



## Associação entre deficiência de alfa-1-antitripsina e a gravidade da fibrose cística

*Association between alpha 1 antitrypsin deficiency and cystic fibrosis severity*

Elisangela Jacinto de Faria<sup>1</sup>, Isabel Cristina Jacinto de Faria<sup>1</sup>, Alfonso Eduardo Alvarez<sup>2</sup>, José Dirceu Ribeiro<sup>3</sup>, Antônio Fernando Ribeiro<sup>4</sup>, Carmen Silvia Bertuzzo<sup>5</sup>

### Resumo

**Objetivo:** Verificar a distribuição dos genótipos da alfa-1-antitripsina e correlacionar com a gravidade da doença pulmonar em pacientes fibrocísticos.

**Método:** Estudo clínico-laboratorial de corte transversal, com 70 pacientes fibrocísticos do Hospital Universitário da UNICAMP. Os fibrocísticos tiveram diagnóstico confirmado clínica e laboratorialmente. A gravidade da fibrose cística foi avaliada pelo escore de Shwachman. Todos os pacientes foram analisados para os alelos S e Z de alfa-1-antitripsina usando a reação em cadeia da polimerase.

**Resultados:** Nove pacientes (12,8%) foram heterozigotos para os alelos S ou Z ou heterozigoto composto (SZ). Nenhuma diferença significativa foi encontrada na gravidade clínica da fibrose cística entre os genótipos da alfa-1-antitripsina. Nenhuma diferença com significância estatística foi encontrada quando os pacientes foram separados pela presença ou ausência da mutação  $\Delta F508$ .

**Conclusão:** Neste estudo, o primeiro realizado no Brasil sobre a associação entre deficiência de alfa-1-antitripsina e fibrose cística, não encontramos uma associação entre essa deficiência e a gravidade da fibrose cística.

*J Pediatr (Rio J). 2005;81(6):485-90: Fibrose cística, alfa-1-antitripsina.*

### Introdução

A fibrose cística (FC) é a mais comum e letal das doenças genéticas autossômicas recessivas e afeta 1 em cada 2.500 caucasianos. O risco para o heterozigoto na população geral é de 1 para 25. Mais de 1.000 mutações têm sido identi-

### Abstract

**Objective:** To ascertain the distribution of alpha 1 antitrypsin genotypes and correlate it with the severity of pulmonary disease in patients with cystic fibrosis.

**Method:** A clinical and laboratory cross sectional study of 70 patients at the *Universidade Estadual de Campinas* teaching hospital. Cystic fibrosis diagnoses was confirmed by both clinical and laboratory methods. The severity of cystic fibrosis was evaluated by Shwachman score. All the patients were tested for the presence of S and Z alleles for alpha 1 antitrypsin deficiency using polymerase chain reaction.

**Results:** Nine (12.8%) patients were heterozygous for S or Z alleles or the heterozygote compound (SZ). No significant differences were found in clinical severity of Cystic fibrosis between genotypes of alpha 1 antitrypsin. No significant differences were found when the patients were divided according to the presence or absence of the  $\Delta F508$  mutation.

**Conclusion:** In this study, the first undertaken in Brazil into the association of alpha 1 antitrypsin deficiency and cystic fibrosis, we did not find an association between the deficiency and cystic fibrosis severity.

*J Pediatr (Rio J). 2005;81(6):485-90: Cystic fibrosis, alpha 1 antitrypsin.*

cadas no gene CFTR<sup>1</sup>, o qual codifica para uma proteína contendo 1.489 aminoácidos. A FC é caracterizada pelo fluxo anormal de cloro na membrana apical das células epiteliais, causando diversas manifestações clínicas, que incluem insuficiência pancreática, doença pulmonar, íleo meconial, níveis aumentados de cloro no suor e obstrução dos vasos deferentes.

A expressão fenotípica extremamente diversa da FC provavelmente é influenciada por outros tratos genéticos separados do locus CFTR. Muitos dos genes estudados atualmente como modificadores da FC, particularmente aqueles que influenciam na gravidade da doença pulmonar, são envolvidos no controle da infecção, imunidade e inflamação. Alguns desses incluem os antígenos HLA de classe II, *mannose-binding lectin* e alfa-1-antitripsina (A1AT)<sup>2</sup>.

A A1AT é uma glicoproteína altamente polimórfica, sintetizada pelos hepatócitos e macrófagos alveolares. É

1. Mestre. Bióloga, Dep. de Genética, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP.
2. Mestre. Pneumologista pediátrico, Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP, Campinas, SP.
3. Doutor. Pneumologista pediátrico. Professor, Departamento de Pediatria, Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP, Campinas, SP.
4. Doutor. Gastroenterologista pediátrico. Professor, Setor de Gastroenterologia Pediátrica, Fac. de Ciências Médicas, UNICAMP, Campinas, SP.
5. Doutora. Médica geneticista. Professora, Departamento de Genética, Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP, Campinas, SP.

Artigo submetido em 21.07.04, aceito em 27.07.05.

**Como citar este artigo:** de Faria EJ, de Faria IC, Alvarez AE, Ribeiro JD, Ribeiro AF, Bertuzzo CS. Associação entre deficiência de alfa-1-antitripsina e a gravidade da fibrose cística. *J Pediatr (Rio J)*. 2005;81:485-90.

um membro da família de inibidores de proteases de serina e protege os tecidos do ataque proteolítico pelas proteases leucocitárias, tal como a elastase, catepsina e tripsina, durante as reações inflamatórias<sup>3</sup>. Essa proteína é codificada por um único gene (Pi: inibidor de proteases) no cromossomo 14q31-32.2<sup>4</sup>. Cerca de 90 alelos têm sido identificados<sup>5</sup>, embora somente alguns estejam associados com um nível sérico de A1AT baixo ou indetectável. A variante normal é PiM. Atualmente, os alelos deficientes mais comuns são PiZ (Z) e PiS (S). O alelo Z resulta de uma única mutação de ponto, que troca uma guanina por uma adenina no éxon 5 do gene e resulta na substituição do ácido glutâmico pela lisina na A1AT.

Homozigotos para o Z têm 15% dos níveis normais de A1AT, e os riscos são aumentados para desenvolverem enfisema pulmonar<sup>6</sup> e, menos freqüentemente, doenças no fígado em recém-nascidos. O alelo S é mais freqüente que o alelo Z e resulta de uma única mutação de ponto, na qual há troca de adenina por timina no éxon 3 e resulta na substituição de ácido glutâmico por valina. Os níveis de A1AT estão diminuídos nos homozigotos SS (60% do normal). Nos indivíduos SZ, a quantidade de A1AT (37% do normal) é baixa o suficiente para colocar o indivíduo afetado em risco para doença pulmonar crônica<sup>6</sup>.

Com relação à evolução do quadro pulmonar da FC, é conhecido um notável desequilíbrio de proteinases-anti-proteinases a favor de elastase de neutrófilos dentro dos pulmões. Essas proteinases têm efeitos deletérios, destruindo a elastina no pulmão, estimulando a produção de muco, clivando imunoglobulinas e fibronectina<sup>7</sup>. Nos pacientes com FC e deficiência de alfa-1-antitripsina (DA1AT), esse desequilíbrio estaria exacerbado e o dano pulmonar seria ainda maior.

Os estudos sobre a associação de DA1AT e FC são raros e apresentam resultados controversos.

Ao contrário do que se poderia esperar, um estudo com pacientes fibrocísticos mostrou que a associação com a DA1AT mostrou maiores valores de função pulmonar quando comparados com indivíduos FC sem DA1AT (VEF1 62,55% do previsto e VEF 51,15% do previsto, respectivamente)<sup>8,9</sup>. Outro estudo, com casuística significativa, não evidenciou associação entre a gravidade da FC e a presença de DA1AT<sup>10</sup>. Tendo-se em vista a quantidade aumentada de elastase proveniente dos neutrófilos mortos e presentes nas secreções das vias aéreas dos fibrocísticos, é de se esperar que a associação entre a DA1AT e FC confira um fenótipo mais grave ao paciente fibrocístico. Nosso estudo teve o objetivo de verificar se a presença de alelos S e Z da A1AT estava relacionada com a gravidade da doença pulmonar em um centro de referência para tratamento de FC no Brasil.

### Casuística e métodos

Realizou-se um estudo clínico-laboratorial, de corte transversal, com os pacientes do ambulatório de fibrose cística do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), no período de março de 2000 a

agosto de 2002. Foram incluídos no estudo todos os pacientes que estavam em seguimento nesse período e que tinham o diagnóstico de FC confirmado por história clínica compatível e pelo menos dois testes do suor com valores de cloro igual ou maior que 60 mEq/l, realizados através do estímulo do suor pela iontoforese com pilocarpina, segundo o método de Gibson & Cooke<sup>11</sup>.

Os responsáveis pelos pacientes assinaram o termo de consentimento esclarecido antes do início do estudo.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas/UNICAMP.

Para a comparação de variáveis categóricas, foi utilizado o teste de qui-quadrado. O teste exato de Fisher foi aplicado nos casos em que uma das células 2 X 2 era menor ou igual a 5. O nível de significância adotado foi de 5%.

Os critérios clínicos analisados incluíam as manifestações pulmonares, manifestações digestivas e escore de Shwachman<sup>12</sup>. A avaliação laboratorial incluiu testes de função pulmonar, dosagem de sódio e cloro no suor, radiografia de tórax e tomografia computadorizada de tórax. O escore de Shwachman avalia a atividade física, o exame físico, a nutrição e o quadro radiológico. Para cada item, a pontuação máxima é de 25 pontos; quanto menor o valor do escore, pior o quadro clínico do paciente. O escore é graduado em excelente (86-100), bom (71-85), médio (56-70), moderado (41-55) e grave (40 ou menos), conforme o número total de pontos. O escore de Shwachman encontra-se na Tabela 1.

Todos os pacientes foram previamente genotipados quanto ao gene CFTR pela equipe do Laboratório de Genética Molecular da UNICAMP. O DNA desses pacientes foi extraído e, através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), regiões específicas foram amplificadas para que pudessem ser analisadas para as cinco mutações em questão:  $\Delta F508$ , G542X, N1303K, G551D e R553X.

Todos os pacientes foram analisados para os alelos S e Z da deficiência da A1AT usando a PCR, que cria sítios reconhecidos pelas enzimas de restrição XmnI (alelo S) e TaqI (alelo Z)<sup>13</sup>. As duas amplificações foram otimizadas para que fossem realizadas no mesmo programa de PCR. A reação foi realizada em volume de 100  $\mu$ l, com a seguinte concentração de reagentes: 100 mM de cada desoxirribonucleotídeo trifosfato (dATP, dTTP, dGTP, dCTP); 40 pmoles de cada iniciador; 2,5 unidades de Taq DNA polimerase (Cen-tbio-UFRGS); 1,5  $\mu$ M de MgCl<sub>2</sub> presentes no tampão específico da enzima e; 1  $\mu$ g de DNA genômico.

A reação de amplificação foi realizada em aparelho ciclador de temperatura e consistiu de uma desnaturação inicial de 94 °C por 7 minutos, seguida de um ciclo de 95 °C por 5 minutos; 50 °C por 1 minuto (anelamento) e 74 °C por 2 minutos (extensão). Seguem-se 34 ciclos de 95 °C por 1 minuto; 50 °C por 1 minuto e 74 °C por 2 minutos e, por fim, um ciclo de 74 °C por 9 minutos (terminalização).

A amostra de 15  $\mu$ l do amplificado para a mutação S foi digerida durante 12 horas a 37 °C em um volume total de 50  $\mu$ l contendo 2  $\mu$ l da enzima de restrição (XmnI), 5  $\mu$ l do tampão recomendado pelo fornecedor e o volume final

**Tabela 1** - Escore de Shwachman<sup>10</sup>

<b>Pontuação</b>	<b>Atividade geral</b>	<b>Exame físico</b>
25	Atividade plena; tolerância ao exercício normal; boa disposição; desenvolvimento motor normal; frequência escolar normal.	S/ tosse; FC e FR normais; s/ evidências de enfisema; pulmões limpos à ausculta; boa postura; s/ baqueteamento.
20	Leve limitação à atividade intensa, cansa ao final do dia ou após exercício prolongado; menos energético; limite inferior do desenvolvimento motor normal; ocasionalmente irritado ou apático; boa frequência escolar.	Tosse seca ocasional; FC e FR normais no repouso; enfisema leve; MV rude, roncos e TE prolongado ocasionais; boa postura; baqueteamento leve.
15	Descansa voluntariamente; cansa após exercício; moderadamente inativo; leve retardo motor; falta espontaneidade; passivo ou irritável; frequência escolar regular.	Tosse leve e crônica matinal após exercício/choro e ocasionalmente durante o dia; s/ tosse noturna; FC e FR levemente ↑; ↑ diâmetro AP e diafragma rebaixado; MV rude, creptantes, roncos/sibilos; baqueteamento 2/3.
10	Atividade física e tolerância ao exercício limitadas; dispnéico após exercícios; retardo motor moderado; agitado ou irritado; preguiçoso ou abatido; frequência escolar baixa; pode requerer professor particular	Tosse crônica, freqüente, repetitiva, produtiva, raramente paroxística; FC e FR ↑ moderado; enfisema moderado a grave, freqüentemente c/ deformidade ao RX; creptantes, roncos e sibilos usualmente presentes disseminados, baqueteamento 2/3.
5	Limitação grave da atividade; dispnéia e ortopnéia; inativo ou confinado a cama/cadeira; marcado retardo motor; apático ou irritado; não pode assistir às aulas.	Tosse severa paroxística, freqüente, produtiva, freqüentemente c/ vômitos e hemoptise; tosse noturna; taquipnéia e taquicardia; enfisema grave; creptantes, roncos e sibilos generalizados; expiração audível; má postura; 3/4 baqueteamento; cianose freqüente.

<b>Pontuação</b>	<b>Nutrição</b>	<b>Achados radiológicos</b>
25	Peso e altura acima do %25 ou compatível c/ padrão familiar; tônus e massa muscular normais; gordura subcutânea normal; maturação sexual normal; fezes quase normais; bom apetite.	S/ evidências de enfisema; s/ aumento na trama broncovascular; s/ infiltrações ou atelectasias.
20	Peso e altura acima do %10 ou levemente abaixo do padrão familiar; tônus e massa muscular bons; tecido subcutâneo levemente diminuído; maturação sexual levemente retardada; apetite normal e fezes + freqüentemente e leve alteração.	Evidências mínima de enfisema; leve aumento da trama broncovascular; s/ infiltrados ou atelectasias.
15	Peso e altura acima do %3 ou moderadamente abaixo do padrão familiar; peso usualmente deficiente para altura; tônus e massa muscular regulares; gordura subcutânea deficiente, abdome levemente distendido; maturação sexual retardada; apetite regular; fezes volumosas, mau cheiro, flutuantes formadas.	Enfisema moderado; diâmetro AP aumentado; campos pulmonares mais radiolucentes, diafragma moderadamente rebaixado; trama broncovascular aumentada; atelectasias localizadas ou irregulares; infiltrado ocasional transitório.
10	Peso e altura acima do %3 e deficiente para altura; tônus e massa muscular pobres; deficiência marcada de gordura subcutânea; distensão abdominal moderada; maturação sexual insuficiente, sem estirão; mau apetite; fezes pouco formadas, volumosas, mau cheiro, gordurosas.	Enfisema marcado; aumento do diâmetro AP marcado; marcado rebaixamento do diafragma; silhueta cardíaca estreita; áreas de atelectasias disseminadas; atelectasias segmentares ou lobares ocasionais; focos persistentes de infiltrações; cistos localizados; aumento marcado da trama.
5	Mal-nutrido e baixo; músculos fracos, flácidos e pequenos; s/ gordura subcutânea; perda de peso freqüente; fezes freqüentes, volumosas, mau cheiro e gordurosas; prolapso retal freqüente.	Alterações extensivas; hiperinsuflação grave; infiltrado e atelectasias disseminadas; formação disseminada de cistos; formação de bronquiectasias e abscessos; atelectasias lobares persistentes.

completado com 30 µl de água. Após a digestão, a amostra é submetida em eletroforese em gel de poli-acrilamida 14% (3,75 ml de TBE 10X; 14,75 ml de H<sub>2</sub>O; 12,5 ml de Bis acrilamida; 200 µl de persulfato de amônio 10% e 40 ml de Temed). Em seguida, o gel foi corado em brometo de etídio, para que as bandas pudessem ser visualizadas.

A amostra de 15 µl do DNA amplificado para a mutação Z foi digerida durante 12 horas a 65 °C em um volume total de 50 µl contendo 1 µl da enzima de restrição (TaqI), 5 µl do tampão recomendado pelo fornecedor e o volume final completado com 29 µl de H<sub>2</sub>O.

Após a digestão, a amostra foi submetida a eletroforese em gel de poli-acrilamida 14%.

## Resultados

Foram analisados 70 pacientes fibrocísticos, constituídos por 36 homens (51%) e 34 mulheres (49%), com média de idade de 10,2 e desvio padrão de 9,44 anos. Com relação ao grupo étnico, 97% dos pacientes eram caucasóides e 3% negróides. Nove pacientes com FC (12,8%) foram heterozigotos para o alelo S ou Z ou heterozigoto composto (SZ). Nenhum homozigoto para os alelos S ou Z foram detectados. No Brasil, a frequência normal para os heterozigotos S é de 9,2%, e 5,5% para os heterozigotos Z<sup>14</sup>. Nenhuma diferença com significância estatística foi encontrada na gravidade clínica entre os genótipos da A1AT (MS

$\chi^2_{(1)} = 0,0487 - 0,80 < p < 0,90$ ; MZ  $\chi^2_{(1)} = 2,1228 - 0,10 < p < 0,20$ ; SZ  $\chi^2_{(1)} = 2,9719, 0,05 < p < 0,10$ ) (Tabela 2). Nenhuma diferença com significância estatística foi encontrada quando os pacientes foram separados de acordo com a presença ou ausência da mutação  $\Delta F508$  (Tabela 3). As faixas etárias dos pacientes e a gravidade do quadro pulmonar encontram-se na Tabela 4.

## Discussão

Neste estudo, avaliaram-se crianças e adultos portadores de FC. Verificou-se haver uma grande maioria de caucasóides, o que era esperado, apesar do índice elevado de miscigenação racial no Brasil.

Para avaliar a gravidade do quadro pulmonar, utilizou-se como parâmetro o escore de Shwachman<sup>12</sup>. Em estudos anteriormente realizados na Unicamp, verificou-se que o escore apresentava correlação estatisticamente significativa com a colonização por *Pseudomonas aeruginosa*, colonização por *Pseudomonas aeruginosa* mucosa, capacidade vital forçada, volume expiratório forçado no primeiro segundo, saturação transcutânea da hemoglobina pelo oxigênio, número de exacerbações infecciosas no último ano de acompanhamento, indicação de utilização de dornase alfa, indicação de programa regular de fisioterapia respiratória e indicação de oxigenioterapia domiciliar<sup>15,16</sup>. Com isso, o escore de Shwachman seria um bom método de avaliação geral de gravidade.

**Tabela 2** - Distribuição dos alelos da alfa-1-antitripsina e a gravidade da doença pulmonar (todos os pacientes)

Doença pulmonar	Genótipos MS/MZ/SZ	MM	Total
Leve	5	35	40
Moderado	2	19	21
Severo	2	7	9
Total	9	61	70

$\chi^2_{(3)} = 0,92, p = 0,82$ .  $\chi^2$  = qui-quadrado.

MS = heterozigoto S; MZ = heterozigoto Z; SZ = heterozigoto composto SZ; MM = sem a presença dos dois alelos.

**Tabela 3** - Distribuição dos alelos da alfa-1-antitripsina e a gravidade da doença pulmonar (pacientes separados pela presença ou ausência da mutação  $\Delta F508$ )

Número de alelos $\Delta F508$	Doença pulmonar	MS/MZ/SZ	MM	Total	Teste de Fisher
2	Leve	01	09	10	$p = 1,0$
2	Moderado/Severo	01	06	07	
1	Leve	03	11	14	$p = 1,0$
1	Moderado/Severo	02	10	12	
0	Leve	01	15	16	$p = 1,0$
0	Moderado/Severo	01	10	11	
	Total	9	61	70	

**Tabela 4** - Faixas etárias dos pacientes fibrocísticos e gravidade do quadro pulmonar

Faixa etária/gravidade	Leve	Moderada	Grave	Total
Lactentes < 2 anos	4	0	1	5
Pré-escolares 2-7 anos	22	10	3	35
Escolares > 7 e < 10 anos	7	5	3	15
Adolescentes > 10 anos	7	6	2	15
Total	40	21	9	70

Proteinases teriam efeitos potencialmente deletérios, como a destruição da elastina no pulmão, estimulação na produção de muco, clivagem de imunoglobulinas e fibronectina<sup>7,17</sup>.

Nos casos em que há colonização bacteriana, o efeito deletério desse desequilíbrio é bem estudado. Assim, no processo infeccioso, com a lise dos neutrófilos, a elastase seria liberada no meio extracelular. Essa quantidade elevada de protease liberada poderia atacar a elastina e causar o dano pulmonar. Nos casos de pacientes que teriam, simultaneamente, a FC e a DA1AT, esse desequilíbrio estaria exacerbado e o dano pulmonar poderia ser maior. Com base nesses dados, estudos clínicos do uso de inibidores de elastase neutrofílica, como o uso do aerossol de A1AT no tratamento da FC, têm sido realizados e alcançado algum sucesso<sup>18</sup>.

No entanto, estudos na literatura mostraram que os genótipos MS, SS, MZ da deficiência da A1AT, os quais resultam em deficiência leve a moderada da proteína, não estavam associados com o agravamento da doença pulmonar em pacientes fibrocísticos<sup>10,19,20</sup>. Ao contrário, postularam que a associação dessas duas alterações poderiam apresentar uma melhora significativa da função pulmonar<sup>8,9</sup>, porque a elastase de neutrófilos é uma poderosa enzima proteolítica, capaz de lisar bactérias, como a *Pseudomonas aeruginosa*<sup>7,20,21</sup>. Sugerem que a elastase de neutrófilos e outras proteinases não são somente destrutivas, mas podem também apresentar efeitos benéficos, e que eles são importantes para lisar bactérias e podem baixar a regulação na inflamação, pela inibição na ativação de neutrófilos, pela clivagem de imunoglobulinas, receptores de neutrófilos e complemento e pela indução de apoptose<sup>19,22</sup>. Contudo, parece que o resultado final da ação da elastase no epitélio pulmonar depende do balanço dos efeitos positivos e negativos da elastase. Além disso, no caso dos deficientes de A1AT, esse efeito iria depender da variação da atividade enzimática.

Cabe lembrar, ainda, que a gravidade do quadro pulmonar teria outras variáveis, como os fatores ambientais: idade, estado pancreático, estado nutricional<sup>23,24</sup> e fatores genéticos: variações de DNA em íntrons, genes não identificados fora do locus da FC, uma segunda mutação no mesmo alelo que atenua o efeito da mutação principal<sup>25-28</sup>. Vê-se, portanto, que a manifestação pulmonar teria características multifatoriais.

Neste estudo, o primeiro realizado no Brasil sobre a associação entre a DA1AT e FC, não se encontrou diferença significativa quanto à gravidade do quadro pulmonar da FC e a distribuição de alelos deficientes da A1AT. Quando os pacientes foram separados pela presença de dois alelos, um alelo e nenhum alelo da mutação  $\Delta F508$  e comparou-se com o quadro pulmonar, não se encontrou diferença estatística, o que comprova não haver uma relação entre a presença da mutação  $\Delta F508$ , a DA1AT e o quadro pulmonar.

É importante salientar que se detectou apenas um paciente com o genótipo SZ, no qual haveria uma deficiência enzimática moderada; os demais foram todos heterozigotos para o alelo S ou para o alelo Z. Portanto, como a frequência dos homozigotos mutantes S e Z e do heterozigoto composto SZ foi baixa na população de portadores da FC, concluiu-se que a DA1AT não desempenhou, nos pacientes estudados, um papel importante na manifestação pulmonar da FC nesta casuística, por se tratar de uma amostra pequena.

Vale ressaltar que nada se pode afirmar com relação aos genótipos SS, ZZ ou SZ, uma vez que esses não foram encontrados no grupo estudado. Portanto, a amostra deverá ser ampliada para maior análise, através de estudos multicêntricos.

## Agradecimento

O estudo dessa pesquisa foi apoiado pela Fapesp (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo).

## Referências

1. Cystic fibrosis mutation database. [www.genet.sickkids.on.ca/cftr/](http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/).
2. Vankeerberghen A, Cuppens H, Cassiman JJ. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: an intriguing protein with pleiotropic functions. *J Cystic Fibr.* 2002;1:13-29.
3. Pelmutter DH. Clinical manifestations of alpha-1-antitrypsin deficiency. *Gastroenterol Clin N Am.* 1995;24:27-43.
4. Lai EC, Kao FT, Law ML, Woo SL. Assignment of the alpha-1-antitrypsin gene and a sequence-related gene to human chromosome 14 by molecular hybridization. *Am J Hum Genet.* 1983;35:385-92.
5. Faber JP, Poller W, Weidinger S, Kirchgesser M, Schwaab R, Bidlingmaier F. Identification and DNA sequence analysis of 15 new alpha-1-antitrypsin variants, including two PI\*Q0 alleles and one deficient PI\*M allele. *Am J Hum Genet.* 1994;55:1113-21.
6. Pierce JA. Antitrypsin and emphysema: perspectives and prospects. *J Am Med Ass.* 1988;259:2890-5.
7. Sommerhoff CP, Nadel JA, Basbaum CB, Caughey GH. Neutrophil elastase and cathepsin G stimulate secretion from cultured bovine airway gland serous cells. *J Clin Invest.* 1990;85:682-9.
8. Mahadeva R, Westerbeek RC, Perry DJ, Lovegrove JU, Whitehouse DB, Carroll NR, et al. Alpha1 antitrypsin deficiency alleles, the Taq- I G→A allele and cystic fibrosis lung disease. *Eur Respir J.* 1998;11:873-9.
9. Mahadeva R, Sharples L, Roos-Russell RI, Webb AK, Bilton D, Lomas DA. Association of Alpha1 antichymotrypsin deficiency with milder lung disease in patients with cystic fibrosis. *Thorax.* 2001;56:53-8.
10. Frangolias DD, Ruan J, Wilcox PJ, Davidson AG, Wong LT, Berthiaume Y, et al. Alpha-1-antitrypsin deficiency alleles in cystic fibrosis lung disease. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003;29:390-6.
11. Gibson LE, Cooke RE. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics.* 1959;23:545-9.

12. Shwachman H, Kulczycki LL. Long term study of 105 patients with cystic fibrosis: studies made over a five to fourteen year period. *Am J Dis Child.* 1958;96:6-15.
13. Andresen BS, Knudsen I, Jensen PK, Rasmussen K, 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.* 1992;38:2100-3.
14. Pagotto RC. Polimorfismo da Alfa1-1- antitripsina humana em populações brasileiras [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 1993.
15. Alvarez AE, Ribeiro AF, Hessel G, Bertuzzo CS, Ribeiro JD. Fibrose Cística em um centro de referência no Brasil: características clínicas e laboratoriais de 104 pacientes e sua associação com o genótipo e a gravidade da doença. *J Pediatr (Rio J).* 2004;80:371-9.
16. Domee Espinoza MD. Fibrose Cística em jovens e adultos do hospital das clínicas da UNICAMP [dissertação]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 1998.
17. Suter S, Schaad UB, Morgenthaler JJ. Fibronectin-cleaving activity in bronchial secretions of patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis.* 1988;158:89-100.
18. Allen ED. Opportunities for the use of aerosolized alpha 1 antitrypsin for the treatment of cystic fibrosis. *Chest.* 1996;110:S256S-60.
19. Doring G, Krogh-Johansen H, Weidinger S. Allotypes of alpha 1 antitrypsin in patients with cystic fibrosis, homozygous and heterozygous for delta F508. *Pediatr Pulmonol.* 1994;18:3-7.
20. Meyer P, Braun A, Roscher AA. Analysis of the two common alpha-1-antitrypsin deficiency alleles PiMS and PiMZ as modifiers of *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility in cystic fibrosis. *Clin Genet.* 2002;62:325-7.
21. Belaaouaj A, McCarthy R, Baumann M. Mice lacking neutrophil elastase reveal impaired host defense against gram negative bacterial sepsis. *Nature Med.* 1998;4:615-8.
22. Mahadeva R, Stewart S, Bilton D, Lomas DA. Alpha1 antitrypsin deficiency alleles and severe cystic fibrosis lung disease. *Thorax.* 1998;53:1022-4.
23. Mahadeva R, Lomas DA. Secondary genetic factors in cystic fibrosis lung disease. *Thorax.* 2000;55:446.
24. McKone EF, Emerson SS, Edwards KL, Aitken ML. Effect of genotype on phenotype and mortality in cystic fibrosis: a retrospective cohort study. *Lancet.* 2003;361:1671-6.
25. Kerem E, Kerem B. Genotype-phenotype correlations in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.* 1996;22:387-95.
26. Dork T, Wulbrand U, Richter T. Cystic fibrosis with three mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Hum Genet.* 1991;87:441-6.
27. Bienvenu T. Les bases moléculaires de l'hétérogénéité phénotypique dans la muviscidose. *Ann Biol Clin.* 1997;55: 113-21.
28. Accurso FJ, Sontag MK. Seeking modifier genes in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;167:289-93.

## Correspondência:

Carmen Sílvia Bertuzzo

Shigeo Mori, 1710, Barão Geraldo

CEP 13082-084 – Campinas, SP

Tel.: (19) 3788.8907

Fax: (19) 3788.8909

E-mail: bertuzzo@unicamp.br ou ribeirojd@terra.com.br