene)

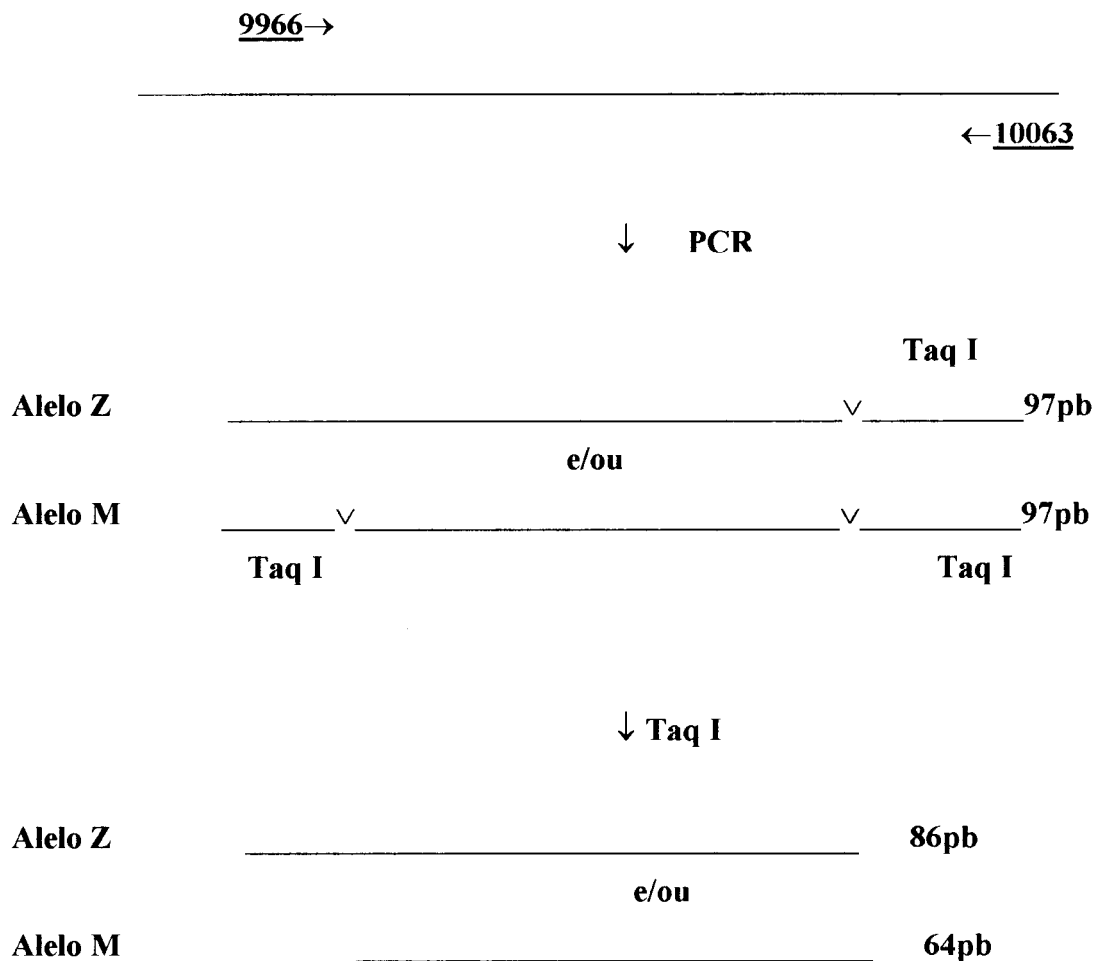
p10063 5'- TATTCCGACACGACTGGTAGCAG-3' (base 1039 à base 1063 do gene)

O primer p9966 (sense) contém uma timina (T) no lugar de uma adenina (A) na posição 9986. Essa mudança cria um sítio de restrição para a enzima TaqI (TCGA) somente nos produtos da amplificação oriundos de alelos normais que possuem uma guanina na posição 9989. Por outro lado, como a sequência mutante Z possui uma adenina no lugar dessa guanina nesse mesmo local, o sítio de restrição para a enzima TaqI (Biolabs) deixa de ser criado. A presença ou a ausência do sítio de restrição para a enzima TaqI torna possível a distinção entre os alelos normais e os alelos que carregam a mutação Z, após a clivagem enzimática .

O primer p10063 (antisense) através da troca de uma guanina (G) na posição 10050 a uma adenina (A) cria um sítio de restrição para a enzima TaqI em todos os produtos amplificados, e funciona como um controle interno para a eficiência da clivagem com a enzima de restrição em todos os alelos copiados.

Após a clivagem com a enzima TaqI os alelos que carregam a mutação Z apresentarão 86 pares de bases (pb) enquanto que os normais, 64 pares de bases (pb).

Figura 11- Estratégia para a detecção do alelo Z do gene da A1AT



c) Detecção da mutação S utilizando-se a enzima de restrição XmnI

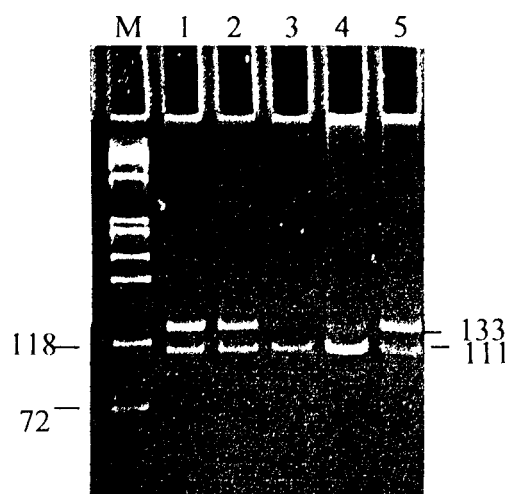
A amostra de 10 µl do amplificado para a mutação S foi digerida “overnight” a 37°C em um volume total de 30 µl contendo 5 U de enzima de restrição (XmnI), 3 µl do Tampão 10 X

recomendado pelo fornecedor e o volume final foi completado com 16,75 µl de água destéril. Após a digestão, a amostra foi submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida 16% (750 µl de TBE 20 X; 7,2 ml de H₂O; 5,3 ml de Bis acrilamida; 90 µl de Persulfato de amônio 10% e 16 µl de Temed) sob a diferença de potencial de 120 volts. Em seguida, o gel foi corado em uma solução de brometo de etídio para que os fragmentos de DNA digerido pudessem ser analisados. Conforme podemos observar na figura 6, o fragmento que representava o alelo normal possuía 111 pares de bases, e o do alelo mutante, 133 pares de bases.

d) Detecção da mutação Z utilizando-se a enzima de restrição Taq I

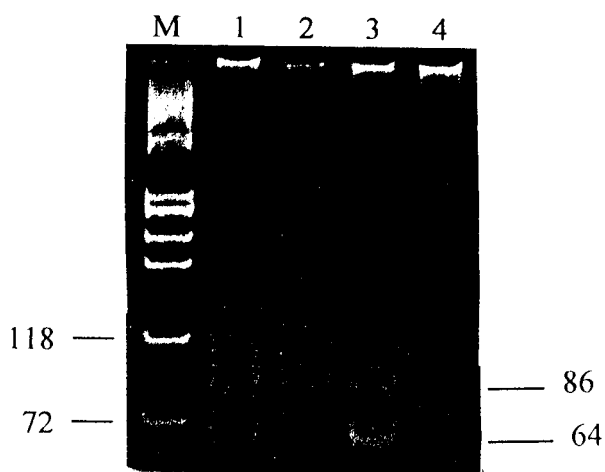
A amostra de 10 µl do amplificado para a mutação Z foi digerido “overnight” a 65⁰C em um volume total de 30 µl contendo 5 U de enzima de restrição (Taq I), 3 µl do tampão recomendado pelo fornecedor e o volume final foi completado com 16,75 µl de água estéril. Foi utilizada uma gota de óleo mineral sobre a mistura dos reagentes para evitar a evaporação da água. Após a digestão enzimática a amostra foi submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida a 16% (750ul de TBE 20 X; 7,2 ml de H₂O; 5,3 ml de Bis acrilamida; 90 µl de Persulfato de amônio 10% e 16 ul de Temed) sob a diferença de potencial de 120 volts. Em seguida, o gel foi corado em brometo de etidium para que as bandas pudessem ser analisadas (figura 7). Conforme podemos observar na figura 7, o fragmento com 64 pares de bases representava o alelo normal e aquele com 86 pares de bases representava o alelo mutante

Figura 12- Gel de poliacrilamida mostrando o alelo normal e o alelo S do gene da A1AT



Gel de poliacrilamida corado com brometo de etidium mostrando resultados da amplificação e digestão de alelos normais e mutantes do gene da A1AT com a enzima de restrição XmnI. Linhas 1, 2, 4, 5 são heterozigotos S. Linha 3, alelo normal. M- marcador ϕ X 174/ hind III.

Figura 13- Gel de poliacrilamida mostrando o alelo normal e o alelo Z do gene da A1AT



Gel de poliacrilamida corado com brometo de etidium mostrando resultados da amplificação e digestão dos alelos normais e mutantes do gene da A1AT com a enzima de restrição Taq I. Linhas 1 e 3 são heterozigotos Z. Linha 2, homozigoto Z. Linha 4, alelo normal. M- marcador ϕ X 174/Hind III.

IV- RESULTADOS

Os resultados apresentados a seguir estão organizados de acordo com os objetivos deste estudo. Para melhor compreensão dos resultados, cada paciente será representado por seu número correspondente encontrado no anexo 1 deste trabalho.

1) DETERMINAÇÃO DA PREVALÊNCIA DOS ALELOS S E Z DO GENE DA A1AT.

Dos 121 pacientes que tiveram o DNA analisados para a detecção dos alelos mutantes S e Z do gene da A1AT, vinte e oito apresentaram pelo menos uma dessas mutações (tabela 7). Desse conjunto de vinte e oito pacientes com mutações, vinte e três apresentaram o alelo S e um outro alelo que não o Z (*S). Quatro pacientes apresentaram o alelo Z, sendo que dois eram heterozigotos compostos (SZ) e os outros dois possuíam além do alelo Z um outro alelo diferente do alelo S (*Z). Apenas um paciente apresentou dois alelos S (SS). Não foram detectados homozigotos Z (ZZ).

Os dados obtidos nesse estudo foram comparados com aqueles descritos por Pagotto (1993) que determinou a frequência dos principais alelos do gene da A1AT em 447 indivíduos normais e 339 indivíduos pertencentes ao grupo de risco para AIDs, todos originários da região de Ribeirão Preto. No trabalho de Pagotto (1993) foi observada uma frequência de 0,05 para o alelo S e de 0,03 para o alelo Z. Realizamos a análise dos resultados obtidos agrupando os pacientes de duas maneiras. A primeira apreciação (tabelas 8) agrupou os pacientes como “mutantes” (aqueles que tinham pelo menos uma das duas mutações investigadas, isto é, S e/ou Z) e não mutantes (aqueles que não traziam a mutação S e nem a Z). Neste caso o χ^2 com 1 grau de liberdade e nível de significância de 0,05, alcançou o valor de 5,803 ($p =$

0,017). Desse modo, pode se concluir que o grupo mutante tem prevalência significativamente superior à esperada. A segunda apreciação foi realizada no intuito de determinar qual dos alelos exercia maior influência no resultado anteriormente citado (tabela 9). Sendo assim, o grupo mutante foi dividido em dois subgrupos, isto é, grupo S (aquele que apresentava o alelo S sem o alelo Z) e o grupo Z (aquele que apresentava o alelo Z com ou sem o alelo S). O χ^2 com 2 graus de liberdade e nível de significância de 0,05 alcançou o valor de 16,022 ($p < 0,001$). Conforme podemos observar na tabela 6, o grupo S (sem o alelo Z) é mais do dobro do valor esperado e portanto é o principal fator para o surgimento da prevalência altamente significativa do grupo mutante.

Tabela 7- Valores observados e esperados dos genótipos encontrados

SS	01	0,30
*S	23	11,13
SZ	02	0,36
*Z	02	6,68
Sem os alelos investigados	93	102,53

Tabela 8- Valores observados e esperados dos pacientes portadores (mutantes) e dos pacientes não portadores (não mutantes) dos alelos investigados

Grupo	Observado	Esperado
Mutantes	28	18,47
Não Mutantes	93	102,53
Total	121	121

$$\chi^2_{(1)} = 5,803; p = 0,017 \quad (\alpha = 0,05)$$

Tabela 9- Valores observados e esperados dos pacientes mutantes pertencentes ao grupo S, dos pacientes mutantes pertencentes ao grupo Z e dos pacientes não mutantes (não portadores dos alelos investigados)

Grupo	Observado	Esperado
Mutantes Grupo S	24	11,43
Mutantes Grupo Z	04	7,04
Não Mutantes	93	102,53
Total	121	121

$$\chi^2_{(2)} = 16,022; p < 0,001 \quad (\alpha = 0,05)$$

2) CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE A1AT EM CADA PACIENTE

Os resultados da concentração sérica de A1AT bem como os genótipos de cada paciente podem ser observados no anexo 1, parte 3. Não foi possível realizar a concentração sérica em dois pacientes (3, 26) por haverem falecido à época da reconvocação. Contudo, os resultados confirmaram os achados da literatura (Crystal, 1991). Isto é, níveis séricos inferiores ao limite normal (83 - 199 mg/dl) somente foram observados nos heterozigotos compostos (SZ). Em oito casos de pacientes sem mutações (56, 59, 81, 88, 106, 107, 109, 110) a concentração sérica de A1AT estava acima do limite superior da normalidade. Nos demais casos a concentração sérica de A1AT estava dentro da normalidade. A tabela 10 apresenta o número de pacientes com os valores séricos de A1AT normais, inferiores e superiores à normalidade (88-199 mg/dl)

Tabela 10- Pacientes com valores séricos de A1AT normais, inferiores e superiores ao normal (83- 199 mg/dl)

Genótipo	Valores normais	Valores inferiores ao normal	Valores superiores ao normal
*S	22	0	0
*Z	02	0	0
SZ	0	02	0
Normal	85	0	08

Teste exato de Fisher $p = 0,014$

3) ASSOCIAÇÃO DO QUADRO CLÍNICO-RADIOLÓGICO COM AS RESPECTIVAS MUTAÇÕES

Para melhor compreensão do presente item, é importante esclarecer certos termos utilizados no estudo. Foi definido como fumante (tabela 14), aquele indivíduo que fumou 20 ou mais maços de cigarro ao longo de sua vida ou, aquele que fumou no mínimo 1 cigarro por dia por pelo menos 1 ano em sua vida (SCSES, 1969). O hábito de fumar foi classificado em três diferentes níveis de intensidade (tabla 15) de acordo com a média de cigarros fumados (X) ao longo da vida de cada paciente. Desse modo, a intensidade foi considerada como leve quando $16.430 \leq X < 200.000$; moderada quando $200.000 \leq X < 500.000$ e grave quando $500.000 \leq X < 880.000$. O diagnóstico de doença brônquica (DB) incluiu DPOC, bronquectasia e asma. O diagnóstico de doença parenquimatosa (DP) envolvia enfisema, fibrose pulmonar, silicose. O diagnóstico de outras doenças (OUTRAS) incluiu todas as outras doenças exceto as já citadas (tabelas 26, 27, 28, 29).

Do grupo de vinte e três pacientes com o alelo S, doze apresentavam diagnóstico de bronquectasia (Tabela 21) , dos quais, 7 eram não fumantes (1,5,8,13,22,23,25) e 5 pacientes, fumantes (tabela 14) ou ex-fumantes (10,11,17,20,21). Neste grupo de doze pacientes com bronquectasia, dois deles apresentaram teste de suor alterado (8, 11) e dois apresentavam também enfisema (Tabela 22). Um deles (17), além de enfisema apresentava sinais de bronquite crônica, hemoptise e necessitava de oxigenioterapia. O outro paciente com bronquectasias e enfisema (20) apresentava também hemoptise.

Além dos 12 pacientes citados acima havia no grupo de 23 com o alelo S (*S), dois outros pacientes fumantes que também apresentavam sinais de enfisema, porém, sem bronquectasias (2, 18). Um deles (18), além de enfisema, tinha diagnóstico de fibrose cística (18) e o outro (2) apresentava sinais de bronquite crônica. Dos nove pacientes restantes desse grupo de vinte e três com o alelo S (*S), cinco fumantes apresentavam sinais de bronquite crônica (7,9, 12, 19, 24); um paciente não fumante faleceu aos 38 anos vitimado por silicose (3); outro fumante, com radiograma de tórax normal e diagnóstico de hiperreatividade brônquica (16); e os dois últimos apresentavam sinais de bronquiolite na tomografia de tórax (4,15). Um era fumante (15) e o outro (4), não fumante.

Além disso, nesse grupo de vinte e três pacientes com apenas o alelo S (*S), treze deles apresentavam história de infecções broncopulmonares (Tabela 20) de repetição (1, 3, 4, 5, 8, 11, 12, 13, 19, 20, 22, 23, 25).

Tabela 11- Distribuição dos pacientes quanto ao sexo

Grupo	Mutante	Não Mutante	Total
Masculino	13	58	71
Feminino	15	35	50
Total	28	93	121

$$\chi^2_{(1)} = 2,25; 0,10 < p < 0,20 \quad (\alpha = 0,05)$$

Tabela 12- Distribuição dos pacientes segundo a raça

Grupo	Caucasóide	Negróide	Total
Mutante	21	07	28
Não Mutante	74	19	93
Total	95	26	121

$$\chi^2_{(1)} = 0,266; 0,50 < p < 0,70 \quad (\alpha = 0,05)$$

Tabela 13- Distribuição dos pacientes segundo a média de idade

	<i>Grupo Mutante</i>	<i>Grupo não Mutante</i>
Média de Idade	49,32	53,30

Teste T de “Student” $p = 0,16$

Dos dois pacientes heterozigotos compostos encontrados, ambos tabagistas, um (14) apresentava doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC, causada por bronquite crônica) inclusive em oxigenioterapia e, o segundo (6), apresentava bronquectasia em bases pulmonares e história de pneumonias de repetição.

Figura 14- Distribuição dos pacientes quanto ao sexo

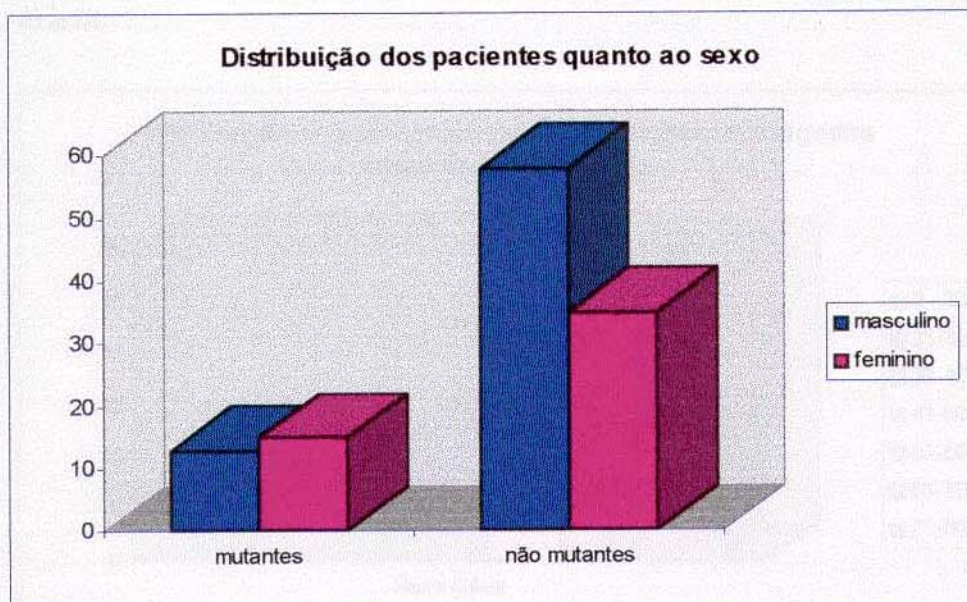


Figura 15- Distribuição dos pacientes quanto a raça

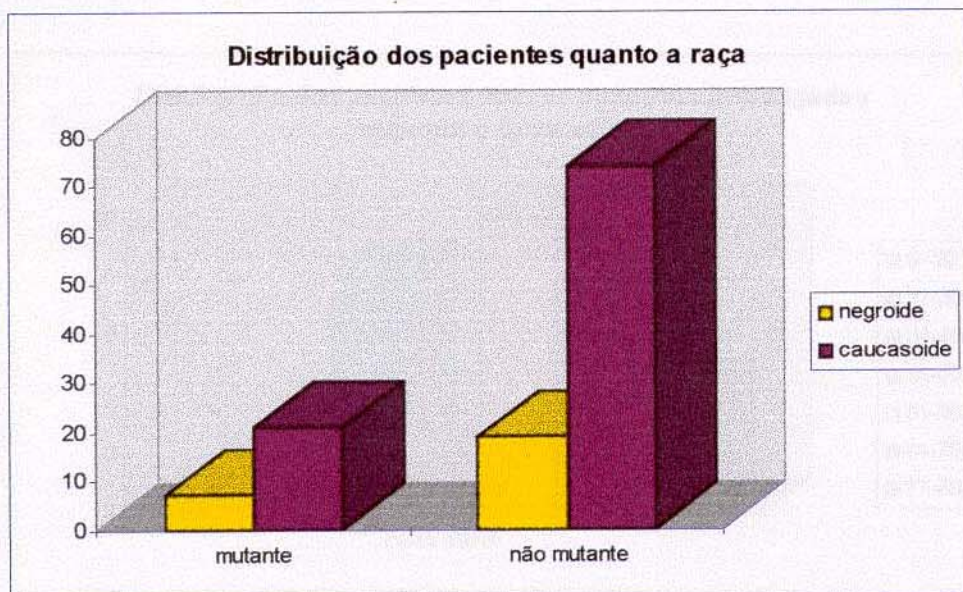


Figura 16- Distribuição dos pacientes sem as mutações investigadas segundo a faixa etária



Figura 17- Distribuição dos pacientes com as mutações investigadas segundo a faixa etária



Dos dois outros pacientes heterozigotos Z sem o alelo S (*Z), ambos tinham história de infecções broncopulmonares de repetição, chiado no peito (Tabela 18) e dispnéia (Tabela 19). Um deles (27) de 31 anos, era não fumante, tinha níveis de sódio e cloro no suor normais e ao radiograma e tomografia de tórax apresentava bronquectasia no lobo superior direito e nos lobos inferiores, bem como sinais de bronquiolite. O outro (28), era tabagista, apresentava aos 71 anos alterações radiológicas de hiperinsuflação pulmonar e na espirometria era observado defeito ventilatório misto grave.

Um único indivíduo homozigoto SS (26) nesse grupo de vinte e oito pacientes com mutações faleceu aos 58 anos de idade, era grande fumante e parou de fumar 25 anos antes de sua morte. Esse mesmo paciente apresentava freqüentes episódios de chiado no peito, hiperinsuflação ao radiograma de tórax e bronquectasias na base do pulmão esquerdo. Tinha diagnóstico de DPOC e de hiperreatividade brônquica e havia sido submetido à cirurgia para correção de sinusite polipóide.

Tabela 14- Distribuição dos pacientes quanto ao hábito de fumar

Grupo	Fumante	Não fumante	Total
Mutante	18	10	28
Não Mutante	54	39	93
Total	72	49	121

$$\chi^2_{(1)} = 0,34; 0,25 < p < 0,50 \quad (\alpha = 0,05)$$

Tabela 15- Distribuição dos pacientes segundo a intensidade do hábito de fumar

Intensidade	Grupo Mutante	Grupo não Mutante	Total
Leve	10	19	29
Moderado	06	28	34
Grave	02	06	08
Total	18	53	71

Teste exato de Fisher $p = 0,335$

Em resumo, no grupo de vinte e oito pacientes portadores de pelo menos um tipo de mutação (S e/ou Z) observamos os seguintes achados: quinze pacientes apresentavam bronquectasias (1, 5, 6, 8, 10, 11, 13, 17, 20, 21, 22, 23, 25, 26, 27); quatro casos apresentavam enfisema associada ou não a bronquectasia e todos eles traziam somente o alelo S (2, 17, 18, 20); nove apresentavam bronquite crônica com ou sem bronquectasia (7, 9, 12, 14, 17, 19, 24, 26, 28); um faleceu por silicose (3); três apresentavam sinais de bronquiolite na tomografia de tórax (4, 15, 27) e o último, com radiograma de tórax normal e diagnóstico de hiperreatividade brônquica (16).

No grupo dos pacientes sem as mutações S e/ou Z foram observados 26 casos de bronquectasias (31, 33, 36, 37, 39, 42, 50, 54, 56, 57, 59, 60, 65, 69, 76, 77, 80, 95, 96, 103, 105, 110, 112, 116, 118, 121). Nesse grupo de 26 pacientes, 9 eram fumantes (37, 50, 57, 59, 69, 77, 80, 116, 121). Desses 26 casos com bronquectasias, 6 apresentavam também enfisema (36, 37, 42, 57, 80, 96). Outros 10 pacientes apresentavam enfisema porém, sem

bronquectasia (78, 83, 85, 89, 90, 102, 108, 114, 119, 120). Nesse grupo de 10 pacientes, somente 2 não eram tabagista (78, 90). Em resumo, foram observados nesse grupo de pacientes não mutantes 26 casos de bronquectasia com ou sem enfisema e 16 casos de enfisema com ou sem bronquectasia.

Tabela 16- Presença de tosse nas duas populações estudadas

Tosse	Grupo Mutante	Grupo não Mutante	Total
Sim	26	90	116
Não	02	03	05
Total	28	93	121

Teste exato de Fisher $p = 0,310$

Tabela 17- Presença de catarro nas duas populações estudadas

Catarro	Grupo Mutante	Grupo não Mutante	Total
Sim	24	75	99
Não	04	18	22
Total	28	93	121

Teste exato de Fisher $p = 1,00$

Tabela 18- Presença de chiado nas duas populações estudadas

Chiado	Grupo Não-Ativo	Grupo Não-Ativo	Total
Sim	21	47	68
Não	07	46	53
Total	28	93	121

$$\chi^2_{(1)} = 5,26; 0,02 < p < 0,05 \quad (\alpha = 0,05)$$

Tabela 19- Presença de dispnéia nas duas populações estudadas

Dispneia	Grupo Não-Ativo	Grupo Não-Ativo	Total
Sim	25	83	108
Não	03	10	13
Total	28	93	121

Teste exato de Fisher $p = 1,00$

Tabela 20- Presença de Infecções respiratórias de repetição nas duas populações

Presença de infecções respiratórias de repetição	Grupos de crianças com doença crônica	Grupos de crianças sem doença crônica	Total
Sim	16	57	73
Não	12	36	48
Total	28	93	121

$$\chi^2_{(1)} = 0,15; \quad 0,50 < p < 0,70 \quad (\alpha = 0,05)$$

Tabela 21- Presença de bronquectasia nas duas populações estudadas

Presença de bronquectasia	Grupos de crianças com doença crônica	Grupos de crianças sem doença crônica	Total
Sim	15	26	41
Não	13	67	80
Total	28	93	121

$$\chi^2_{(1)} = 6,30; \quad 0,01 < p < 0,02 \quad (\alpha = 0,05)$$

Tabela 22- Presença de enfisema nas duas populações estudadas

Enfisema	Grupo A (n=28)	Grupo B (n=93)	Total
Sim	4	16	20
Não	24	77	101
Total	28	93	121

Teste exato de Fisher $p = 1,00$

Tabela 23- Presença de restrição (CVF< 80) nas duas populações

Restrição	Grupo A (n=19)	Grupo B (n=69)	Total
Sim (<80)	14	55	69
Não (≥80)	05	14	19
Total	19	69	88

Teste exato de Fisher $p = 0,54$

Tabela 24- Presença de obstrução ($VEF_1 < 50$) nas duas populações

Obstrução	Grupo Maltosa	Grupo não Maltosa	Total
Sim (<50)	12	37	49
Não (≥50)	07	32	39
Total	19	69	88

$$\chi^2_{(1)} = 0,549; \quad p = 0,459 \quad (\alpha = 0,05)$$

Tabela 25- Relação entre CVF/ $VEF_1 < 80$ ou > 80 nas duas populações

Relação	Grupo Maltosa	Grupo não Maltosa	Total
<80	17	59	76
≥80	02	07	09
Total	19	66	85

Teste exato de Fisher $p = 1,00$

Tabela 26- Diagnóstico de doença brônquica (DB) nas duas populações

DB	Grupo Menor	Grupo não Menor	Total
Sim	23	73	96
Não	05	20	25
Total	28	93	121

$$\chi^2_{(1)} = 0,17; \quad 0,50 < p < 0,70 \quad (\alpha = 0,05)$$

Tabela 27- Diagnóstico de doença parenquimatosa (DP) nas duas populações

DP	Grupo Menor	Grupo não Menor	Total
Sim	02	07	09
Não	26	86	112
Total	28	93	121

Teste exato de Fisher $p = 0,65$

Tabela 28- Diagnóstico de doença parenquimatosa e brônquica (DP/DB) nas duas populações

DP/DB	Grupo Menor	Grupo do Maior	Total
Sim	03	11	14
Não	25	82	107
Total	28	93	121

Teste exato de Fisher $p = 0,58$

Tabela 29- Diagnóstico de outras doenças (Outras) nas duas populações estudadas

OUTRAS	Grupo Menor	Grupo do Maior	Total
Sim	0	02	02
Não	28	91	119
Total	28	93	121

Teste exato de Fisher $p = 0,58$

Tabela 30- Valores de PO₂ nas populações estudadas

	<i>Grupo - Metformina</i>	<i>Grupo - Sin. Metformina</i>
PO₂ (média)	66,56	63,02
Total de pacientes	16	49

Teste T de “Student” p = 0,35

Tabela 31- Valores de PCO₂ nas populações estudadas

	<i>Grupo - Metformina</i>	<i>Grupo - Sin. Metformina</i>
PCO₂ (média)	38,40	40,81
Total de pacientes	16	49

Teste T de “Student” p = 0,34

Figura 18- Distribuição dos pacientes segundo o hábito de fumar

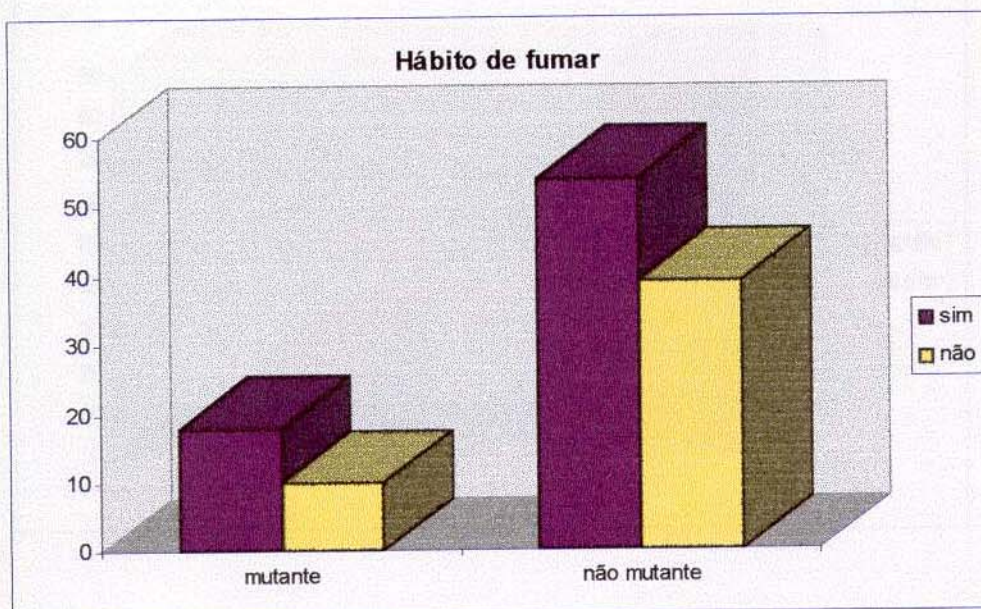


Figura 19- Distribuição dos pacientes segundo a intensidade do hábito de fumar

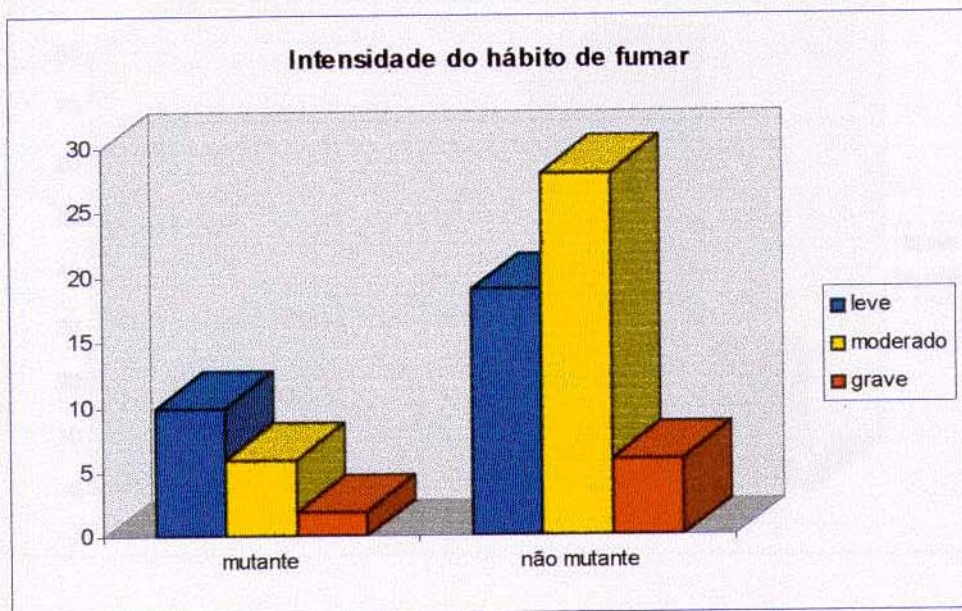


Figura 20- Presença de tosse nas duas populações estudadas

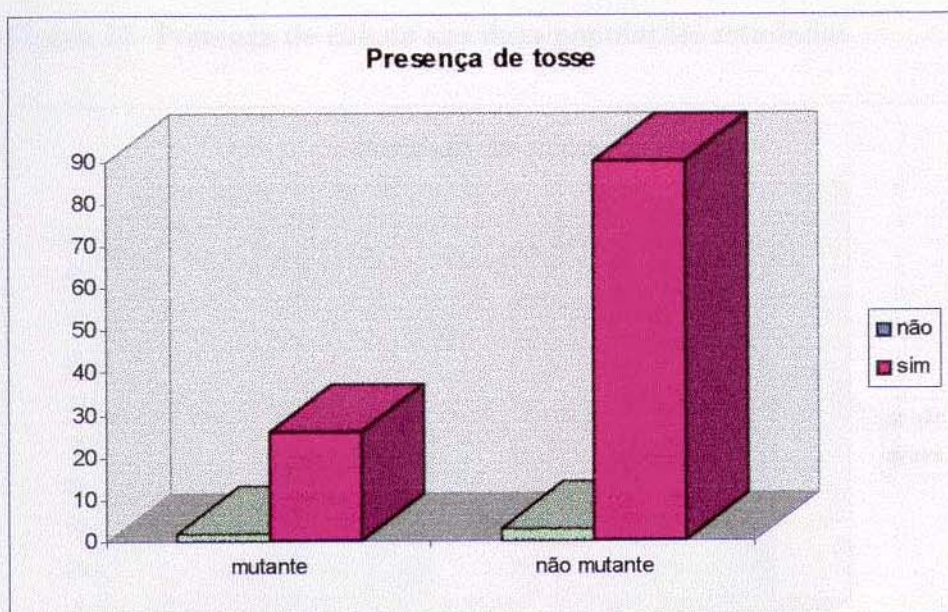


Figura 21- Presença de catarro nas duas populações estudadas

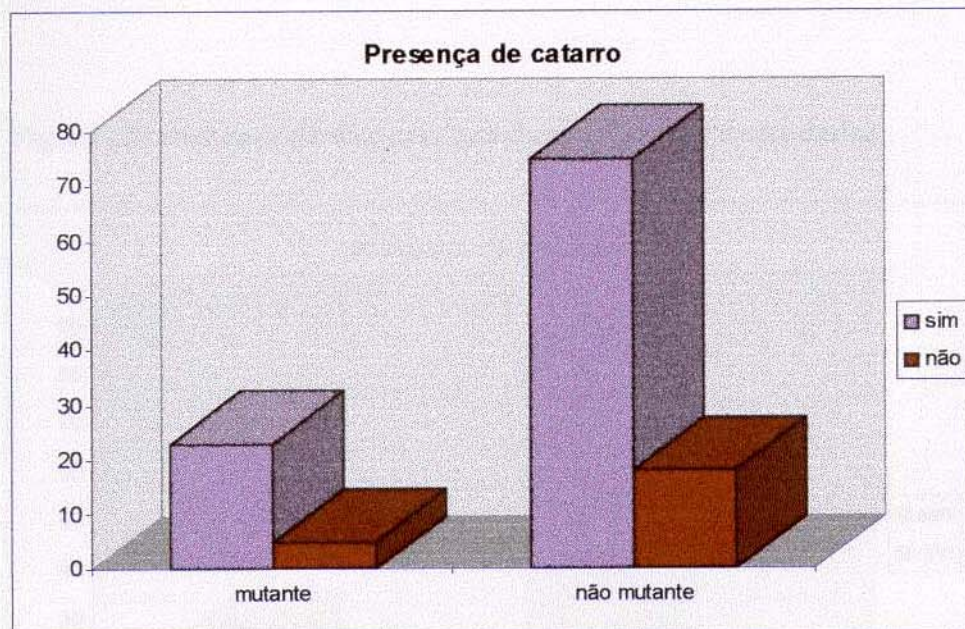


Figura 22- Presença de chiado nas duas populações estudadas

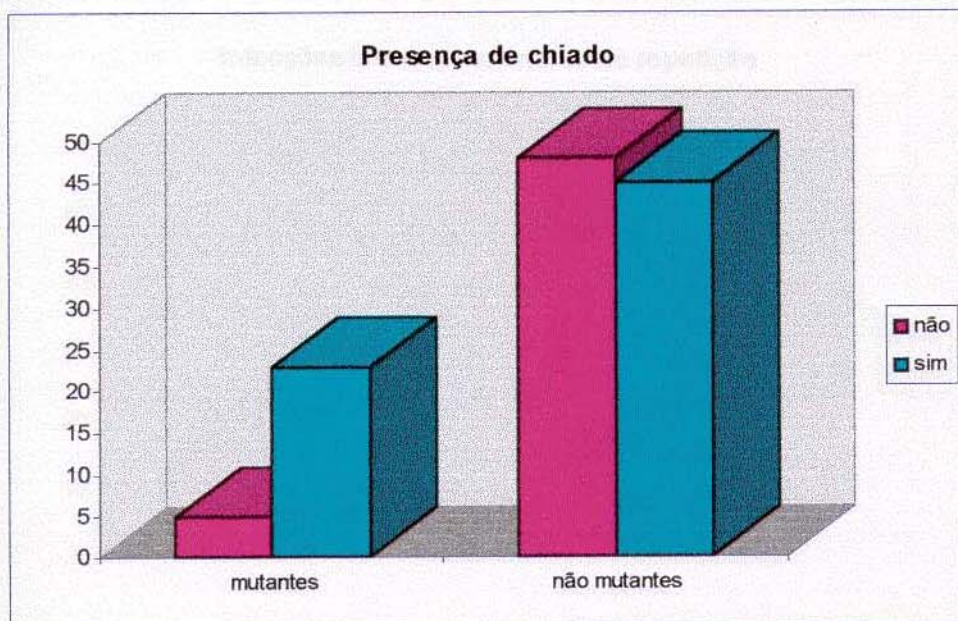


Figura 23- Presença de dispnéia nas duas populações estudadas

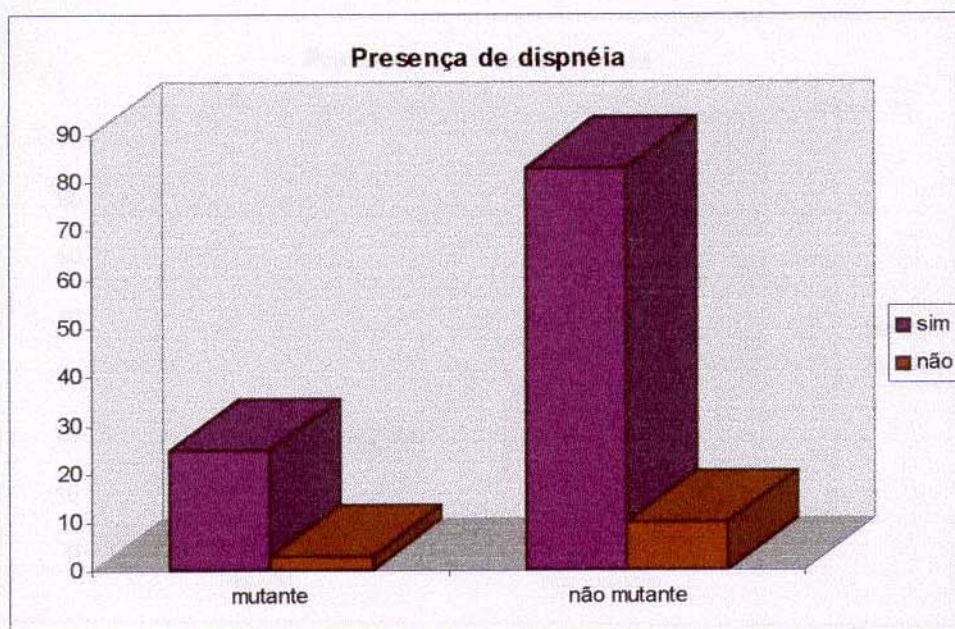


Figura 24- Presença de infecções broncopulmonares nas duas populações estudadas

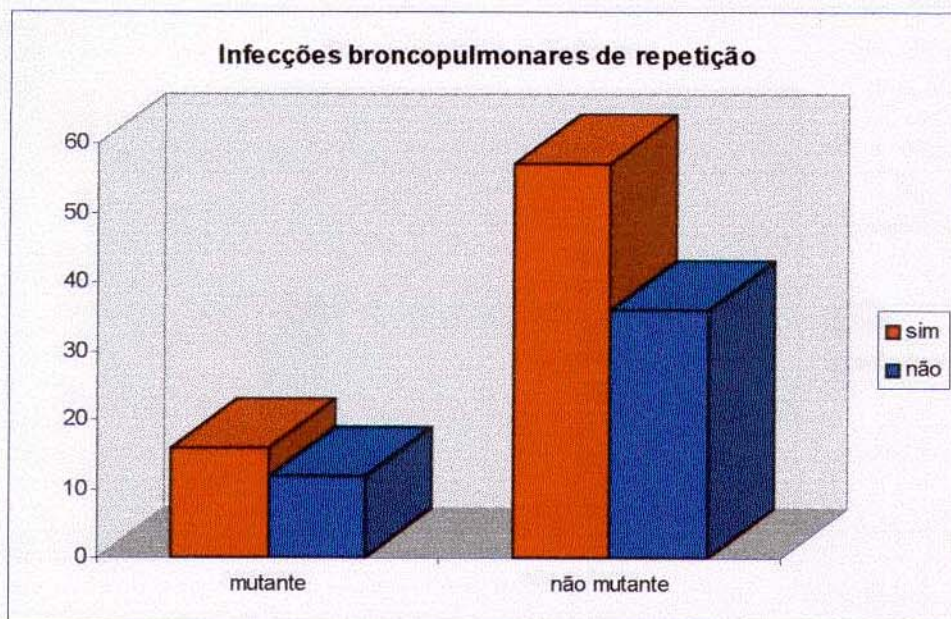


Figura 25- Presença de bronquectasia nas duas populações estudadas

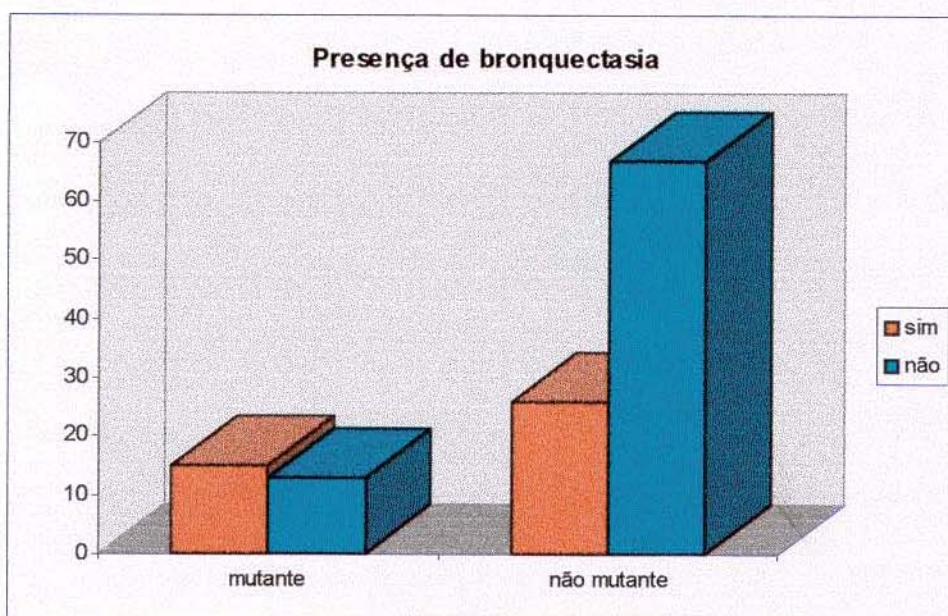
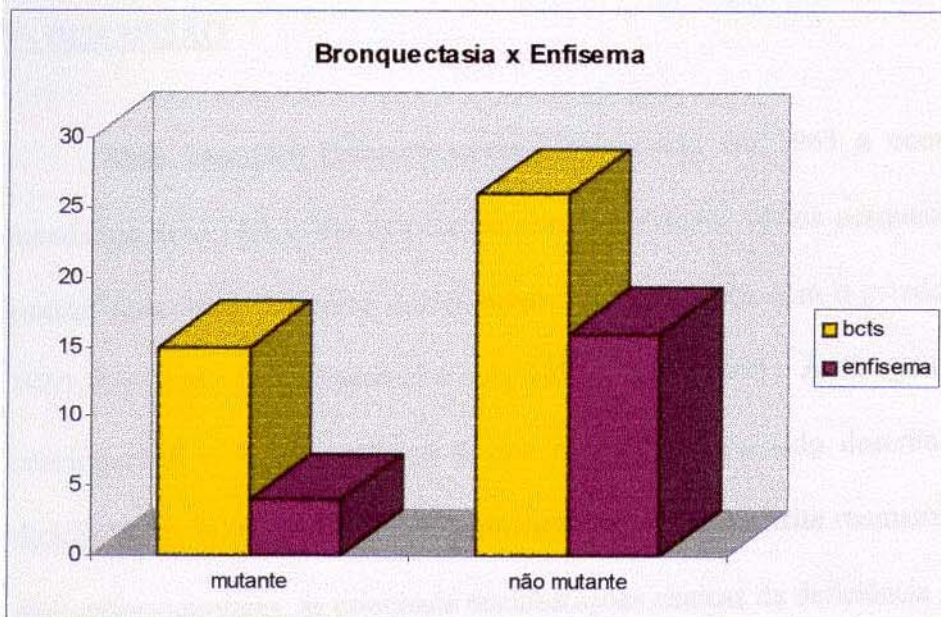


Figura 26- Presença de bronquectasia e enfisema nas duas populações estudadas



V- DISCUSSÃO

Após Laurell e Eriksson terem demonstrado em 1963 a ocorrência da deficiência hereditária de A1AT e sua associação com o enfisema, vários pesquisadores se dedicaram a estudar com maior interesse outras possíveis associações com o estado deficiente (Eriksson, 1965; Kueppers, 1974; Fagerhol e col., 1981; Crystal, 1991). Ao longo de todos estes anos de investigações, o que se observa é que embora tenham sido descritas associações entre a deficiência de A1AT e várias outras doenças tais como a artrite reumatóide, glomerulonefrite e alterações vasculares, as principais manifestações clínicas da deficiência grave (níveis inferiores a 11 μ M) de A1AT envolvem o pulmão e o fígado (Stoller, 1997). A doença hepática está relacionada principalmente com a hepatite neonatal e seu eventual desenvolvimento para cirrose hepática, anteriormente já comentados. Quanto ao comprometimento pulmonar, embora o enfisema seja considerado sua principal alteração, o grau de manifestações clínicas entre os deficientes é muito variável e este é um dado reconhecido há muito tempo (Eriksson, 1965; Tobin, 1985). Na literatura mundial são observados relatos de pessoas homozigotas ZZ que desenvolveram enfisema por volta dos 35 anos, algumas delas sem nunca terem fumado. Já outras, com o mesmo fenótipo ZZ, não apresentaram qualquer alteração pulmonar, mesmo em idade avançada (Stoller, 1997). Em relação a esse fato, atualmente, com a existência de uma variedade de técnicas de detecção de estados deficientes, é crescente a opinião de que o número de indivíduos deficientes assintomáticos é maior do que o de sintomáticos. Isto é, cada vez mais são encontradas pessoas com fenótipo ZZ e livres de sintomas (Larsson e col., 1978; Silverman e col., 1989; Eriksson, 1996). Mesmo entre os pacientes com comprometimento pulmonar estabelecido, o quadro clínico também é variável. Entretanto, observa-se uma

consistência na apresentação da alteração como um distúrbio ventilatório obstrutivo e, ao radiograma de tórax, a presença de enfisema principalmente em regiões basais (Gishen e col., 1982).

Infelizmente, grande parte dos trabalhos publicados na literatura internacional tratam unicamente de indivíduos com fenótipo ZZ. É certo que vários outros fenótipos também envolvem alterações clínicas, muitas vezes despercebidas, principalmente devido as diferentes metodologias empregadas para a triagem dos participantes das pesquisas. Assim é que, quando indivíduos PI MZ foram triados da população geral, não foi possível estabelecer uma associação entre esse fenótipo e a doença pulmonar (Bruce, 1984). Contudo, quando se partiu de um grupo de indivíduos portadores de DPOC, foi observado um aumento na prevalência do fenótipo MZ entre eles (Liebermann e col., 1986). Tobin e col. (1983) ao avaliarem a gravidade dos sinais clínicos em pacientes portadores de DPOC observaram que aqueles com fenótipo ZZ, MZ e SZ apresentavam maior comprometimento pulmonar do que os pacientes com fenótipo MM. Além disso, esses autores não puderam descartar uma possível influência exercida pelo fenótipo MS para o desenvolvimento das alterações pulmonares. Para Silvermann (1989) é provável que indivíduos PI MZ não fumantes apresentem alterações de elasticidade pulmonar, mas, geralmente não desenvolvam comprometimento suficiente a ponto de serem reconhecidos como portadores de doença clínica. Ou, talvez, dentro do grupo de pessoas com fenótipo MZ, exista um subgrupo de indivíduos mais propensos ao desenvolvimento de alterações pulmonares por conta de fatores familiares ainda desconhecidos.

Outro ponto importante a ser enfatizado é que embora os trabalhos realizados para a detecção de alterações pulmonares relacionadas com a deficiência de A1AT tenham se voltado

basicamente para o desenvolvimento de enfisema, cerca de 50% dos indivíduos deficientes apresentam sintomas de vias aéreas, principalmente a produção crônica de catarro (Tobin, 1983; Snider, 1989). Num estudo prospectivo realizado por Larsson (1978) ao longo de 14 anos, acompanhando 246 indivíduos PI ZZ, foi observado que 75% deles apresentavam DPOC, determinado em 59% dos casos por enfisema e, em 38% dos casos por bronquite crônica. Em 1983, Tobin e col., através da observação de 166 pacientes PI ZZ, encontraram que a maioria tinha enfisema, 29% apresentavam bronquite crônica sem serem fumantes e 11%, asma. Além desses trabalhos acima relatados, outros também apresentaram taxas elevadas de bronquite crônica e de asma entre os indivíduos PI ZZ (Tobin, 1983; Guest, 1992). Mesmo no trabalho de Eriksson (1965), mais da metade dos pacientes com deficiência de A1AT tinha bronquite crônica ou asma brônquica (Stoller, 1997).

Além disso, nos últimos anos têm surgido trabalhos que sugerem a associação entre a deficiência de A1AT e bronquectasia (Guest e col., 1992; Shin e col., 1993; Rodrigues e col., 1995; King e col., 1996). Entretanto, a determinação da prevalência de bronquectasia na deficiência de A1AT é difícil de ser realizada devido a deficiência ser relativamente pouco freqüente, o diagnóstico de bronquectasia muitas vezes passar despercebido por falta de técnicas diagnósticas mais eficientes tais como a tomografia computadorizada (CT) como também devido ao fato de muitos trabalhos publicados terem sido apenas relatos de casos (Scott e col., 1977; Longstreth e col., 1975; Casterline e col., 1978; Jones e col., 1985). Segundo Stoller (1997), as estimativas de prevalência de bronquectasia entre indivíduos PI ZZ variam de 2 a 43% e a associação entre as duas alterações não demonstra tanta consistência como a observada entre o estado deficiente e o enfisema.

Em nosso trabalho foi realizada a avaliação da prevalência das mutações S e Z do gene da A1AT em uma amostra de 121 pacientes portadores de sintomas respiratórios importantes (crônicos) atendidos nos ambulatórios da Disciplina de Pneumologia do FCM-Unicamp. Entre eles foram identificados 28 indivíduos portadores de, pelo menos, uma dessas mutações. Foi constatado nesse grupo de pacientes um aumento significativo da prevalência do grupo mutante ($p = 0,017$). Quando se realizou uma segunda análise (separando-se os grupos mutantes em grupo S e grupo Z) foi observado uma diferença ainda mais significativa em relação aos valores esperados dos dois grupos mutantes. Conforme podemos conferir na tabela 7, isso ocorreu principalmente devido o alelo S ter sido observado em nosso grupo de pacientes em um número superior ao dobro do valor esperado ($p < 0,001$). Um único paciente apresentou o genótipo SS. Para nossa surpresa, o alelo Z foi somente encontrado em quatro casos, sendo que em dois deles estava associado com o alelo S (SZ) e nos outros dois casos restantes o alelo Z estava associado com outra variante que não a S (*Z). Nenhum homozigoto Z (ZZ) foi detectado nesse grupo de pacientes.

Esta prevalência inusitada dos alelos mutantes nos pacientes avaliados nos levou à comparação das características de dois grupos de indivíduos, chamados a partir de agora de “mutantes” e “não mutantes”.

Analizamos várias características clínicas, laboratoriais e de diagnóstico por imagem, já especificadas em materiais e métodos, e pudemos observar alguns aspectos interessantes que serão discutidos a seguir.

Conforme podemos observar nas tabelas 11 à 31, as duas populações foram muito semelhantes no que diz respeito a sexo, raça, média de idade, sinais e sintomas (com exceção

de chiado) mais freqüentes, antecedentes e intensidade de tabagismo, valores de espirometria e gasometria arterial (anexo I, partes 1, 2 e 3).

As duas populações mostraram diferença significativa em relação aos níveis séricos de A1AT obtidos nesse trabalho pelo método de nefelometria. Entretanto, os resultados confirmam os relatos encontrados na literatura internacional (Cox, 1976). Como não foram encontrados indivíduos com genótipo ZZ, os níveis séricos inferiores ao normal somente foram constatados naqueles com o genótipo SZ. Por outro lado, em oito casos de pacientes sem qualquer uma das duas mutações foram observados níveis séricos superiores ao normal, sendo que em três desses casos foram detectados sinais radiológicos de bronquectasia (56,59,110) e nos demais casos havia história de infecções broncopulmonares de repetição (81,88,106,107,109). Nesse casos, os níveis elevados da proteína no soro podem ser justificados pelo fato de a A1AT ser uma proteína de fase aguda e, devido a isso, se elevar em situações de infecção tais como as observadas nesses oito pacientes (Kassimi e col., 1994).

Ao se analisar os resultados obtidos na dosagem enzimática, é possível se concluir que a concentração obtida pode, em certos casos, não refletir a concentração própria do genótipo que lhe é devido por conta de processos inflamatórios/infecciosos como também no curso de terapia com corticóides ou estrógenos e, com isso, confundir a análise dos resultados. Sendo assim, a concentração de A1AT deve ser utilizada como um adjuvante na análise clínica e nunca com um método definitivo de diagnóstico. Além disso, níveis séricos normais de A1AT não necessariamente significam uma atividade normal na inibição de elastase neutrofílica.

Estabelecendo-se quatro categorias de doença pulmonar (doença brônquica, doença parenquimatosa, doença brônquica e parenquimatosa e outras, determinadas no anexo I, parte 3) nota-se que os dois subgrupos são também semelhantes com relação a estas variáveis,

observando-se uma prevalência marcante de doença brônquica em ambos os grupos. Apenas quatro dos vinte e oito pacientes com mutação apresentaram imagens radiológicas (RX ou Tomo) sugestivas de enfisema (pacientes 2, 17, 18, 20) e todos eles traziam o alelo S sem o alelo Z. Desse grupo de quatro pacientes com enfisema, dois (17, 20), apresentavam também bronquectasia com sintomas brônquicos importantes, um deles inclusive necessitando de oxigenioterapia (20). Dos outros dois pacientes restantes nesse grupo de quatro com enfisema, um apresentava sinais de bronquite crônica (2) e o outro (18), além do alelo S da A1AT, tinha também fibrose cística.

No grupo de 93 pacientes sem as mutações investigadas, o enfisema foi observado em 16 casos (36, 37, 42, 57, 78, 80, 83, 85, 89, 90, 96, 102, 108, 114, 119, 120). Somente três destes pacientes eram não tabagistas (36, 42, 96). Em seis desses pacientes o enfisema estava associado com bronquectasia (36, 37, 42, 57, 80, 96). Dos demais pacientes com enfisema pertencentes ao grupo não mutante, 8 deles eram fumantes (83, 85, 89, 102, 108, 114, 119, 120) e 2 eram não fumantes (78, 90).

A comparação dos dois subgrupos de pacientes (mutantes e não mutantes) revelou duas diferenças de significância estatística que foi o achado de chiado e bronquectasias (tabelas 18 e 21), mais freqüentes nos mutantes do que nos não mutantes.

Dos quinze pacientes mutantes com bronquectasia, apenas quatro (5, 6, 22, 23) não puderam ser diagnosticados apenas por radiograma de tórax. Não foi possível realizar exame de tomografia de tórax em cinco dos pacientes mutantes (9, 12, 16, 19, 24). Quanto a esse fato, não podemos negar também a possibilidade de que o grupo de 26 pacientes não mutantes e portadores de bronquectasias pudesse ser acrescido de mais outros casos que eventualmente tenham passado despercebidos devido a falta da realização de um exame diagnóstico de maior

precisão como é o caso da tomografia de tórax. Infelizmente, por motivos da nossa realidade, não foi possível realizar esse exame em todos os pacientes investigados nesse trabalho.

É importante ressaltar que dos quinze pacientes portadores de bronquectasias no grupo mutante apenas dois apresentavam teste de suor alterado (8, 11) e dos outros 13 pacientes pertencentes a este grupo com bronquectasia nenhum deles tinha história de tuberculose, aspergilose ou outra alteração classicamente associada com o desenvolvimento de dilatações brônquicas. Dos 26 pacientes pertencentes ao grupo não mutante e que apresentavam bronquectasias, 3 pacientes tinham história de tuberculose (39, 50, 54); 1, diagnóstico de discinesia ciliar (57); quatro apresentavam teste de suor alterado (60, 76, 80, 116); e o último (96) apresentava seqüela de pneumonia estafilocócica.

Pelo que nos consta, todos os casos de bronquectasia associados com a deficiência de A1AT e relatados na literatura internacional foram de pacientes portadores de deficiência grave de A1AT (Guest e col., 1992; Shin e col., 1993; King e col., 1996). Em nosso trabalho a bronquectasia foi observada em 12 pacientes portadores somente do alelo S (*S), em um paciente portador de um alelo Z sem o alelo S, (*Z), em um paciente heterozigoto duplo (SZ) e finalmente, em um paciente homozigoto S (SS). Com exceção do heterozigoto composto (SZ) e do último paciente que não teve sua dosagem realizada, todos apresentavam níveis séricos de A1AT normais. Além disso, nos quatro casos em que foi observado enfisema, todos possuíam um alelo S sem o alelo Z (*S) e, em dois destes quatro pacientes havia a associação com bronquectasia. A bronquectasia em pacientes enfisematosos deficientes de A1AT foi descrita por alguns pesquisadores da área (Longstreth, 1975; Guest e col., 1992; Shin e col., 1993; King e col., 1996). Geralmente este enfisema era difuso porém, mais prevalente nos lobos inferiores. Em dois de nossos pacientes mutantes e portadores de bronquectasia e

enfisema as bolhas enfisematosas se encontravam principalmente nas bases em um caso (20) e, no outro (17) eram difusas. Porém, nos dois casos restantes, onde só se observava enfisema, as bolhas enfisematosas existiam principalmente nos ápices pulmonares (2,18).

Embora a maioria dos pesquisadores da área dêem maior evidência à associação entre a deficiência de A1AT e o enfisema, os resultados obtidos em nosso estudo nos levam a acreditar na possível associação entre essa deficiência e as alterações das vias aéreas. As frequências de chiado e de bronquectasia significativamente superiores entre o grupo de mutantes quando comparado com o de não mutantes nos leva a pensar em um maior comprometimento inflamatório das vias aéreas nos pacientes portadores das mutações investigadas dando ênfase à bronquectasia. Nesses casos é provável que a reação inflamatória se inicie na mucosa, em seguida, alcance a submucosa e, finalmente, o tecido de sustentação dos brônquios. A bronquectasia é uma alteração inflamatória com diferentes etiologias e que se caracteriza clinicamente pelo aumento na produção de catarro e por episódios frequentes de agudização infecciosa (Campbell, 1987). Sabe-se também, que as reações inflamatórias que acontecem no pulmão envolvem a liberação de proteases de serina, principalmente a elastase e a catepsina G. Vários trabalhos publicados na literatura internacional têm demonstrado a possibilidade da atuação da elastase no desenvolvimento das alterações das vias aéreas. Assim é que a elastase neutrofílica na sua forma ativa e seu inibidor (A1AT) inativado foram observados no lavado brônquico de pacientes com bronquectasias (Sepper e col., 1995). Também, foi observado que a elastase é capaz de induzir, em animais de laboratório, alterações semelhantes às encontradas em doenças inflamatórias das vias aéreas de humanos. Nesses animais foi observada a presença de hipersecreção mucosa caracterizada histologicamente pela metaplasia de células secretoras dos brônquios (Christensen e col., 1996). Além de determinar

o aumento da secreção das vias aéreas, a elastase pode também alterar a composição do muco e reduzir a frequência de batimentos dos cílios do epitélio respiratório (Amatini e col., 1991).

Em conjunto, todos esses fatores irão prejudicar o clearance mucociliar e resultar na colonização das pequenas vias aéreas por microorganismos, na inflamação destas vias aéreas e na limitação do fluxo aéreo (Tetley, 1993). Desse modo, a inflamação causa a liberação da elastase, que em excesso dentro das vias aéreas poderá levar à lesão epitelial e esta, por sua vez, leva à hipersecreção mucosa (metaplasia das células secretoras). A alteração do transporte ciliar mais o aumento da secreção levará ao acúmulo de secreção que favorecerá a colonização de bactérias e a manutenção de inflamação. Esse círculo vicioso sugerido por Peter Cole (1993) é observado em pacientes com bronquectasias e poderá ter a participação da ação múltipla da elastase quando se encontra livre para agir quer por deficiência de seu inibidor natural, quer por excesso de sua liberação pelos neutrófilos como ocorre em situações tais como as inflamatórias. Assim sendo, é provável que, do mesmo modo que as fibras de elastina das paredes alveolares estão comprometidas no desenvolvimento do enfisema, esse mesmo componente das paredes dos brônquios e bronquíolos esteja também alterado seja pela deficiência do inibidor de elastase (A1AT) ou pelo aumento da quantidade de elastase ativa no local da inflamação (Henson, 1987). Isso pode ser confirmado pelo trabalho realizado por Glasgow e colaboradores (1973) que apresentaram um paciente deficiente de A1AT cujo radiograma de tórax trazia dilatações bronquiais e bronquiolares. Esse mesmo achado foi confirmado na autópsia que demonstrou a lâmina elástica das paredes brônquicas deficiente e freqüentemente ausente. Além do trabalho citado acima, outros pesquisadores da área apresentaram achados semelhantes (Guest e col., 1992; Shin e col., 1993; King e col., 1996).

Entretanto, em nosso trabalho a bronquectasia foi observada em pacientes que, embora fossem portadores de mutação apresentavam níveis séricos dentro do limite da normalidade e, portanto, teoricamente localizados fora do grupo de risco para desenvolver alterações pulmonares. Desse modo, podemos nos perguntar sobre as possíveis causas de tão inusitado achado.

É provável que além dos papéis desempenhados pelo nível sérico da A1AT, pela presença da inflamação como fonte de elastase e de inativação da A1AT, bem como pela eventual participação de outras proteases presentes no pulmão, outros fatores (familiais e/ ou ambientais) realmente influenciem no surgimento da doença. Alguns destes fatores podem estar diretamente relacionados com a segregação do alelo S na população brasileira. Além disso, não podemos nos esquecer que não só o nível de A1AT presente no pulmão é importante na manutenção do equilíbrio entre o inibidor/elastase; também esse equilíbrio é dependente da atividade do inibidor (A1AT). Quanto a esse aspecto, foi demonstrado por Ogushi e col., (1988) que embora os homozigotos SS apresentem níveis séricos dentro do limite da normalidade, a proteína S apresenta no soro e no pulmão (ELF) atividade antielastase e taxa de associação com a elastase neutrofílica (Ka) inferiores à proteína M e superiores à proteína Z. No pulmão, a proteína S leva um período de tempo cinco vezes superior ao da proteína M para inibir igual quantidade de elastase neutrofílica. Talvez, esse grau de inabilidade que tem a proteína S para inativar a elastase no plasma ou no pulmão, repercuta de alguma forma e favoreça o surgimento de alterações como as encontradas em nosso grupo de pacientes.

Outro ponto importante a ser ressaltado é que há indícios de que o gene da elastase neutrofílica se expresse diferentemente entre as pessoas. O conteúdo de elastase por neutrófilo (1pg) varia de pessoa para pessoa em cerca de 2,5 vezes (Galdston e col., 1973). Nesse caso,

indivíduos que apresentam acentuação da expressão do gene da elastase neutrofílica terão maior chance de desenvolver alterações pulmonares, muito embora apresentem níveis normais de antiproteases nesse local.

Finalmente, não podemos esquecer também as diferenças étnicas existentes entre a nossa população e as populações freqüentemente referidas na literatura internacional cuja contribuição possa, talvez, favorecer o desenvolvimento da doença pulmonar em nossos pacientes.

VI- CONCLUSÕES

- 1a) Num grupo de 121 pacientes portadores de doença pulmonar crônica procedentes da cidade de Campinas e região foi observado um aumento significativo da prevalência dos genótipos que tinham pelo menos uma das duas mutações investigadas (S e/ou Z). Esse aumento foi causado principalmente pelos grupos cujo genótipo apresentava o alelo S sem o alelo Z.(SS e *S) ($p < 0,001$).
- 1b) Embora o alelo mutante Z esteja comprovadamente implicado no desenvolvimento de alterações pulmonares nas populações da Europa e Estados Unidos, em nossa população de pacientes com doença pulmonar crônica esse alelo somente demonstrou contribuição acima do valor esperado quando acompanhado do alelo S (SZ).
- 2) Em nossa população de pacientes com doença pulmonar crônica o desenvolvimento das alterações pulmonares não demonstrou estar diretamente relacionado com os níveis séricos de A1AT visto que, dos 121 pacientes investigados, somente dois deles apresentavam níveis séricos inferiores ao normal. Por outro lado, níveis séricos superiores ao normal foram observados em 8 pacientes não portadores das mutações investigadas, fato este justificado por se encontrarem em situações favoráveis à infecções.
- 3a) Com exceção de chiado, não há diferença significativa de sinais e sintomas entre os pacientes com doença pulmonar crônica pertencentes ao grupo com as mutações investigadas (S e/ouZ) e aqueles pertencentes ao grupo sem estas mutações.

- 3b) Embora o fumo e sua intensidade desempenhem papel importante no surgimento da doença pulmonar, não foi observada diferença significativa entre os dois grupos de pacientes (mutantes e não mutantes) a respeito dessa variável.
- 3c) Ao contrário do que se esperava, foi a bronquectasia e não o enfisema a principal alteração observada no grupo de pacientes com mutações. A bronquectasia estava presente em 53,57% desses pacientes e o enfisema, em apenas 14,28%.
- 3d) Mesmo nos casos em que comprovadamente havia comprometimento do parênquima pulmonar (enfisema), observou-se também o envolvimento das vias aéreas, visto que dos quatro pacientes que apresentavam enfisema, em três deles havia sinais de bronquite, um deles inclusive em oxigenioterapia.
- 3e) Comparando-se os dois grupos de pacientes (mutantes e não mutantes) quanto a presença de bronquectasia, foi observada uma diferença estatisticamente significativa ($0,01 < p < 0,02$). A bronquectasia era mais freqüente entre o grupo de mutantes do que entre os não mutantes.
- 3f) Embora discreta, é provável que a inabilidade da proteína S em inativar a elastase neutrofílica associada à sobrecarga de elastase oriunda do processo inflamatório bem como a fatores étnicos e/ou ambientais ainda não identificados permitam o

desenvolvimento de alterações pulmonares não necessariamente relacionados aos níveis séricos alcançados.

3g) É provável que a elastase neutrofílica, livre da ação de seu inibidor, possa agir não apenas sobre os elementos da matriz extracelular no parênquima pulmonar e determinar o enfisema, como também atuar do mesmo modo sobre as paredes dos bronquíolos e brônquios levando ao desenvolvimento de bronquiolite e bronquectasias.

VIII- ABSTRACT

Alpha-1-antitrypsin is a glycoprotein synthesized mainly in hepatocytes and consists of a folded polypeptide chain of 394 aminoacids with a 3 carbohydrate side chains. Its major physiologic role is to protect elastin fibers in the lung from attack by neutrophil elastase, a powerful serine protease. A1AT gene is pleomorphic, with 12,2 kb, 7 exons and 6 introns, located on chromosome 14 at q31-31.2 and codominantly expressed.

Most of the alleles are associated with normal serum levels (20-53 uM) and functional protein. Among the deficiency alleles there are the S and Z alleles that reach polymorphic frequencies in many populations. Severe A1AT deficiency in serum (< 11 uM) results in a diminished elastase/antielastase balance in lower respiratory tract and can result in emphysema due to elastin fibers degradation. In addition to this, some forms of A1AT deficiency can also result in the development of liver disease.

The aim of our study was to evaluate the prevalence of S and Z mutant alleles, the serum levels, as well as the clinical aspects associated with each mutation in a group of 121 Brazilian patients with chronic pulmonary symptoms

One hundred and twenty one patients with chronic pulmonary symptoms attending the ambulatory of pulmonary diseases at the hospital of the State University of Campinas (Unicamp) were studied. Most of them had a history of smoking. The population included 71 men and 50 women with an average age of 53 years (range, 16-79 years). The evaluation included clinical symptoms, chest films, CT scans of lungs, spirometry and arterial blood gases at rest. All of them were investigated for S and Z A1AT gene mutation using a polymerase chain reaction mediated mutagenesis that created restriction enzymes sites recognized by XmnI (S mutation) and TaqI (Z mutation) enzymes. The resulting product from the amplification of a exon III region (S allele) had 149 base pairs and the other one from the exon V region (Z allele) had 97 base pairs. After the PCR product digestion the samples were tested in polyacrilamide gel electrophoresis (16%) at 120 volts. Following this, the gel was stained with ethidium bromide in order to visualize a mutant Z allele when the fragment had 86 base pairs and the normal one, 64bp. For the S allele investigation, the normal allele had 111 base pairs and the mutant one, 133. The evaluation of serum A1AT levels were measured by nephelometry.

Among a group of 121 patients, 28 were found to have at least one of the two A1AT mutations (S and/or Z). In this group, twenty three patients had one S allele, the other one being any other allele different from the Z allele(*S). Of the 23 patients with a S allele, 12 had bronchiectasis (7 non smokers, 5 smokers or ex-smokers), two of them with altered sweat chloride levels. Among the 12 patients with bronchiectasis two heavy smokers patients also had emphysema, one of them on long term oxygen therapy. Besides the 12 patients with bronchiectasis we also could find in the group of 23 with a S allele: two patients with CT findings of bronchiolite; two with emphysema and important symptoms and signs of airways disease like haemoptysis or severe COPD; 5 patients had signs of chronic bronchitis; one patient died of silicosis at the age of 38; one patient had bronchial hyperreactivity and a normal X Ray.

Of the last five patients in the group of 28 with S and/or Z allele we found two compound heterozygote (SZ). Both were heavy smokers, one of them had chronic bronchitis and was on long term oxygen therapy. The other one had a history of chronic pulmonary

infection and bronchiectasis. Another two patients had a Z allele but no S allele. One of them with widespread bronchiectasis and the other one, COPD. The only patient in this group of 28 who had two S alleles was a 58 years old white male, who had smoked for 30 years and stopped smoking 25 years ago. He had frequent episodes of wheezing, hiperinflation on X-ray, and bronchiectasis in the left lung. Besides that, he required sinus surgery as a treatment for chronic polypoid sinusitis.

Regarding alpha-1-antitrypsin serum levels, only the compound heterozygote patients (SZ) had serum levels under the normal limit. Serum levels above the upper limit of normality were found in eight patients without mutations, all of them with history of bronchiectasis and/or bronchopulmonary infections.

Except for the symptom of wheezing, mutants and non-mutants were found to be very similar regarding aspects such as: age, gender, race, presence of cough, phlegm production, dispnoea, smoking history, repeated episodes of bronchopulmonary infections, spirometry. However, one striking finding was the significantly increased bronchiectasis prevalence in the group of patients with mutations ($p < 0,01$).

In non mutant group, signs of bronchiectasis occurred in 26 patients (26,88%), three with a history of tuberculosis, one with primary ciliary dyskinesia, four with altered sweat chloride tests and the last one with lesions due to stafilococcus pulmonary infections. Of the 15 patients (53,57%) carrying A1AT gene mutation, only two had altered sweat chloride test.

Besides that, the two populations were different regarding A1AT serum levels mostly due to the eight patients without mutations and high serum levels. This finding is explained by the fact that A1AT is a acute phase protein and its serum level rises in case of inflammation or infection.

The mutant group showed a significative increase of the prevalence among our group of 121 patients mostly due to the S allele ($p < 0,001$).

With the results of our study we could suggest that bronchiectasis may be a component of the alterations related to A1AT deficiency. Besides that, it is possible that uninhibited neutrophil elastase as well as familial/ambiente and ethnic factors do have a important contribution to the development of pulmonary alterations found in this population of patients with chronic pulmonary symptoms.

VIII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, E.D. Opportunities for the use of aerosolized A1AT for the treatment of cystic fibrosis. **Chest** **110**: 256S-260S, 1996.
- ALPHA-1-ANTITRYPSIN DEFICIENCY REGISTRY STUDY GROUP. A registry of patients with severe deficiency of alpha-1-antitrypsin. **Chest** **106**: 1223-32, 1994.
- ALTON, E. W. F; GEDDES, DUNCAN. Gene therapy for respiratory diseases: potential applications and difficulties. **Thorax** **50**: 484- 485, 1995.
- AMATINI, R; WILSON, R; RUTMAN, A; READ, R; WARD, C; BURNETT, D. Effects of human neutrophil elastase and Pseudomonas aeruginosa proteinases on human respiratory epithelium. **Cell Mol. Biol.** **4**: 26-32, 1991.
- AMERICAN THORACIC SOCIETY. Guidelines for the approach to the patient with severe hereditary A1AT deficiency. **Am. Ver. Respir. Dis.** **140**: 1494-97, 1989.
- ANDRESEN, B. S; KNUDSEN, I; JENSEN, P. K. A; GREGERSEN, N. Two novel nonradioactive polymerase chain reaction-based assays of dried blood spots genomic DNA or whole cells for fast, reliable detection of Z and S mutations in the Alpha-1-antitrypsin gene. **Clin Chem** **38**: 2100, 1992.
- BARRETT, A J. An introduction to proteases. In: BARRETT A.J, SALVESEN G. (eds). Proteases inhibitors. Elsevier, New York pp 1-22, 1986.
- BENKMANN, H.G; HANSSEN, H. P; OVENBECK, R; GOEDDE, H. W. Distribution of alpha-1-antitrypsin and haptoglobin phenotypes in bladder cancer patients. **Hum Hered** **37**: 290, 1987.
- BIETH, J. G. Elastases: catalytic and biologic properties. In: MECHAM R. (ed) Region Of matrix accumulation. New York: Academic Press, New York pp 217-320, 1986.
- BILLINGSLEY, G. D; COX, D. W. Functional assessment of genetic variants of alpha-1-antitrypsin. **Hum Genet** **61**: 118, 1982.

- BILLINGSLEY, G. D; WALTER, M. A; HAMMOND, G. L; COX, D. W. Physical mapping of four serpin genes: alpha-1-antitrypsin, alpha-1-antiquimotrypsin, corticosteroid binding globulin and protein C inhibitor, within a 280 kb region on chromosome 14q 32.1. **Am J Hum Genet** **52**: 343, 1993.
- BOLLEN, A; HORIAN, R; HERZOG, A. Expression of human A1AT in E. coli. **FEBS Lett** **166**: 67-70, 1984.
- BONNEY, J; ASHE, B; MAYOCK, P. Pharmacologic profile of the substituted beta lactam, a member of a new class of human PMN elastase inhibitors. **J Cell Biochem** **39**: 47-53, 1989.
- BOROK, Z; BUHL R; GRUMES G.J. Effect of glutathione aerosol on oxidant-antioxidant imbalance in idiopathic pulmonary fibrosis. **Lancet** **338**: 215-16, 1991.
- BRANTLY, M; COURTNEY, M. L. M; CRYSTAL, R. G. Repair of the secretion defect in the Z form of Alpha-1-antitrypsin by addition of a second mutation. **Science (Wash. DC)** **242**: 1700-1702, 1988.
- BRANTLY, M; NUKIWA, T; CRYSTAL, R. G. Molecular basis of alpha-1-antitrypsin deficiency. **Am J Med** **84**: 13, 1988.
- BREIT, S. N; CLARK, P; PENNY, R. The role of Alpha-1-antitrypsin deficiency in the pathogenesis of immune disorders. **Clin Immun Immunop** **35**: 363, 1985.
- BREWERTON, D. A; WEBLEY, M; MURPHY, A H; MILFORD, A M. The alpha-1-antitrypsin phenotype MZ in acute anterior uveitis. **Lancet** **1**: 1103, 1978
- BRUCE, R. M ; COHEN, B. H; DIAMOND, E. L; LEBOWITZ, M. D; TOCKMAN, M. S. Collaborative study to assess risk of lung disease in PI MZ phenotype subjects. **Am Rev Resp Dis** **130**: 386, 1984.
- BUHL, R; MEYER, A; VOGELMEIER, C. Oxidant-protease interaction in the lung. **Chest** **110**: 267S-272S, 1996.
- BUISSERET, P. D; PEMBREY, M. E; LESSOF, M. H- Alpha-1-antitrypsin phenotypes in rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. **Lancet** **2**: 1358, 1977.

BYTH, B. C; COX, D. W. A (CA)_n repeat at the 5'end of the alpha-1-antitrypsin gene. **Hum Mol Genet 2**: 1752, 1993.

BYTH, B. C; BILLINGSLEY, G. D; COX, D. W. Physical and genetic mapping of the serpin gene cluster at 14q32.1: Allelic association and a unique haplotype associated with alpha-1-antitrypsin deficiency. **Am. J. Hum. Genet. 55**: 126-133, 1994.

CAMPBELL, E. J; SENIOR, R. M; WELGIS, H. G. Extra cellular matrix injury during lung inflammation. **Chest 92**: 161-167, 1987.

CANONICO, A E; CONARY, J. T; MEIRICK, B. R. Aerosol and intravenous transfect of human alpha-1-antitrypsin gene to lungs of rabbits. **Am. J Respir Cell Mol Biol 10**: 24-9, 1994.

CARLSON, J. A; ROGERS, R. B; SIFERS, R. Accumulation of PI Z Antitrypsin causes liver damage in transgenic mice. **J. Clin. Invest. 83**: 1183-1190, 1989.

CARREL, R. W. Alpha-1-antitrypsin: molecular pathology, leukocytes and tissue damage. **J. Clin. Invest. 78**: 1427-1431, 1986.

CARREL, R. W; AULAK, H. S; OWEN, M. C. Molecular pathology of the serpins. **Mol Biol Med 6**: 35- 42, 1989.

CASOLARO, M. A; FELLIS, G; WEWERS, M. Augmentation of lung antineutrophil elastase capacity with recombinant human A1AT. **J. Appl. Physiolol. 63**: 2015-23, 1987.

CASTERLINE, C. L; EVAN, R; BATTISTA, V. C; TALAMO, R. C. Selective IgA deficiency and PI ZZ-antitrypsin deficiency: association with recurrent sinopulmonary infections, emphysema and bronchiectasis. **Chest 73**: 885-886, 1978.

CHRISTENSEN, T. G; ALONSO, P. S. Immunocytochemical evidence for extra-cellular initiation of elastase-induced bronchial secretory cell metaplasia in hamsters. **Eur Respir J 9**: 535-541, 1996.

CILIBERTO, G; DENTE, L; CORTESE, R. Cell specific expression of transfected human alpha-1-antitrypsin gene. **Cell 4**: 531, 1985.

- COHEN, J. R; SARFATI, I; RATNER L; TILSON, D. Alpha-1-antitrypsin phenotypes in patients with abdominal aortic aneurysms. **J Sur Res** **49**: 319,1990.
- COLE, P; FLOWER, C. D. R; LAVENDER, J. P. Clinical and imaging aspects of bronchiectasis. In: CHEN, P; GRAINGER, R. G; GREENE, R (eds). Pulmonary radiology: The Fleischner Society. Saunders, Philadelphia pp 242-258, 1993.
- COLLIER, I. E; SMITH, J; KRONBERG, A; EISEN, A Z; GOLDBERG, G. I. The structure of the human skin fibroblast collagenase gene. **J Biol Chem** **263**: 10711,1988.
- COLP, C; PAPPAS, J; MORAN, D. Variants of alpha-1-antitrypsin in puerto rican children with asthma. **Chest** **103**: 812-815, 1993.
- COURTNEY, M; JALLAT, A; TESSIER, L; ENAVENT, A; CRYSTAL, R. G; LE COC, J. P. Synthesis in E. Coli of alpha -1- antitrypsin variants with potential in the therapy of emphysema and thrombosis. **Nature (Lond)** **313**: 149-151,1985.
- COX, D. W; HOEPPNER, V; LEVISSON, H. Proteases inhibitors in patients with chronic obstructive pulmonary disease: the alpha-1-antitrypsin heterozygote controversy. **Am Rev Resp Dis** **113**: 601, 1976.
- COX, D. W; TALAMO, R. C. Genetic aspect of pediatric lung disease. **Pediatr Clin North Am.** **26**: 467, 1979.
- COX, D. W. New variants of Alpha-1-antitrypsin: Comparison of PI typing techniques. **Am J Hum Genet** **33**: 354, 1981.
- COX, D. W; WOO, S. L; MANSFIELD, T. DNA restriction fragments associated with alpha-1-antitrypsin indicate a single origen of deficiency allele PI Z. **Nature** **316**: 79, 1985.
- COX, D. W- Alpha-1-antitrypsin deficiency. In: the Metabolic Basis of inherited disease. In: SCRIVER, C. R; BEAUDET, A L; SLY, W. S; VALLE, D (eds). The Metabolic Basis of Inherited Disease, 6th Mc Graw-Hill Book Co., New York. 2409-2437, 1989.

- COX, D. W- Alpha-1-antitrypsin deficiency. In: the Metabolic Basis of inherited disease. In: SCRIVER, C. R; BEAUDET, A L; SLY, W. S; VALLE, D (eds). The Metabolic Basis of Inherited Disease, 7th Mc Graw-Hill Book Co., New York pp 4125-4158, 1995.
- CROWLEY, J. J; SHARP, H. L; FREVER, E. Fatal liver disease associated with A1AT deficiency PI M1 PI Mduarte. **Gastroenterology** **93**: 342-44, 1987.
- CRYSTAL, R. G; BRANTLY, M. L; CURIEL, D. T. The A1AT gene and its mutations. **Chest** **95**: 196-208, 1989.
- CRYSTAL, R. G. Alpha -1- antitrypsin deficiency, emphysema and liver disease: genetic basis and strategies for therapy. **J Clin Invest** **85**: 1343-1352, 1990.
- CRYSTAL, R. G; FERRANS, V. J; BASSET, F. Biologic basis of pulmonary fibrosis. In: CRYSTAL, R. G; WEST, J. B; BARNES, P. J; CHERNIACK, S (eds). The lung: Scientific foundations, first edition Raven Press, New York pp 2031-46, 1991.
- CRYSTAL, R. G. Proteases and antiproteases. In: CRYSTAL, R. G; WEST, J. B; BARNES, P. J; CHERNIACK, S (eds). The lung: Scientific foundations, second edition Raven Press, New York pp 1763-2071, 1993.
- CURIEL, D; BRANTLY, M; CURIEL, E; CRYSTAL, R. G. Alpha-1-antitrypsin deficiency caused by the alpha-1-antitrypsin Nullmattawa gene. An insertion mutation rendering the alpha-1-antitrypsin gene incapable of producing alpha-1-antitrypsin. **J. Clin Invest** **83**: 1144, 1989.
- CURIEL, D. T; CRYSTAL, R. G. Molecular basis of alpha-1-antitrypsin deficiency and emphysema associated with alpha-1-antitrypsin mineral springs allele. **Mol cell Biol** **10**: 47-56, 1990.
- ELZOUKI, A N. Y; SEGELMARK, M. Strong link between the alpha-1-antitrypsin PI Z allele and Wegner's granulomatosis. **J. Intern. Med.** **236**: 543-48, 1994.
- ERIKSSON S. Studies in Alpha-1-antitrypsin deficiency. **Acta Med Scand (Suppl)** **432**: 5, 1965.
- ERIKSSON, S; CARLSON, S. Risk of cirrhosis and primary liver cancer in A1AT deficiency. **N. Engl J. Med.** **314**: 736-39, 1986.

- ERIKSSON, S. A 30 year perspective on alpha-1-antitrypsin deficiency. **Chest 110:** 237S-242S, 1996.
- EVANS, H. E; LEVI, M; MANDL, I. Serum enzyme inhibitor concentrations in the respiratory distress syndrome. **Am Rev Resp Dis 101:** 359,1970.
- FABBRETTI, G; SERGI, C; GONSALES, G; FAA, G; BRISIGOTTI, M; ROMEO, R; CALLEA, C. Genetic variants of alpha-1-antitrypsin. **Liver 12:** 296-301, 1992.
- FAGERHOL, M. K AND TENJFORD, W. Serum PI types in some European, American, Asian and African populations. **Acta Pathol. Microbiol. Scand., 72:** 601-608, 1968.
- FAGERHOL, M. K; COX, D. W. The PI Polimorphism : genetic, biochemical and clinical aspects of human alpha-1-antitrypsin. In: HARRIS H, HIRCHORN, K (eds). Hum Genet Vol. 11, Plenum, New York p. 1, 1981.
- FETARKIS, A; SOURAPAS, A; ANGELOPAULOS, B. PI phenotypes in greeks. **Hum Hered 24:** 313- 316, 1974.
- GADEK, J. E; FULMER, J. D; CRYSTAL, R. G. Danazol induced augmentation of serum alpha-1-antitrypsin levels in individual with marked deficiency of this antiproteases. **J Clin Invest 66:** 82-87, 1980.
- GADEK, J; CRYSTAL, R. G. Antielastases of the human alveolar structures: implications for the protease-antiprotease theory of emphysema. **J. Clin. Invest. 68:** 889-898, 1982.
- GADEK, J. E; PATCHT, E. R. Pathogenesis of hereditary emphisema and replacement therapy for alpha-1-antitrypsin deficiency. **Chest 110:** 248S-250S, 1996.
- GARTNER, J. C. Orthotopic liver transplantation in children: two-years experience with 47 patients. **Pediatrics, 74:**140-145, 1984.
- GARVER, R. I; COURTNEY, M; CRYSTAL, R. G. Clonal gene therapy: transplanted mouse fibroblast clones express human alpha-1-antitrypsin in vivo. **Science(Wash. DC) 237:** 762-764, 1987.

- GILLISEN, A; BIRRER, P; BUHL, R. Recombinant secretory leukoprotease inhibitor augments glutathione level in respiratory epithelial lining fluid. **J. Appl. Physiol.** **75**: 825-32, 1993.
- GISHEN, P; SAUNDERS, A; TOBIN, L. Alpha-1-antitrypsin deficiency: the radiological features of pulmonary emphysema in subjects of Pi type Z and PI type SZ a survey by the British thoracic association. **Clinical Radiology.** **33**: 371-377, 1982.
- GLASGOW, J. F; LYNCH, H; HEREZ, M. J. Alpha-1-antitrypsin deficiency in association with both cirrhosis and COPD in two siblings. **Am. J. of Medicine** **54**: 181-194, 1973.
- GRAHAM, A; KARSHEKER, N. A; NEWTON, C. R. Molecular characterisation of three alpha-1-antitrypsin deficiency variants proteinase inhibitor (PI) nullcardiff (Asp²⁵⁶→Val): PI M_{malton} (Phe⁵¹→deletion) and PI I (arg³⁹→cys). **Hum. Genet** **84**: 55-8, 1989.
- GUEST, P. J; HANSELL, M. High resolution computed tomography (HCRT) in emphysema associated with alpha-1-antitrypsin deficient. **Clinical Radiology** **45**: 260-266, 1992.
- HENSON, P. M; JOHNSTON, R. B. Tissue injury in inflammation oxidants, proteinases and cationic proteins. **J. Clin. Invest.** **79**: 669-74, 1987.
- HOFKER, M. H; NUKIWA, T; CRYSTAL, R. G. A pro- leu substitution in codon 369 in Alpha-1-antitrypsin deficiency variant PI M heerlen. **Hum Genet** **81**: 264-268, 1989.
- HOHN, P. A; POPESCU. N. C; HANSON, R. D; LEY, H. Genomic organization and chromosomal localization of the human cathepsin G gene. **J Biol Chem** **264**: 13412-13419, 1989.
- HUBBARD, R. C; CRYSTAL, R. G- Alpha-1-antitrypsin augmentation therapy for alpha-1-antitrypsin deficiency. **Am. J. Med.** **84**: 52-62, 1988.

- HUBBARD, R. C; MCELVANEY, N. G; CRYSTAL, R. G. Recombinant DNA produced Alpha-1-antitrypsin administered by aerosol augments lower respiratory tract antineutrophil elastase defenses in individuals with alpha-1-antitrypsin deficiency. **J. Clin. Invest.** **84**: 1349-1354, 1989.
- HUBBER, R; CARREL, R. W. Implication of the three dimensional structure of alpha-1-antitrypsin for structure and function of serpin. **Biochemistry** **28**: 8953-66, 1989.
- HUMBERT, P; FAIVRE, B; AGACHE, P. Use of anticollagenase properties of doxycycli in treatment of alpha-1-antitrypsin deficiency. **Acta Derm Venereol (Stocol)** **71**: 189,1991.
- HUNNINGHAKE, G. W; GADEK, J. E. Inflammatory and immune process in the human lung in health and disease: evaluation by bronchoalveolar lavage. **Am. J. Pathol.** **97**: 149-206, 1979.
- JANOFF, S. Elastases and emphysema: current assessment of the protease antiprotease hypothesis. **Am. Rev. Resp. Dis.** **132**: 417-433, 1985.
- JEPPSSON, J. O; LAURELL, C. B; FAGERHOL, M. K. Properties of isolated Alpha-1-antitrypsin of PI types M, S and Z. **Eur J Biochem** **83**: 143, 1978.
- JOHNSON, D; TRAVIS, J. The oxidative inactivation of human alpha-1- preteinase further evidence for methionine at thereactive center. **J Biol Chem** **254**: 4022-4026, 1979.
- JONES, D. K; GODDEN, D; CAVANAGH, P. Alpha-1-antitrypsyn deficiency presenting as bronchiectasis. **Br. J. Dis. Chest** **79**: 301-4, 1985
- JUNGEND, R. M. *Alfa-1-antitripsina- uma visão geral, aspectos fisiológicos, bioquímicos e genéticos*. Tese de Mestrado, Instituto de Biologia, Curitiba, UFPR, Curitiba, Paraná, 84p, 1980.
- KASSIMI, E. L; WARSY, A S; PULAI, D. K. Alpha-1-antitrypsin and serum levels in widespread bronchiectasis. **Respir. Med.** **83**: 119-21, 1989.
- KIDD, V. J; WALLACE, R. B; ITAKURA, K; WOO, S. L. C- Alpha-1-antitrypsin deficiency detection by direct analysis of the mutation in the gene. **Nature** **304**: 230,1983.

- KING, M. A; STONE, J. A; MUELLER, C. F; GADEK, J. E. Alpha-1-antitrypsin deficiency. Evaluation of bronchiectasis with CT. **Radiology** **199(1)**: 137-41,1996.
- KLASEN, E. D; BOS, A ; SIMMELINK, H. D. PI (alpha-1-antitrypsin) subtypes: Frequency of PI M4 in several populations. **Hum Genet** **62**: 139,1982.
- KNOELL, D. L; PHARM, D; WEWERS, M. D. Clinical implications of gene therapy for alpha-1-antitrypsin deficiency. **Chest** **107**: 535-45, 1995.
- KRAMPS, J. A; BAKKER, W; DIJKIMAN, J. H. A matched pair study of the leukocyte elastase like activity in normal persons and in emphysematous patients with and without alpha-1-antitrypsin deficiency. **Am Rev Resp Dis** **121**: 253, 1980.
- KUEPPERS, F; BLACK, L. F. Alpha-1-antitrypsin and its deficiency. **Am Rev Resp Dis**. **110**: 176, 1974.
- LARSSON, C. Natural history and life expectancy in severe alpha-1-antitrypsin deficiency PI Z. **Acta Med. Scand.** **204**: 345-51, 1978.
- LAURELL, C. B; ERIKSSON, S. The electrophoretic alpha-1-globulin pattern of serum in Alpha-1-antitrypsin deficiency. **Scand. J. Clin. Lab. Invest.** **15**: 132-140,1963.
- LAURELL, C. B. Quantitative estimations of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. **Anal Biochem** **15**: 45,1966.
- LAURELL, C. B; KULLANDER, S; THORELL, J. Effect of administration of a combined strogen-progestin contraceptive on the level of individual plasma proteins. **Scand J Clin Lab Invest** **21**: 337, 1968.
- LEMARCHAND, P; JONES, M; YAMADA, I. In vivo gene transfer and expression in normal uninjured blood vessels using replication recombinant adenovirus vectors. **Circ Res** **72**: 1132-38,1993.

- LIEBERMAN, C; DIRKSEN, H; SUNDSTRON, G; ERIKSSON, S. Lung functions studies in assymptomatic individuals with moderately (PI SZ) and severely (PI Z) reduced levels of alpha-1-antitrypsin. **Scand J Respir Dis** **57**: 267-80, 1976.
- LI Q; M.A KAI; FINEGOLD, M. Assessment of recombinant adenoviral vectors for hepatic gene therapy. **Hum Gene Ther** **4**: 403-09, 1993.
- LOEBERMANN, H; TOKUOKA, R; DEISENHOFER, J; HUBER, R. Human alpha -1 proteinase inhibitor. **J. Mol. Biol.** **177**: 531-556, 1984.
- LONGSTRETH, G. F; WEITZMAN, S. A; BROWNING, R. J; LIEBERMAN, J. Bronchiectasis and homoizgous alpha-1-antitrypsin deficiency. **Chest** **67**: 233-235, 1975.
- MANCINI, G; CARBONARA, O; HEREMAN, J. E. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion . **Immunochemistry** **2**: 235, 1965.
- MARTIN, J. Further examples confirming the existence of PI Null (PI-). **Pathol Biol (Paris)** **23**: 521-524, 1975.
- MATSUNAGA, E; SHIOKAWA, S; NAKAMURA, N; FUKUMAKI, U. Molecular analysis of the gene of the alpha-1-antitrypsin deficiency Mnichinan. **Am J Hum Genet** **46**: 602, 1990.
- MAUNE, S; RATH, N. F; GOROGH, T; STEINERT, R. Genetic disposition to chronic polypoid sinusitis and alpha-1- proteinase inhibitor deficiency types. **HNO** **43(9)**: 537-9,1985.
- MCELVANY, N. G; NAKAMURA, H; BIRRES, P. Areosol alpha-1-antitrypsin treatment for cystic fibrosis. **Lancet** **337**: 392- 394, 1991.
- MEYER, A; RUHL, R; MAGNUSSEN, H. The effect of oral N-acetylcysteine on lung glutathione levels in idiopatic pulmonary fibrosis. **Eur. Resp J** **7**: 431- 436, 1994.
- MILFORD, A; PICKERING, J. D; SHORTLAND, J. R. The renal manifestation of PI Z. In: J P MARTIN (ed): L'Alpha-1-antitrypsin et le systeme PI. Paris, INSERM, p. 131, 1975.

- MORNEX, J. F; CHYTIL, A; WEIR, A; CRYSTAL, R. G. Expression of the alpha-1-antitrypsin gene in mononuclear phagocytes of normal and alpha-1-antitrypsin deficient individuals. **J. Clin. Invest.** **77**: 1952-1961,1986.
- MOROZ, S. P; CUTZ, E; BALFE, W; SASS-KORTSA, R. Membranoproliferative Glomerulonephritis in childhood cirrosis associated with alpha-1-antitrypsin deficiency. **Pediatrics** **57**: 232, 1976.
- MOROZ, S. P; CUTZ, E ; COX, D. W. Liver disease associated with alpha-1-antitrypsin deficiency in childhood. **J Pediatr** **88**: 19, 1986.
- MULLIGAN, R. C. The basic science of gene therapy. **Science** **260**: 926-32, 1993.
- NABEL, E. G; PLAUTZ, G; NAVE, G. Site specific gene expression in vivo by direct gene transfer in to the arterial wall. **Science** **249**: 1285-88,1990.
- NUKIWA, T; BRANTLY, M; OGUSHI, F; CRYSTAL, R. G. Characterization of the M1(ala 213) type of alpha-1-antitrypsin, a newly recognized common normal alpha-1-antitrypsin haplotype . **Biochemistry** **26**: 5259, 1987.
- OGUSHI, F; FELS, G. A; HUBBARD, R. C; STRAUS, S; CRYSTAL, R. G. Z-type alpha-1-antitrypsin is less competent than M1 type alpha-1-antitrypsin as an inhibitor of neutrophil elastase. **J.Clin Invest** **80**: 1366-1374, 1987.
- OGUSHI, T; HUBBARD, R. C; GERALD, T; BRANTLY, M. L; CRYSTAL, R. G. Evaluation of the S- type of alpha-1-antitrypsin as an in vivo and in vitro inhibitor of neutrophil elastase. **Am. Ver. Respir. Dis.** **137**: 364- 370, 1988.
- OWEN, M. C; BIENNAN, S. O; LEWIS, J. Mutation of antitrypsin to antithrombin: alpha-1-antitrypsin Pittsburgh (358-met-arg), a fatal bleeding disorder. **N Engl J Med**: **309**: 694-698, 1983.
- PAGGOTO, R. C. *Polimorfismo da Alfa-1-antitripsina humana em populações brasileiras*. Tese de Mestrado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, SP-Brasil, 1993.
- PERLINO, E; CORTESE, R; CILIBERTO, G. The human alpha-1-antitrypsin gene is transcribed from two different promoters in macrophages and hepatocytes. **EMBO J** **6**: 2767-2771, 1987.

- PERLMUTTER, D. H; DANIELS, J. D; ALPERS, H. The alpha-1-antitrypsin gene is expressed in a human intestinal epithelial cell line. **J. Biol Chem** **264** : 9485, 1989.
- PERLMUTTER, D. H; JOSTIN, G; NELSON, P. Endocytosis and degradation of alpha-1-antitrypsin proteases complexes is mediated by the serpin-enzyme complex (SEC) receptor. **J Biol Chem.****265**: 16713-16716, 1990.
- PITTELKON, M. R; SMITH, K; SU, W. P. D. Alpha-1-antitrypsin deficiency and panniculitis: Perspectives on diseases relationship and replacement therapy. **Am J Med** **84 (Suppl 6A)**: 80, 1988.
- POTTAGE, J. C; TRENHOLM, G. M; ARONSON, J. K; HARRIS, R. Panniculitis associated with histoplasmosis and alpha-1-antitrypsin deficiency. **Am J Med** **75**: 150, 1983.
- POWERS, J. C; HARPER, J. W. Inhibitors of serine proteinases. In: BARRET, J; SALVESEN, G. (eds). Preoteinase inhibitors, second edition Elsevier, New York pp 55- 152, 1986.
- PROPST, T; PROPST, A; JUDMAIER, G; VOGEL, W. High prevalence of viral infection in adults with homozygous and heterozygous with alpha-1-antitrypsin deficiency and chronic liver disease. **Ann Intern Med** **117**: 641, 1992.
- ROSENFELD, M. A; YOSHIMURA, K. Adenovirus mediated transfer of a recombinant alpha-1-antirypsin gene to the lung epithelium in vivo. **Science** **252**: 431,1991.
- RENNARD, S. I; GHAFOURI, M; THOMPSON, A B. Fractional processing of sequential bronchoalveolar lavage to separate bronchial and alveolar samples. **Am Rev Respir Dis** **141**: 208-217, 1990.
- RODRIGUEZ, C. W; GUNTUPALLI, K; FRAIRE, A E. Bronchiectasis and homozygous Alpha-1-antitrypsin deficiency in a young man. **Thorax**; **50 (4)**: 424-5,1995.
- ROIG, F. V; HERRERO, P; CASTRODEZA, S. R. Bronquiectasias y déficit de Alfa-1-antitripsina. **Arch Bronconeumol** **31(8)**: 429, 1995.

- SAIKI, R. K; GILFEND, D. H; STOFFEL, S; ERLICH, H. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. **Science** **239**: 4887-491, 1989.
- SALLENAVE, J. M; PORTEOUS, D. J; HASLETT, C. Gene therapy for lung inflammatory disease: not so far away? **Thorax** **52**: 742-744, 1997.
- SAVRANSKY, E; HYTIROGLOU, P; HARPAZ, N. Correcting the PI Z effect in the alpha-1-antitrypsin gene in human cells by targeted homologous recombination. **Lab. Invest.** **70**: 676-683, 1994.
- SCHNEBLI, H.P. Recombinant elastase inhibitors for therapy. **Ann. N.Y. Acad. Sci** **624**: 212- 218, 1991.
- SCOTT, J. H; ANDERSON, C. L; SHANKAR, P. S; STAVRIDES, B. Alpha-1-antitrypsin deficiency with diffuse bronchiectasis and cirrhosis of the liver. **Chest** **71**: 535- 538, 1977.
- SCOTT, C. F; CARREL, R. W; LEWIS, J. H; COLMAN, R. W. Alpha-1-antitrypsin Pittsburgh. A potent inhibitor of human plasma factor of Xia, Kallikrein and factor XII. **J Clin Invest** **77**: 631, 1986.
- SEERSHOLM, N; KOK-JENSEN, A; DIRKSEN, R. Survival of patients with severe alpha-1-antitrypsin deficiency with special reference to non-index cases. **Thorax** **49**: 695-698, 1994.
- SEFTON, L; KELSEY, G; WOLF, J. A physical map of the human PI and AACT genes. **Genomics** **7**: 382, 1990.
- SEPPER, R; KONTTINEN, T; INGMAN, T; SORSA, T. Presence, activities, and molecular forms of cathepsin G, elastase, alpha-1-antitrypsin in bronchiectasis. **J Clin Immun** **15**: 27-34, 1995.
- SHARP, H.L; BRIDGES, R.A; KRIVIT, W. Cirrhosis associated with alpha-1-antitrypsin deficiency: a previously unrecognized inherited disorder. **J. Lab. Clin. Med.** **73**: 934- 939, 1969.

SHARP, H. L; MATHIS, R; KRIVIT, W. The liver in non cirrhotic alpha-1-antitrypsin deficiency. **J. Lab.Clin. Med.** **78:** 1012- 1013, 1971.

SHIN, M. S; HO, K. R. Bronchiectasis in patients with alpha-1-antitrypsin deficiency, A rare occurrence? **Chest** **104(5):** 1384- 1386, 1993.

SIFERS, R. N; HARDICK, C. P; WOO, S. L. Disruption of the 290-342 salt bridge is not responsible for the secretory defect of the PI Z Alpha-1-antitrypsin variant. **J. Biol. Chem.** **264:** 2997-3001, 1989.

*Statement by the Committee on Standards for Epidemiology Surveys on Chronic Respiratory Disease of the AmericanThoracic Society.*NewYork: National Tuberculosis and Respiratory Disease Association, 32; 1969

SIFERS, R. N; FINEGOLD, M. J. F; WOO, S. L. C. Molecular biology and genetics of Alpha-1-antitrypsin deficiency. **Seminars in Liver Disease** **12:** 301-310, 1992.

SILVERMAN, E. K; PIERCE, J. A ; RAO, D. C; CAMPBELL, E. J. Variability of pulmonary function of alpha-1-antitrypsin deficiency:clinical correlation. **Ann Intern Med** **111:** 982, 1989.

SNIDER, G. Pulmonary disease in alpha-1-antitrypsin deficiency (editorial). **Ann Intern Med** **111:** 957- 959, 1989.

STOLLER, B. Clinical features and natural history of severe alpha-1-antitrypsin deficiency. **Chest** **111:** 123S- 128 S, 1997.

STONE, P. J; LUCEY, E. C; SNIDER, G. L. Induction and exacerbation of emphysema in hamster with human neutrophil elastase inactivated reversibly by a peptide borome acid. **Am Rev Respir Dis** **141:** 47-52, 1990.

STRIBLING, R; BRUNETTE, E; LIGGITT, D. Aerosol gene delivery in vivo. **Proc Natl Acad Sci USA** **89:** 11277-81,1992.

STRIFE, C. F; HUG, G; HUCK, C; DAVIS, A; KLINE, J. J. Membranoproliferative glomerulonephritis in alpha-1antitrypsin deficiency in children. **Pediatrics** **71:** 88, 1983

- SVEGER, T. Liver disease in alpha-1-antitrypsin deficiency detected by screening of 200,000 infants. **N. Engl J Med** **294**: 1316-1321, 1976
- SVEGER, T. The natural history of liver disease in alpha-1-antitrypsin deficient children. **Acta paediatr Scand** **77**: 847- 851, 1988.
- TAKAHASHI, H; CRYSTAL, R. G. Alpha-1-antitrypsin Null (isola di procida): an alpha -1- antitrypsin deficiency allele caused by deletion of all alpha-1-antitrypsin coding exons. **Am J Hum Genet** **47**: 403, 1990.
- TETLEY, T. D. New perspective on basic mechanism in lung disease. 6. Protease imbalance: its role in lung disease. **Thorax** **48**: 560- 565,1993.
- TETLEY, T. D. Matrix metalloproteinases: a role in emphysema. **Thorax** **52**: 495, 1997.
- TOBIN, M. J; COOK, T. J. L; HUTCHISON, D. C. S. Alpha-1-antitrypsin deficiency The clinical and physiological features of pulmonary emphysema in subject Homozygous for PI Type Z. **Br J Dis Chest** **77**: 14, 1983.
- TRAVIS, J; SALVESEN, G. S. Human plasma proteins inhibitors. **Annu Rev Biochem** **52**: 655-709, 1983.
- TRULOCK, E. P. Lung transplantation for alpha-1-antitrypsin deficiency. Emphysema. **Chest** **110**: 284 S- 294 S, 1996.
- VOGELMEIER, C; HUBBARD, R; GEIFER, R; FRITZ, H; CRYSTAL, R. G. Secretory leukoprotease inhibitors levels in normal upper and lower respiratory tract epithelial lining fluids of normals. **Am Rev Respir Dis** **141(4)**: A47, 1990.
- WAKEFIELD, D; BREIT, S. N; CLARK, P; PENNY, R. Immunogenetic factors in inflammatory eye disease. Influence of HLA-B27 and alpha-1-antitrypsin phenotypes on disease expression. **Arthritis Rheum** **25**: 1431, 1982.
- WEWERS, M. D; CASOLARO, M. A; CRYSTAL, R. G. Replacement therapy deficiency associated with emphysema. **N. Engl. J. Med.** **316**: 1055-1062, 1987.

WILSON, M. Medical news and perspectives. **JAMA** **269**: 837-38, 1993.

WOODHEAD, J. L; FALLON, R; FIGUERED, H; LONGDALE, J; MALCOM, A D. B. Alternative methodology of gene diagnosis. In: DAVIES, K. E. Human genetic diseases-a pratical approach. Oxford, IRL Press Limited, pp 51-64, 1986.

WU, M. C; ERIKSSON, S. Lung function smoking and survival in severe Alpha-1-antitrypsin deficiency, PI ZZ. **J. Clin. Epidemiol.** **41**:1157-1165, 1988.

ANEXO - 1 (PARTE 1)
ACHADOS CLÍNICOS, RADIOLÓGICOS E LABORATORIAIS DE CADA PACIENTE

Nº	HC	IDADE	SEXO	RAÇA	TOSSE	CATARRO	CHIADO	FUMO	INTENSID
1	282165-2	71	feminino	caucasos	sim	sim	sim	nao	
2	245409-5	52	feminino	caucasos	sim	sim/esb	sim	1/2m/d/30a	leve
3	473343-3	38	masculino	caucasos	sim	sim	nao	nao	
4	215009-7	37	feminino	negroid	nao	nao	sim	nao	
5	426644-2	54	feminino	caucasos	sim	sim/amr	sim	nao	
6	465242-9	60	feminino	caucasos	sim	sim/amr	sim	1/2m/d/36a	leve
7	465266-5	48	masculino	caucasos	sim	sim/amr	sim	30c/d/40a	moderado
8	401056-2	56	feminino	caucasos	sim	sim/esb	nao	nao	
9	311166-2	60	feminino	caucasos	sim	nao	sim	2m/d/37a	grave
10	476798-3	52	masculino	caucasos	sim	sim/sg	sim	1m/d/28a	moderado
11	522028-7	33	feminino	negroid	sim	sim/amr	nao	1m/d/20a	leve
12	424068-2		masculino	caucasos	sim	sim/esb	sim	25c/d/30a	moderado
13	451580-3	23	masculino	caucasos	sim	sim/sg	sim	nao	
14	460842-0	63	masculino	negroid	sim	nao	nao	20c/d/20a	leve
15	079685-5	46	feminino	negroid	sim	sim/amr	sim	3m/d/25a	grave
16	378649-1	63	masculino	caucasos	sim	sim/aci	sim	1cph/d/10	leve
17	229272-2	71	masculino	caucasos	sim	sim/amr	sim	20c/d/50a	moderado
18	411432-8	33	masculino	negroid	sim	sim/esb	nao	1m/d/14a	leve
19	388527-5	27	feminino	negroid	sim	sim/esv	sim	1m/d/10a	leve
20	366052-0	58	masculino	caucasos	sim	sim/sg	sim	5c/d/18a	leve
21	455393-6	71	feminino	caucasos	sim	sim	sim	6c/d/18a	leve
22	490216-9	32	feminino	caucasos	sim	sim/ros	sim	nao	
23	480724-8	34	feminino	caucasos	sim	sim	sim	nao	
24	331888-8	56	masculino	negroid	nao	nao	nao	1m/d/42a	moderado
25	388507-5	32	feminino	caucasos	sim	sim/amr	nao	nao	
26	155720-1	58	masculino	caucasos	sim	sim/amr	sim	cpalh/30a	leve
27	444761-2	31	feminino	caucasos	sim	sim	sim	nao	
28	455554-2	71	masculino	caucasos	sim	sim/esb	sim	10c/d/60a	moderado
29	444695-7	61	feminino	negroid	nao	nao	sim	nao	
30	456474-3	22	feminino	negroid	sim	sim/amr	nao	nao	
31	456526-2	19	feminino	caucasos	sim	sim	nao	nao	
32	389285-6	42	masculino	caucasos	sim	sim	nao	1/2m/d/10a	leve
33	523832-4	25	masculino	caucasos	sim	sim	nao	nao	
34	431065-7	64	masculino	caucasos	sim	sim/esb	nao	1m/d/50a	moderado
35	401701-9	58	masculino	caucasos	sim	sim/hmp	sim	2m/d/48a	grave
36	383034-3	60	feminino	caucasos	sim	sim/amr	nao	nao	
37	302703-0	68	masculino	caucasos	sim	sim	sim	1m/d/60a	moderado
38	433184-3	67	masculino	caucasos	sim	nao	sim	1m/d/50a	moderado
39	422868-6	20	masculino	caucasos	sim	sim/esv	sim	nao	
40	457537-8	39	masculino	negroid	sim	nao	sim	1m/d/7a	leve
41	072986-8	16	feminino	caucasos	sim	sim	nao	nao	
42	247683-7	32	feminino	caucasos	sim	sim/amr	sim	nao	
43	022434-5	30	masculino	caucasos	sim	sim/amr	sim	nao	
44	465211-0	28	feminino	caucasos	sim	sim	nao	nao	
45	347829-2	43	feminino	caucasos	sim	sim/esb	sim	5c/d/20a	leve
46	433107-9	75	feminino	caucasos	sim	sim/esb	nao	nao	
47	320079-4	68	masculino	caucasos	sim	sim/esb	nao	1 1/2m/d/4	moderado
48	463148-3	33	masculino	caucasos	sim	sim/amr	nao	12c/d/12a	leve
49	466083-8	30	feminino	negroid	sim	sim/cla	sim	nao	

ANEXO - 1 (PARTE 1)
ACHADOS CLÍNICOS, RADIOLÓGICOS E LABORATORIAIS DE CADA PACIENTE

Nº	HC	IDADE	SEXO	RAÇA	TOSSE	CATARRO	CHIADO	FUMO	INTENSID
50	448162-8	63	masculino	caucasos	sim	sim/amr	sim	3cplh/d/3a	leve
51	432316-1	48	masculino	caucasos	sim	nao	sim	nao	
52	467215-8	46	feminino	negroid	sim	nao	sim	nao	
53	349787-2	48	masculino	negroid	sim	nao	nao	20c/d/32a	moderado
54	384064-5	40	feminino	negroid	sim	sim/esb	nao	nao	
55	454879-3	71	masculino	caucasos	sim	sim/esb	sim	1m/d/20a	leve
56	101052-9	76	feminino	caucasos	sim	sim/esb	sim	nao	
57	168115-4	47	masculino	caucasos	sim	sim/esv	nao	6c/d/10a	leve
58	293115-0	61	feminino	caucasos	sim	sim/esb	nao	2m/d/42a	grave
59	402225-4	54	masculino	caucasos	sim	sim	nao	1/2m/d/40a	leve
60	346064-7	66	masculino	negroid	sim	sim/amr	nao	nao	
61	004223-2	73	masculino	caucasos	sim	sim	sim	1m/d/50a	moderado
62	399881-4	64	feminino	caucasos	sim	sim	sim	nao	
63	108572-8	19	masculino	negroid	sim	sim	nao	nao	
64	468452-7	62	masculino	caucasos	sim	sim	nao	nao	
65	378963-5	23	masculino	caucasos	sim	sim	nao	nao	
66	415828-9	28	masculino	caucasos	nao	nao	nao	nao	
67	233184-5	54	masculino	caucasos	sim	sim	sim	15c/d/20a	leve
68	328192-8	69	feminino	caucasos	sim	sim/esv	sim	nao	
69	478540-8	65	feminino	caucasos	sim	sim/amr	nao	20c/d/33a	moderado
70	446182-4	62	masculino	caucasos	sim	sim/esb	sim	2m/d/50a	grave
71	468375-3	41	masculino	caucasos	sim	sim/amr	nao	nao	
72	078190-3	54	masculino	negroid	sim	sim/amr	nao	18c/d/33a	moderado
73	485721-1	36	feminino	caucasos	sim	nao	sim	15c/d/22a	leve
74	485710-2	28	masculino	caucasos	sim	sim/amr	nao	6c/d/8a	leve
75	236436-7	57	masculino	caucasos	sim	sim/esb	sim	2m/d/30a	moderado
76	486745-4	33	masculino	negroid	sim	sim/amr	nao	nao	
77	137112-1	53	feminino	caucasos	sim	sim	sim	2m/d/24a	moderado
78	237028-3	43	feminino	negroid	sim	sim	nao	nao	
79	398896-2	74	masculino	caucasos	sim	sim/esb	sim	1m/d/50a	moderado
80	420717-7	45	masculino	caucasos	sim	sim/amr	nao	1m/d/23a	leve
81	483610-2	60	masculino	caucasos	sim	sim/amr	sim	1m/d/40a	moderado
82	461630-8	66	masculino	caucasos	sim	nao	sim	nao	
83	364262-3	65	feminino	caucasos	nao	nao	sim	1m/d/30a	moderado
84	464253-1	52	feminino	negroid	sim	sim	sim	nao	
85	490189-0	62	masculino	negroid	sim	sim/esb	sim	3m/d/30a	grave
86	328323-9	54	masculino	caucasos	sim	sim	nao	1m/d/40a	moderado
87	025766-7	49	feminino	negroid	sim	sim/amr	sim	1m/d/30a	moderado
88	340571-8	70	masculino	caucasos	sim	sim	nao	1m/d/35a	moderado
89	527256-1	67	masculino	caucasos	sim	nao	sim	12c/d/40a	leve
90	525083-8	38	feminino	caucasos	sim	sim/esb	sim	nao	
91	535182-8	63	masculino	caucasos	sim	sim	nao	1m/d/50a	moderado
92	465967-5	79	masculino	caucasos	sim	sim	nao	nao	
93	497509-3	59	masculino	caucasos	sim	nao	nao	1m/d/35a	moderado
94	160066-1	68	feminino	caucasos	sim	sim	nao	1/2m/d/35a	leve
95	444369-0	37	feminino	caucasos	sim	sim/esb	nao	nao	
96	251961-3	25	masculino	caucasos	sim	sim/amr	sim	nao	
97	459600-5	63	masculino	caucasos	sim	sim	nao	8c/d/40a	leve
98	296611-7	59	masculino	caucasos	sim	sim	nao	20c/d/50a	moderado

ANEXO - 1 (PARTE 1)
ACHADOS CLÍNICOS, RADIOLÓGICOS E LABORATORIAIS DE CADA PACIENTE

Nº	HC	IDADE	SEXO	RAÇA	TOSSE	CATARRO	CHIADO	FUMO	INTENSID
99	320732-8	73	masculino	caucasos	sim	sim/esb	sim	1cplh/d/60a	leve
100	305433-3	59	feminino	caucasos	sim	nao	sim	nao	
101	432596-3	68	feminino	caucasos	sim	sim/esb	sim	nao	
102	496448-6	73	masculino	caucasos	sim	sim	nao	1m/d/60a	moderado
103	490153-1	47	feminino	caucasos	sim	sim/esb	sim	nao	
104	453523-9	60	masculino	caucasos	sim	nao	sim	2m/d/30a	moderado
105	497101-7	36	feminino	caucasos	sim	sim/amr	sim	nao	
106	498915-7	69	masculino	caucasos	sim	nao	nao	5cplh/d/50a	moderado
107	531079-7	62	masculino	negroid	sim	sim	sim	20c/d/45a	moderado
108	360993-6	55	feminino	caucasos	sim	sim	nao	3m/d/40a	grave
109	094096-9	74	masculino	caucasos	sim	sim	sim	1m/d/56a	moderado
110	396289-9	52	feminino	caucasos	sim	sim	sim	nao	
111	487438-0	67	masculino	negroid	sim	sim	nao	20a	
112	4967782-0	60	masculino	caucasos	sim	sim	sim	nao	
113	500872-6	52	masculino	caucasos	sim	nao	sim	1m/d/40a	moderado
114	512293-6	67	masculino	caucasos	sim	sim/esb	nao	12c/d/40a	leve
115	524513-6	74	feminino	caucasos	sim	sim	nao	1m/d/40a	moderado
116	394947-9	46	masculino	caucasos	sim	sim/amr	nao	2m/d/10a	leve
117	462806-0	71	masculino	caucasos	sim	sim	nao	1m/d/50a	moderado
118	477727-1	71	feminino	caucasos	sim	sim	sim	nao	
119	536615-2	76	masculino	caucasos	sim	sim	nao	30c/d/50a	grave
120	531425-0	65	feminino	negroid	sim	sim/aci	nao	4cplh/d/20a	moderado
121	519355-9	41	masculino	negroid	sim	sim/amr	nao	5c/d/24a	leve

ANEXO - 1 (PARTE 2)
ACHADOS CLÍNICOS, RADIOLÓGICOS E LABORATORIAIS DE CADA PACIENTE

Nº	CVF	VEF1	VEF1/CVF	RX	TOMO	SINUSI	IRESP	DISP	AUSC	PO2
1	59	49	62	ophtg/bcts	bcts/li/lm	nao	sim	sim	esc/bas	68
2	75	41	46	hiperinsufl	enf bil ap	nao	nao	sim	mvdba/sib	70
3				ophtgdireit	silicose	nao	sim	sim	mv+/abhte	63
4	94	91	77	nl	brqlite	nao	sim	sim	mv+/sib	
5	38	38	75	op/lm	bcts/lm/li	nao	sim	sim	mvdglb	54
6				act/trambqc	bcts/li	nao	sim	sim	mv+sim	
7				nod/htd	nod/htd	nao	nao	nao	mvdglb	
8	73	59	66	bcts/lin/lm	bcts/lm	nao	sim	sim	nl	93
9	88	63	53	hiperinsufl		nao	nao	sim	mvd/sib	77
10				bcts/ling		nao	nao	nao	esc/hte	
11	42	39	83	bcts/lie	bcts/lie	nao	sim	sim	mvdglb	
12	92	71	58	hiperinsufl		nao	sim	sim	mvdglb	
13	47	43	78	fav/lie/bcts	bcts/lie	nao	sim	sim	mvdglb	
14				hiperinsufl	hiperinsufl	nao	nao	sim	mvdglb	77
15				hernia hiat	brqlite	nao	nao	sim	mvdbas	
16				nl		nao	nao	sim	mvdbas	
17	44	28	44	bcts/bd/enf		nao	nao	sim	mvdglb	72
18	91	56	51	bolhas/ap	enf/ls	nao	nao	sim	mv+/ro	
19	64	71	89	op/bd/cm		nao	sim	sim	mvdbd	
20	39	35	66	blh enf/bcts		nao	sim	sim	mvdglb	62
21				bcts/lin/li		nao	nao	sim	mv/dim/ba	65
22	38	18	43	im cist li	bcts/li	nao	sim	sim	mv+/sib	36
23	53	36	60	nl	bcts/lm	sim	sim	sim	mvd/ec/be	64
24	50	18	29	hiperinsufl		nao	nao	sim	mvdglb	54
25	45	35	62	bcts/lie	bcts/lie	sim	sim	nao	mv+/sib	77
26	97	70	57	bcts/be		sim	nao	sim	sibdif	78
27	35	24	55	bcts cist	bcts/ls	nao	sim	sim	sibdif	55
28	43	24	44	ophtg/lsc	hiperinsufl	nao	sim	sim	mvabl/hte	67
29	61	45	55	hiperinsufl		nao	nao	sim	mv+/si/ba	63
30				nl		sim	sim	não	nl	
31	39	28		hiperinsufl	bcts mista	nao	sim	sim	mv+/ro	52
32	48	54	86	inft gm	fibrose	nao	sim	sim	esc/ro/dif	66
33	76	78	87	hiperinsufl	bcts/lie	nao	sim	nao	mvdb/ba	67
34	72	51	50	hiperinsufl		nao	nao	sim	mvdb/si/dif	
35	67	59	67	nodulo/lie	nodulo	nao	nao	sim	mvdglb	71
36	98	88	68	enf/li	bcts/li/lm	nao	nao	nao	nl	
37	68	60	61	bcts/li/enf		nao	sim	sim	esc/ba	
38	74	56	53	hiperinsufl		nao	nao	sim	mvdb/hte/si	
39	78	63		inft/lie	bcts/be	sim	sim	sim	esc/ba	
40				cong.bqc/bd		sim	nao	sim	nl	
41				nl	nl	sim	sim	nao	nl	
42	49	29	88	bcts/li	bcts/enf	nao	sim	sim	ec/ba	69
43				ophtg/li		nao	sim	sim	mvdb/sib	79
44				nl		sim	sim	nao	mv+/sib/dif	
45	75	63	66	nl		nao	sim	sim	mvdglb	64
46	68	51	56	inft nod dif	fibrose pulm	nao	sim	sim	esc/dif	49
47	52	46	64	acent trama		nao	nao	não	esc/dif	39
48				hiperinsufl		nao	nao	nao	nl	
49				nl		nao	sim	sim	mvdb/esc/ba	

ANEXO - 1 (PARTE 2)
ACHADOS CLÍNICOS, RADIOLÓGICOS E LABORATORIAIS DE CADA PACIENTE

Nº	CVF	VEF1	VEF1/CVF	RX	TOMO	SINUSI	IRESP	DISP	AUSC	PO2
50				ophtg/lie	bcts/lie	nao	sim	sim	mvd/be	
51	76	67	68	nl		nao	nao	sim	ro/sib/ba	
52	104	100		hiperinsufl		nao	nao	sim	nl	
53				hiperinsufl		nao	sim	sim	mvdglb	
54	29	36	92	ophtg/lst	bcts/lst	nao	sim	sim	mvd/ap	
55				esp perib		nao	nao	sim	mvdglb	89
56	44	35	64	bcts bil	bcts cist	nao	sim	sim	esc/dif	65
57	67	47	55	enf/bd/bcts	bcts	sim	sim	sim	mvd/htd	
58	45	35	62	op ret dif		nao	nao	sim	mvdglb	
59	69	34	41	hiperinsufl	bcts/lie	nao	sim	sim	mv+/si/dif	77
60	62	69	78	hiperinsufl	bcts/lm	nao	sim	não	nl	
61	71	32	36	hiperinsufl		nao	nao	sim	mvdglb	72
62	78	57	51	hiperinsufl		nao	nao	sim	mvdglb	69
63				hiperinsufl	hiperinsufl	nao	sim	sim	mvd/hte	
64	59	34	47	ophtg/ret		nao	sim	sim	mvd/ba	65
65	62	36	48	bcts cist	bcts cist	nao	sim	sim	mv+/si/dif	
66	73	84	96	hiperinsufl	normal	nao	sim	sim	nl	
67	73	53	54	hiperinsufl		nao	nao	sim	mvd/si/esp	
68	69	68	73	ophtg/lm	nl	nao	sim	sim	mvdglb	
69				fav/be	bcts/lie	nao	sim	sim	mv+/ec/ba	
70				hiperinsufl		nao	nao	sim	mvdglb	
71				hiperinsufl	hiperinsufl	nao	sim	nao	mv+/sim	
72				velam bd		nao	nao	sim	nl	
73	81	76	74	nl		nao	sim	sim	mvdglb/si	
74				hiperinsufl		sim	sim	sim	esc/bd	62
75	50	31	50	hiperinsufl		nao	nao	sim	mvdglb	
76	87	88	85	bcts/bd	bcts/bd	nao	sim	sim	mvd/ec/be	
77	56	35	53	bcts/lid	bcts mista	nao	sim	sim	mvdsim/si	50
78	47	29	51	hiperinsufl	enfisema	nao	nao	sim	mvdsim	69
79	57	36	45	hiperinsufl		nao	sim	sim	mvdglb	66
80	78	73	72	hiperinsufl	enf/lb/bcts	nao	sim	sim	mv+/ro	
81	100	58	47	hiperinsufl		nao	sim	sim	mvd/ba	79
82	78	81	75	nl		nao	nao	sim	normal	
83	84	83	73	hiperinsufl	enfisema	nao	nao	sim	mvdsim	
84				hiperinsufl		nao	nao	sim	nl	
85	101	67	53	hiperinsuf	bolhas	nao	sim	sim	mvdglb	
86	38	30	59	nl		nao	sim	sim	mvd/escba	59
87	28	20	54	hiperinsufl		nao	sim	sim	mvd dif	
88				inf htg ba		nao	sim	sim	mvd dif	53
89	86	76	71	hiperinsufl	enfisema	nao	nao	sim	mvdglb	51
90	66	41	53	enf/lm	enf centr	nao	nao	sim	mvd/si/dif	
91				hiperinsufl		nao	nao	sim	mvdglb	47
92				hiperinsufl		nao	sim	sim	nl	61
93	59	18	25	hiperinsufl		sim	nao	sim	mvdglb	45
94				hiperinsufl		nao	nao	sim	mv+/ro/dif	66
95	80	65	71	bcts cist		nao	nao	sim	mvd/bd	
96	33	31	78	bcts	enf blh/bd	nao	sim	sim	mvd/ba/si	71
97	72	43	44	hiperinsufl		nao	sim	sim	mvd/ap	55
98	41	36	63	hiperinsufl		nao	sim	sim	ron/si/dif	53

ANEXO - 1 (PARTE 3)
ACHADOS CLÍNICOS, RADIOLÓGICOS E LABORATORIAIS DE CADA
PACIENTE

Nº	PCO2	DIAGNOST	DIAGDOEN	DIAGRAD	CONCENT	MUTS	MUTZ
1	38	bcts/hiprbqc	DB	bcts	131	S	
2	43	enfisema	DP	enf	137	S	
3	35	silicose	DP			S	
4		asma bqc	DB		156	S	
5	30	bcts/pnmrep	DB	bcts	135	S	
6		dpoc/pnmrep	DB	bcts	67	S	Z
7		bqt cr	DB		115	S	
8	37	bcts/fc	DB	bcts	179	S	
9	33	dpoc/hiprbqc	DB		105	S	
10		bcts	DB	bcts	147	S	
11		bcts/brqt/fc	DB	bcts	149	S	
12		bqt/hiprbqc	DB		171	S	
13		bcts	DB	bcts	144	S	
14	50	dpoc/oxigen	DB		64	S	Z
15		bqt cr tbq	DB		143	S	
16		hiprbqc	DB		152	S	
17	39	dpoc grave	DB/DP	bcts/enf	177	S	
18		dpoc/fc	DB/DP	enf	135	S	
19		bqt/hiprbqc	DB		181	S	
20	43	enf/bcts	DB/DP	bcts/enf	121	S	
21	36	bcts	DB	bcts	117	S	
22		brql oblt	DB	bcts	130	S	
23	31	bcts/hiprbqc	DB	bcts	118	S	
24	51	dpoc/corp	DB		135	S	
25	37	bcts	DB	bcts	118	S	
26	31	dpoc/hiprbqc	DB	bcts		SS	
27	42	bcts	DB	bcts	97		Z
28	37	dpoc/hiprbqc	DB		97		Z
29	40	hiprbqc	DB		103		
30		hiprbqc	DB		143		
31	47	bcts/hiprbqc	DB	bcts	166		
32	36	fibrose pul	DP		168		
33	31	bcts/def lg	DB	bcts	137		
34		dpoc/bqt tbq	DB		128		
35	38	dpoc	DB		189		
36		bcts/enf	DB/DP	bcts/enf	161		
37		bcts/enf	DB/DP	bcts/enf	146		
38		seqtbc	OUTROS		173		
39		bcts	DB	bcts	152		
40		hiprbqc	DB		156		
41		sinusobqt	DB		148		
42	42	bcts/enf	DB/DP	bcts/enf	167		
43	28	asma bqc	DB		147		
44		sinusite	OUTROS		125		
45	38	dpoc/bqt	DB		127		
46	38	fibrose pul	DP		145		
47	35	dpoc	DB		180		
48		bqt	DB		145		
49		asma bqc	DB		144		

ANEXO - 1 (PARTE 3)
ACHADOS CLÍNICOS, RADIOLÓGICOS E LABORATORIAIS DE CADA
PACIENTE

Nº	PCO2	DIAGNOST	DIAGDOEN	DIAGRAD	CONCENT	MUTS	MUTZ
50		dpoc/bcts	DB	bcts	129		
51		asma bqc	DB		127		
52		asma atop	DB		135		
53		dpoc	DB		112		
54		bcts	DB	bcts	141		
55	33	bqt tbq	DB		124		
56	36	bcts	DB	bcts	229		
57		bcts/discn/enf	DB/DP	bcts/enf	135		
58		dpoc/bqt	DB		181		
59	56	dpoc/bcts	DB	bcts	230		
60		bcts/fc	DB	bcts	197		
61	44	dpoc	DB		149		
62	37	dpoc	DB		174		
63		pnmrep/Sdown	DB		158		
64	39	bqt cr	DB		136		
65		bcts/brqt	DB	bcts	113		
66		pnm rep	DB		131		
67		bqte cr	DB		166		
68		pnm rep	DB		135		
69		bcts	DB	bcts	131		
70		dpoc	DB		150		
71		def im humo	DB		114		
72		bqt cr	DB		168		
73		dpoc	DB		150		
74	43	pnmpat cr	DB		127		
75		bqt cr	DB		171		
76		bcts	DB	bcts	134		
77	37	bcts/dpoc	DB	bcts	153		
78	40	dpoc/enf	DB/DP	enf	163		
79	29	dpoc grave	DB		151		
80		enf/bcts/fc	DB/DP	enf	189		
81	33	dpoc/hprbqc	DB		229		
82		dpoc/hprbqc	DB		173		
83		dpoc/enf	DB/DP	enf	145		
84		asma bqc	DB		102		
85		dpoc/enf	DB/DP	enf	143		
86	67	dpoc	DB		122		
87		dpoc/asmbqc	DB		181		
88	36	dpoc	DB		270		
89	37	dpoc/enf	DB/DP	enf	187		
90		enf/doenç/intrs	DP	enf	185		
91	39	dpoc	DB		158		
92	46	dpoc/corp	DB		155		
93	53	dpoc/corp	DB		135		
94	34	dpoc/bqttbg	DB		133		
95		bqlite/bcts	DB	bcts	199		
96	39	bcts/enf	DB/DP	enf	199		
97	24	dpoc	DB		185		
98	43	icclll/dpoc	DB		144		

ANEXO - 1 (PARTE 3)
ACHADOS CLÍNICOS, RADIOLÓGICOS E LABORATORIAIS DE CADA
PACIENTE

Nº	PCO2	DIAGNOST	DIAGDOEN	DIAGRAD	CONCENT	MUTS	MUTZ
99	44	dpoc/bqttbg	DB		148		
100	43	hprbqc	DB		181		
101	44	dpoc/hprbqc	DB		183		
102		enf/corpul	DP	enf	190		
103	39	bcts	DB	bcts	171		
104	40	dpoc	DB		158		
105		bcts/bqlite	DB	bcts	181		
106	41	dpoc	DB		205		
107	68	dpoc/hprbqc	DB		202		
108	43	enf	DP	enf	190		
109	52	dpoc	DB		211		
110		bcts	DB	bcts	200		
111	53	dpoc/corpul	DB		199		
112		bcts	DB	bcts	118		
113	32	dpoc/hprbqc	DB		158		
114	34	dpoc/enf	DB/DP		141		
115	31	dpoc	DB		193		
116		bcts/fc	DB	bcts	183		
117	51	dpoc/corpul	DB		371		
118	46	bcts/hiprbqc	DB	bcts	230		
119	29	enf	DP	enf	169		
120	55	fibrose pul	DP	enf	186		
121		bcts	DB	bcts	114		

ANEXO-2 - PROTOCOLO DE PESQUISA

1. IDENTIFICAÇÃO

nome:

número de registro:

sexo:

raça:

data de nascimento:

2. DADOS DE ANAMNESE

queixa principal:

história familiar:

heredograma

Tosse?

Catarro?

Chiado?

Dispnéia?

Antecedentes de tabagismo e intensidade:

Infecções broncopulmonares de repetição:

Sinusite:

Tuberculose:

3. DADOS DE EXAME FÍSICO, RADIOLÓGICO, ESPIROMETRIA E GASOMETRIA

Ausculata:

RX (laudo do radiologista):

Tomo (laudo do radiologista):

CVF:

VEF1:

Relação:

PO₂:

PCO₂™:

Na e Cl no suor:

4. DIAGNÓSTICO FORNECIDO PELO AMBULATÓRIO DE PNEUMOLOGIA DO HC: