

UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR

FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA

DÉFICE DE ALFA-1 ANTITRIPSINA: DO GENE AO TRATAMENTO

Vanessa Alexandra Costa Pires



Universidade da Beira Interior
Covilhã | Portugal

Covilhã, 2008

UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR

FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA

**DÉFICE DE ALFA-1 ANTITRIPSINA:
DO GENE AO TRATAMENTO**

Vanessa Alexandra Costa Pires

**Orientadora:
Dr.^a Maria Filomena Luís**

Covilhã, 2008

Dissertação como requisito parcial
para provas de Mestrado do I
Mestrado Integrado em Medicina da
Faculdade de Ciências da Saúde da
Universidade da Beira Interior

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho só foi possível devido à colaboração de algumas pessoas sem as quais seria difícil a sua execução. Desde modo desejo expressar o meu agradecimento:

À Doutora Maria Filomena Luís que aceitou orientar esta dissertação, pela disponibilidade demonstrada, apoio, o espírito crítico e a supervisão que constituíram ajudas preciosas durante o tempo em que decorreu este trabalho;

À minha mãe pelo contínuo incentivo e apoio incondicional;

Aos amigos pelo apoio, motivação e por terem compreendido a minha impaciência;

Aos colegas por me ouvirem e se disponibilizarem sempre que lhes era solicitada ajuda.

RESUMO

O défice de alfa-1 antitripsina é uma doença hereditária, causada por uma alteração genética localizada no braço longo do cromossoma 14. Ainda que pouco diagnosticada, trata-se de um distúrbio relativamente comum, existindo uma multiplicidade de alelos e um espectro alargado de doença em termos de manifestações clínicas. Pode existir essencialmente atingimento pulmonar, hepático ou cutâneo. O desenvolvimento de patologia pulmonar está relacionado com níveis de AAT insuficientes no sangue, que conduzem ao desenvolvimento de enfisema pulmonar em idades precoces (3^a e 4^a décadas de vida). O diagnóstico é geralmente tardio, em relação à ocorrência de sintomas. O diagnóstico deve ser evocado na presença de enfisema em idades jovens. Além da correcção de factores modificáveis (comportamentos e estilos de vida), da imunização adequada, do tratamento precoce das infecções pulmonares e da terapêutica de alívio sintomático, existe actualmente a terapêutica substitutiva e, em casos seleccionados, técnicas cirúrgicas (redução de volume e transplante). O estudo familiar permite o diagnóstico precoce, aumenta a esperança e a qualidade de vida, já que permite actuar, modificando o mais precocemente possível, factores micro ambientais potencialmente agravantes.

No presente trabalho procede-se inicialmente à revisão da literatura, sobre a deficiência de alfa-1 antitripsina e seguidamente à apresentação de um caso clínico de um homem de 46 anos com défice severo de alfa-1 antitripsina, com fenótipo Pi ZZ com atingimento pulmonar e hepático. Efectuou-se estudo familiar, sendo submetido a várias modalidades terapêuticas, com progressão da doença, vindo a falecer após transplante pulmonar. Efectua-se a discussão da forma de apresentação da doença, diagnóstico, modalidades terapêuticas, e estudo familiar, do caso clínico com base na literatura, concluindo-se que apesar do esforço efectuado no sentido de se melhorar o

prognóstico a curto prazo, estamos ainda longe de conseguir alterar o curso natural da doença a longo prazo.

Palavras-chave: déficit de alfa-1 antitripsina, enfisema, fenótipo PiZZ, terapêutica de substituição, transplante pulmonar

ÍNDICE

CAPÍTULO I. INTRODUÇÃO

1.1. Introdução.....	1
1.2. Objectivos.....	2
1.3. Metodologia.....	3

CAPÍTULO II. JUSTIFICAÇÃO DO TEMA 5

CAPÍTULO III. CONTEXTUALIZAÇÃO TEÓRICA DA TEMA

3.1. Aspectos genéticos	7
3.1.1. Estrutura do gene e da proteína AAT	7
3.1.2. Genótipos e fenótipos de Pi	8
3.1.3. Origem e evolução do gene AAT	10
3.1.4. Relação entre a concentração sérica de AAT e o risco de desenvolvimento de doença.....	12
3.2. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS	18
3.2.1. Distribuição Genética do défice de AAT	22
3.2.2. Análise da importância dos dados epidemiológicos.....	25
3.3. FISIOPATOLOGIA MOLECULAR	27
3.3.1. Função normal de alfa-1 antitripsina	27
3.3.2. Processo de polimerização.....	30
3.3.3. Mecanismo molecular da doença pulmonar	31
3.3.3.1. Produção local de AAT no pulmão	34
3.3.3.2. Propriedades pró-inflamatórias da alfa-1 antitripsina	35
3.3.4. Mecanismo molecular da doença hepática	37
3.4. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	42
3.4.1. Doença pulmonar.....	42
3.4.2. Doença hepática.....	46
3.4.3. Outras Manifestações Clínicas	48
3.5. HISTÓRIA NATURAL DO ENFISEMA NO DÉFICE DE ALFA-1 ANTITRIPSINA	51
3.5.1. Factores Genéticos.....	51
3.5.2. Factores ambientais	54
3.5.3. Causas de mortalidade	58
3.6. DIAGNÓSTICO	59
3.6.1. Exames Laboratoriais	59
3.6.1.1. Testes Quantitativos	60
3.6.1.2. Testes Qualitativos	61
3.6.1.3. Outros testes de diagnóstico	63
3.6.2. Testes genéticos familiares e rastreio populacional	63
3.6.3. Exames Imagiológicos.....	65
3.6.4. Testes de função pulmonar	67
3.7. TRATAMENTO	68
3.7.1. Tratamento base para a DPOC	68
3.7.2. Terapêutica específica para a doença pulmonar	69
3.7.2.1. Terapêutica de substituição da AAT	69
3.7.2.2. Cirurgia de redução de volume pulmonar	79
3.7.2.3. Transplante pulmonar	80

3.7.2.4. Transplante pulmonar versus cirurgia de redução de volume pulmonar.....	81
3.7.3. Tratamento para a doença hepática	82
3.7.4. Novos tratamentos	84
3.7.4.1. Terapia genética.....	84
3.7.4.2. Terapias modificadoras da polimerização e secreção de AAT.....	85
3.7.4.3. Outros tratamentos.....	86
CAPÍTULO IV. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE UM CASO CLÍNICO	
4.1. Apresentação do caso clínico	89
4.2. Discussão do caso clínico	95
CAPÍTULO V.	
CONCLUSÕES/SUGESTÕES.....	101
BIBLIOGRAFIA.....	104
ANEXO	117

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura III-1. Estrutura terciária da proteína alfa-1 antitripsina.....	7
Figura III-2. Representação esquemática do gene codificador da proteína alfa-1 antitripsina.....	8
Figura III-3. Filogenia dos alelos da alfa-1 antitripsina.....	11
Figura III-4. Frequências genéticas na Europa das variantes PiS (A) e PiZ (B).....	23
Figura III-5. Representação do mecanismo de ligação da protease à proteína alfa-1 antitripsina (AAT).....	29
Figura III-6. Efeito da mutação Z na conformação final da molécula de alfa-1 antitripsina.....	31
Figura III-7. Previsão da concentração de alfa-1 antitripsina (AAT) de pacientes com diferentes fenótipos a nível do interstício pulmonar.....	33
Figura III-8. Processo de quimioatração neutrofílica em pacientes com a mutação Z no défice de alfa-1 antitripsina.....	36
Figura III-9. Modelo proposto para a patogénese do enfisema em pacientes com a variante Z do défice de AAT.....	37
Figura III-10. Variação do declínio no FEV ₁ em pacientes com deficiência de alfa-1 antitripsina (AAT) com o tabagismo.....	56
Figura III-11. Algoritmo de diagnóstico para a deficiência de alfa-1 antitripsina (AAT).....	62
Figura III-12. Radiografia pósterio-anterior do tórax de um indivíduo com défice de alfa-1 antitripsina (AAT) por mutação Z.....	65
FIGURA III-13. Secções de uma tomografia computadorizada torácica de um paciente com défice de alfa-1 antitripsina com fenótipo ZZ. (A) Corte seccional a nível das bases pulmonares mostra uma alteração enfisematosa mais pronunciada que ao nível do ápice do pulmão (B).....	66
Figura IV-1. Evidência de sinais de hiperinsuflação, acompanhada de áreas de maior hipertransparência nas bases pulmonares na telerradiografia do tórax. (A) Perfil Postero-anterior (B) Perfil Esquerdo.....	90
Figura IV-2. TC torácica de alta resolução com áreas de enfisema a nível das bases pulmonares.....	91
Figura IV-3. Heredograma familiar do indivíduo com fenótipo PiZZ.....	92

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela III-1. Composição de aminoácidos de cada um dos alelos da alfa-1 antitripsina em cada uma das posições variáveis.....	9
Tabela III-2. Variantes seleccionadas do <i>locus</i> Pi e respectivas características, incluindo tipo de mutação, alteração celular e doença associada.....	13
Tabela III- 3. Características dos fenótipos comuns de alfa-1 antitripsina, respectivas concentrações e risco de doença pulmonar e hepática.....	17
Tabela III-4. Relação entre o número de casos esperados e diagnosticados com défice de AAT (PiZZ e PiSZ).....	21
Tabela III-5. Manifestações clínicas do défice de alfa-1-antitripsina.....	50
Tabela III-6. Técnicas comuns de diagnóstico.....	59
Tabela III-7. Condições associadas que devem ser objecto de investigação na pesquisa da concentração sérica de alfa-1 antitripsina.....	61
Tabela III-8. Candidatos à determinação do fenótipo e genótipo.....	62
Tabela III-9- Critérios para iniciar a terapêutica de substituição de AAT.....	75
Tabela III-10. Proposta de algoritmo para a selecção de pacientes para cirurgia de redução de volume pulmonar versus transplante pulmonar em pacientes com DPOC.....	82
Tabela III-11. Formas de tratamento.....	83
Tabela IV-1. Evolução dos parâmetros funcionais respiratórios desde 2002 até 2007.....	93
Tabela IV- 2. Custo total da terapêutica substitutiva de alfa-1 antitripsina (Prolastin®) deste paciente.....	94

CAPÍTULO I. INTRODUÇÃO

CAPÍTULO I. INTRODUÇÃO

1.1.Introdução

A deficiência de alfa-1 antitripsina (AAT) foi descrita numa rapariga do Alasca que faleceu há cerca de 800 anos (Kiernan, 1995) e, parece ter contribuído para a morte prematura de Frederic Chopin em 1849 (Kuzemko, 1994). É uma doença hereditária, responsável por patologia respiratória e hepática, tendo sido descrita como entidade clínica a primeira vez em 1963 por Laurell e Ericksson. Laurell ao analisar amostras de proteínas séricas, sujeitas a electroforese por migração em placas de gel, de diversos indivíduos, notou a ausência da banda correspondente à globulina α_1 em 5 de 1500 amostras (Laurell, 1963). Durante a investigação posterior levada a cabo por Eriksson, este descreveu que três de cinco pacientes apresentavam enfisema nas idades de 35, 38 e 44 anos e, que um deles tinha história familiar de enfisema (Laurell & Eriksson, 1963). Estabeleram assim as características clínicas principais da deficiência de AAT: ausência de uma proteína na região α_1 , enfisema que aparece em idade jovem e predisposição genética (Carrell, 2004).

A partir desta primeira descrição realizada há pouco mais de 40 anos, têm sido feitos grandes avanços sobre a deficiência de AAT, incluindo: o conhecimento da estrutura da proteína, o mecanismo de ligação ao seu maior substrato – elastase neutrofilica, o mecanismo responsável pela sua acumulação a nível hepático, as principais manifestações clínicas e a história natural desta patologia. Contudo, outros fenómenos continuam ainda por esclarecer, nomeadamente, o mecanismo preciso da doença hepática, a clarificação dos determinantes do enfisema, para além do tabagismo e da exposição a factores ocupacionais, assim como, os modificadores genéticos responsáveis pela expressão da própria doença.

O presente trabalho foi dividido essencialmente em duas partes. Na primeira parte, efectuou-se uma revisão da literatura sobre vários aspectos do défice de alfa-1 antitripsina (AAT), incidindo sobre a genética, a epidemiologia, a fisiopatologia molecular, as manifestações clínicas e a história natural e, ainda, as estratégias de diagnóstico, os exames complementares e as modalidades terapêuticas desta importante patologia. A segunda parte é dedicada à descrição de um caso clínico de défice de AAT num doente com 46 anos de idade, analisando a forma de apresentação clínica, o diagnóstico, a terapêutica, o estudo familiar e a história natural da doença.

1.2. Objectivos

Este trabalho visa contribuir para uma melhor caracterização da deficiência de alfa-1 antitripsina (AAT). Os objectivos do presente trabalho resumem-se nos seguintes pontos fundamentais:

- 1) Alertar para o diagnóstico de enfisema por défice de alfa-1 antitripsina como um diagnóstico diferencial em doentes com quadros de doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC) em idade jovem;
- 2) Salientar a importância do estudo familiar, permitindo um diagnóstico precoce e aumentando a esperança e a qualidade de vida dos indivíduos que padecem deste distúrbio;
- 3) Discutir se a actuação sobre os determinantes ambientais potencialmente agravantes da doença, pode alterar o curso natural da doença, consensualmente mais eficazes que terapêuticas onerosas e sofisticadas em situações avançadas da doença.
- 4) Avaliar o papel das terapêuticas mais recentes actualmente disponíveis.

1.3. Metodologia

Para a elaboração desta dissertação, no que concerne à pesquisa bibliográfica sobre a temática em questão, foi utilizado como motor de busca o Google e as bases de dados do MEDLINE (PUBMED), e-Medicine, UpToDate e Cochrane Library, de 1963 a 2008, utilizando como termos para a pesquisa: “alpha-1 antitrypsin deficiency”, “phenotype PiZZ”, “emphysema”, “augmentation therapy” e “lung transplantation”. Seleccionaram-se artigos em língua portuguesa, inglesa e espanhola, escolhendo artigos com ‘abstract’ e/ou ‘fulltext’.

Foi solicitada, à Administração Hospitalar e à Comissão de Ética do Hospital de Sousa Martins - Guarda, a autorização da consulta do processo clínico de um doente sugerido pela minha tutora – Dr.^a Filomena Luís (ANEXO).

CAPÍTULO II. JUSTIFICAÇÃO DO TEMA

CAPÍTULO II. JUSTIFICAÇÃO DO TEMA

A *World Health Organization* (WHO) estima que em 2020 a doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC) represente a 5ª causa de mortalidade em todo o Mundo, constituindo, assim, um importante problema de saúde pública.

A actualização de 2007 do *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease* (GOLD), chama a atenção para a necessidade da pesquisa sistemática do défice de AAT num subgrupo de pacientes com DPOC em idade jovem (inferior a 45 anos) ou que apresentem história familiar relevante da doença. Este subgrupo de pacientes beneficia de terapêutica de reposição de AAT, além do tratamento convencional da DPOC.

O défice de alfa-1 antitripsina, considerado no passado como uma patologia rara, é hoje, segundo os dados epidemiológicos disponíveis, um dos distúrbios genéticos mais prevalentes, sendo frequentemente subdiagnosticado na prática clínica.

O diagnóstico em fases tardias acompanha-se de um prognóstico sombrio, uma vez, que ocorre declínio acelerado da função pulmonar e insuficiência respiratória invalidante com escassa resposta à terapêutica de substituição. Por isso, estes doentes são frequentemente candidatos a transplante pulmonar.

O diagnóstico precoce é o factor determinante na melhoria do prognóstico, uma vez que a história natural deste distúrbio genético é afectada de forma marcante por factores ambientais, potencialmente modificáveis. A identificação atempada representa uma excelente oportunidade para exercer com sucesso o aconselhamento preventivo, nomeadamente, quanto à evicção do tabagismo activo, restrição ao tabagismo passivo e redução da exposição ocupacional ou o aconselhamento genético.

CAPÍTULO III. CONTEXTUALIZAÇÃO TEÓRICA DO TEMA

CAPÍTULO III. CONTEXTUALIZAÇÃO TEÓRICA DO TEMA

3.1. ASPECTOS GENÉTICOS

3.1.1. Estrutura do gene e da proteína AAT

A alfa-1 antitripsina (AAT) é uma glicoproteína de cadeia única, de baixo peso molecular (52-kDa) composta por 394 aminoácidos e três cadeias carboidratadas laterais ligadas a resíduos de asparagina (Brantly *et al.*, 1988). A figura III-1 mostra a estrutura da proteína AAT, que se baseia em 3 folhas β e num domínio móvel reactivo. O sítio activo (P1) é uma ligação péptica simples, metionina-serina (Met³⁵⁸-Ser³⁵⁹), da sequência da proteína, que permite a ligação à protease alvo (Schroeder *et al.*, 1985).

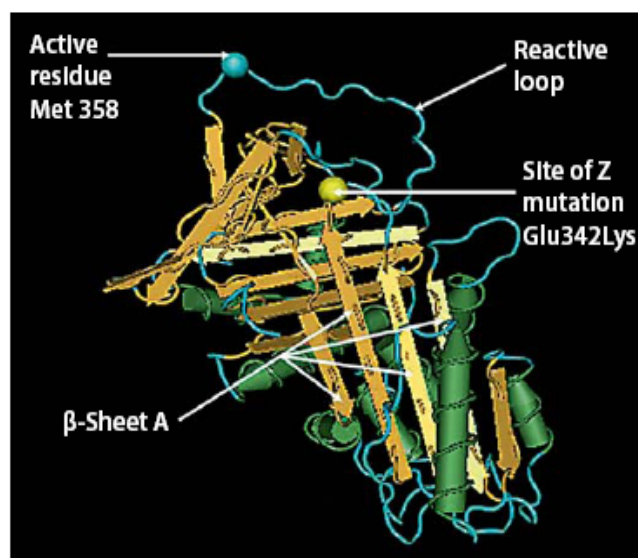


Figura III-1. Estrutura terciária da proteína alfa-1 antitripsina (Retirado de Wood & Stockley, 2007).

O *locus* do inibidor de proteases (Pi) está localizado no braço longo do cromossoma 14q32.1. O gene consiste num par de alelos (um de cada progenitor) com uma extensão de 12.2 Kb e está organizado em 6 intrões, 3 exões não codificantes (IA, IB, IC) na região 5' e 4 exões codificantes (II, III, IV e V) (Cox *et al.*, 1982) (figura III-

2). O gene foi totalmente sequenciado e clonado (Lai *et al.*, 1983), e mostra um padrão autossômico co-dominante de transmissão genética (Brantly *et al.*, 1988).

O fígado é o principal local de produção de Pi, mas também há níveis baixos de produção de tipos celulares extra-hepáticos, incluindo neutrófilos, monócitos sanguíneos e macrófagos tecidulares (Permuter *et al.*, 1985; Crystal, 1989; du Bois *et al.*, 1991). Nos hepatocitos, a transcrição inicia-se no exão IC, enquanto os fagócitos mononucleares utilizam locais de iniciação de transcrição nos exões IA e IB, originando grande variedade de formas alternativas de mRNA. A região codificadora do sítio activo é o exão V (Brantly *et al.*, 1988).

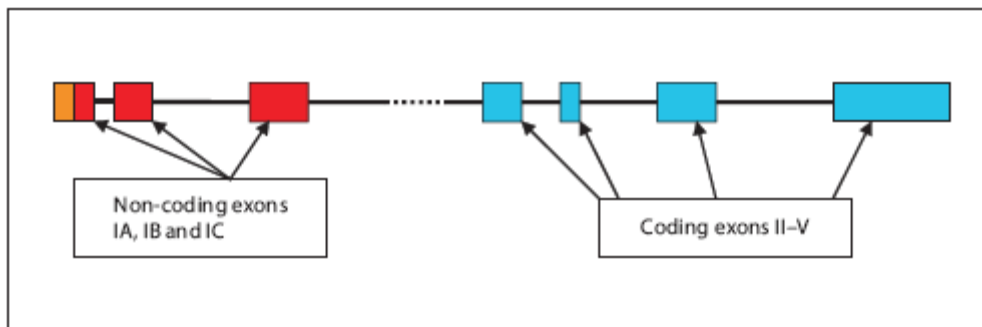


Figura III-2. Representação esquemática do gene codificador da proteína alfa-1 antitripsina (Retirado de Wood & Stockley, 2007).

3.1.2. Genótipos e fenótipos de Pi

A presença de mutações pontuais pode conduzir a alterações conformacionais da proteína AAT, o que condiciona a existência de variantes genéticas, que estão na base da geração das formas mais comuns da deficiência de AAT. Assim, o *locus* Pi é altamente polimórfico com mais de 200 variantes alélicas descritas que podem ser, na sua maior parte, discriminadas por técnicas de focagem isoelétrica. Nem todas as variantes estão associadas a doença (Brantly *et al.*, 1988). Tradicionalmente, os diferentes alelos da proteína AAT eram classificados, com base na sua velocidade de migração num gel de electroforese, através de um sistema codificador por letras. O alelo

normal da AAT migra no meio (M) e as variantes são designadas de A-L, se migram mais rapidamente que M e de N-Z se migram mais lentamente. Portanto, o alelo M resulta numa proteína com taxa média de migração; o alelo Z apresenta a mais lenta taxa de migração (Fagerhol & Laurell, 1970). Tais diferenças na migração dos vários alelos de AAT decorrem de variações na carga proteica por alteração da sua composição em aminoácidos (Fagerhol & Laurell, 1967). À medida que novas variantes vão sendo descobertas, a classificação passa a basear-se na determinação do seu ponto isoeléctrico (IEF) numa fina camada de gel de policrilamida num gradiente de pH entre 4 (cátodo) e 5 (ânodo) (Brantly, 1996). Neste caso, aquelas que migram em direcção ao ânodo são designadas com as letras iniciais do alfabeto, enquanto aquelas que migram em direcção ao cátodo são denominadas com as últimas letras do alfabeto. O alelo normal, presente em 90% dos indivíduos normais, é denominado de PiM. O genótipo MM indica indivíduos que são homozigóticos para o alelo normal M e, a forma heterozigótica e homozigótica para o gene Z é, respectivamente, MZ e ZZ (Brantly *et al.*, 1988).

A análise do DNA responsável pela síntese de Pi permitiu identificar as diferenças na sequência de aminoácidos responsáveis pela variação genética observada nos seus principais produtos génicos. Assim, foi possível identificar dois subtipos comuns de M1 (M1Ala213 e M1Val213) – que apenas podem ser distinguidos por análise de DNA – e demonstrar que os alelos comuns da AAT resultam de variações nos aminoácidos nas posições 101, 213, 264, 342 e 376 (tabela III-1) (Nukima *et al.*, 1996).

Tabela III-1. Composição de aminoácidos de cada um dos alelos da alfa-1 antitripsina em cada uma das posições variáveis (Adaptado de Nukima *et al.*, 1996).

<i>Produto génico</i>	<i>Resíduo na posição 101 (exão II)</i>	<i>Resíduo na posição 213 (exão III)</i>	<i>Resíduo na posição 264 (exão III)</i>	<i>Resíduo na posição 342 (exão V)</i>	<i>Resíduo na posição 376 (exão V)</i>
M1 Ala 213	Arg	Ala	Glu	Glu	Glu
M1 Val 213	Arg	Val	Glu	Glu	Glu
M2	His	Val	Glu	Glu	Asp
M3	Arg	Val	Glu	Glu	Asp
S	Arg	Val	Val	Glu	Glu
Z	Arg	Ala	Glu	Lys	Glu

As variantes alélicas podem também ser classificadas em quatro categorias com base no nível sérico e função da AAT (American Thoracic Society/European Respiratory Society Statement- ATS/ERS, 2003):

Normal: alelo M (M1→M4), o mais comum, sendo caracterizado por níveis séricos normais de AAT (superiores a 20 µmol/L); não se associa a qualquer risco de doença pulmonar ou hepática;

Deficiente: tipicamente os alelos deficitários conduzem a concentrações séricas de AAT inferiores a 20 µmol/L e, em alguns casos (ex.: variante Z), a actividade funcional diminuída da AAT. Esta categoria inclui as variantes deficitárias mais frequentes, S e Z, e um número de variantes menos frequentes incluindo, as variantes M-like (M_{malton}, M_{procida}, etc) (Brantly, 1996).

Nula: são variantes raras associadas com AAT circulante não detectável na circulação, por erros de transcrição que interrompem a sua síntese; associada a risco acrescido de doença pulmonar (Stoller & Aboussouan, 2005).

Disfuncional: conduzem a função anormal da proteína AAT, isto é, com reduzida ligação à elastase neutrofílica (como na variante F) ou, como na variante Pittsburg, em que a anormalidade estrutural causa uma alteração na sua função, actuando não como uma proteína antielastolítica, mas como um inibidor da trombina provocando diátese hemorrágica (Owen *et al.*, 1983).

3.1.2. Origem e evolução do gene AAT

O gene de AAT é um gene ancestral com interesse particular do ponto de vista antropológico. Os alelos M são mais antigos, estimando-se que os alelos M1 (Val²¹⁵) e M1 (Ala²¹³) sejam os mais ancestrais. O conhecimento da composição molecular dos diferentes alelos permitiu estabelecer uma sequência filogenética em que M1Ala213 é

considerado o alelo mais antigo por apresentar maior homologia com as sequências ortólogas de Primatas não humanos (figura III-3) (Brantly *et al.*, 1988; Nukima *et al.*, 1996).

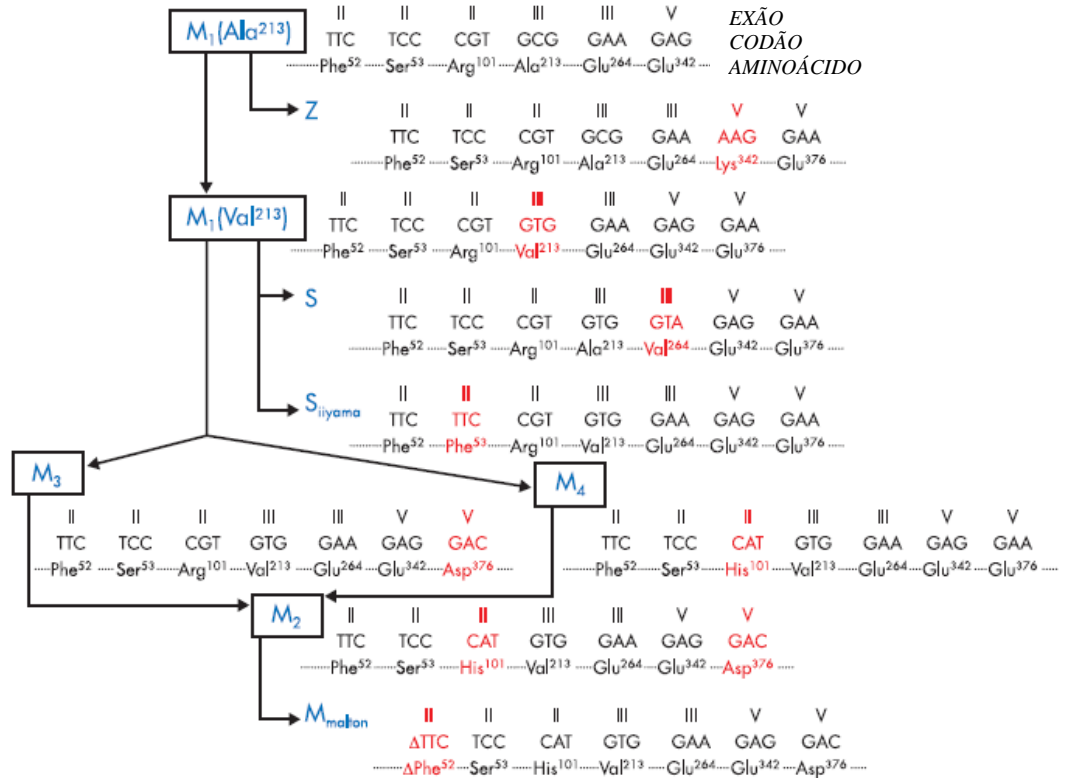


Figura III-3. Filogenia dos alelos da alfa-1 antitripsina (Adaptado de Luisetti & Seersholm, 2004)

Estima-se que o alelo PiZ provavelmente tenha tido origem na Europa do Norte (mais precisamente na Escandinávia) (Cox *et al.*, 1985). Os dados disponíveis sugerem que este surgiu há cerca de 107-135 gerações atrás e pode ter-se propagado durante o período Neolítico. O alelo PiS é mais antigo, tendo ocorrido há 279-470 gerações; a frequência elevada observada na Península Ibérica sugere que pode ter tido origem nesta região e, mais precisamente na população portuguesa (Seixas *et al.*, 2001).

3.1.3. Relação entre a concentração sérica de AAT e o risco de desenvolvimento de doença

As mutações que caracterizam os diferentes alelos de Pi podem causar alterações significativas na concentração sérica da proteína. Os alelos M mais comuns estão associados a valores considerados normais. Os produtos génicos S e Z têm níveis circulantes que correspondem, respectivamente, a 60% e 15% daqueles valores e, originam constelações genotípicas em que se verifica a deficiência profunda da proteína, a que correspondem aumentos do risco de ocorrência de determinadas condições patológicas (Cox, 1995). A diminuição da concentração plasmática está sobretudo associada a substituições de aminoácidos que alteram a estabilidade conformacional da proteína e causam a sua retenção intra-hepática, ou o aumento da sua susceptibilidade a processos de degradação intra e extracelulares (Crystal, 1990). No caso da variante Z, o que se verifica é mais um problema de secreção, ao contrário de um problema de síntese, como é o caso da variante S. A mutação, neste caso, resulta da substituição do resíduo de lisina (Lys) pelo resíduo de glutamato (Glu) na posição 342, localizada na base do centro activo (Tabela III-1). A subsequente alteração conformacional da molécula, induz a polimerização da proteína e leva à acumulação no retículo endoplasmático dos hepatocitos de cerca de 80-90% da proteína produzida, entrando apenas o restante (10-20%) directamente na circulação (Lomas *et al.*, 1992). No caso da variante S ocorre substituição do resíduo valina (Val) pelo resíduo de glutamato (Glu) na posição 264 (tabela III-1). Esta mutação também aumenta a instabilidade conformacional e a susceptibilidade à polimerização. Contudo, a retenção intracelular associada é muito mais moderada, ficando retida cerca de 40-50% da molécula formada e não levando à formação de grânulos visíveis (Elliot *et al.*, 1996; Mahadeva *et al.*, 1999). O processo de polimerização é igualmente responsável pelas formas PiM_{malton}

(delecção ⁵²Fenilalanina) (Matsunaga *et al.*, 1990) e S_{iiyama} (Serina53Fenilalanina) do défice de AAT (Seyama *et al.*, 1991).

Na tabela III-2 estão representados alguns dos polimorfismos anteriormente referidos.

Tabela III-2. Variantes seleccionadas do *locus* Pi e respectivas características, incluindo tipo de mutação, alteração celular e doença associada. (Adaptado de DeMeo & Silverman, 2004)

<i>Alelo Pi</i>	<i>Tipo de mutação</i>	<i>Alteração celular</i>	<i>Doença associada</i>
Alelos Normais			
M (vários subtipos)	Substituição (1bp)	Nenhum	Normal
X _{christchurch}	Substituição (1bp)	Nenhum	Normal
Alelos Deficientes			
S	Substituição (1bp)	Degradação IC	Pulmão
Z*	Substituição (1bp)	Acumulação IC	Pulmão, Fígado
M _{malton}	Delecção (3bp)	Acumulação IC	Pulmão, Fígado
S _{iiyama}	Substituição (1bp)	Acumulação IC	Pulmão
M _{heerlen}	Substituição (1bp)	Degradação IC	Pulmão
M _{procida}	Substituição (1bp)	Degradação IC	Pulmão
M _{mineral springs*}	Substituição (1bp)	Degradação IC	Pulmão
Alelos nulos			
QO _{granite falls}	Delecção (1bp)	Codão stop; sem _m RNA	Pulmão
QO _{ludwigshafen}	Substituição (1bp)	Sem proteína	Pulmão, Fígado
QO _{hongkong}	Delecção (2bp)	Truncada; IC acumulação	Pulmão
QO _{isola di procida}	Delecção (17Kbp)	Delecção de regiões codificantes; sem _m RNA	Pulmão
Alelos disfuncionais			
Pittsburgh	Substituição (1bp)	Actividade anti-trombina 3	Diátese hemorrágica
M _{mineral springs*}	Substituição (1bp)	Inibição defeituosa da NE	Pulmão
Z*	Substituição (1bp)	Inibição defeituosa da NE	Pulmão, Fígado

bp= par(es) de base(s); IC= intracelular; NE= elastase neutrofílica; _mRNA= RNA mensageiro;

Muitas das variantes alélicas nulas são classificadas como QO em vez de Pi. Os alelos nulos resultam de um conjunto mais variado de mutações que incluem a substituição de aminoácidos, a delecção parcial ou total do gene, ou a formação de codões de finalização prematuros, com síntese de proteínas truncadas ou degradação de mRNA (Lee & Brantly, 2000). Por exemplo, a delecção de uma simples base no codão correspondente ao aminoácido triptofano (Trip) resulta na formação de um codão stop, denominando-se o fenótipo resultante de QO_{granite falls} (Nukima *et al.*, 1987). A delecção

de 2 pares de bases no exão IV caracteriza a variante QO_{hong kong}, que igualmente apresenta um codão stop prematuramente, resultando numa proteína truncada (Sifers *et al.*, 1988). Esta molécula fica igualmente retida no retículo endoplasmático do hepatócito, o que conduz à ausência da proteína a nível sérico. Foram ainda descritos mais três alelos nulos, que simultaneamente resultam na formação de codões stop, por substituição, deleção ou adição de base(s) nas regiões codificantes (Garver *et al.*, 1986). Uma deleção significativa, compreendendo 17 pares de bases, incluindo os exões II-IV ocorre na variante QO_{isola di procida}, causando ausência do mRNA detectável ou produção da proteína AAT (Takahashi & Crystal, 1990).

A combinação dos três principais alelos PiM, PiZ e PiS originam seis classes genóticas principais – PiMM, PiMS, PiSS, PiMZ, PiSZ e PiZZ – que se associam a diferentes expressões fenotípicas e, para algumas classes genóticas, a diferentes padrões de doença (DeMeo & Silverman, 2004).

Os alelos deficitários mais frequentemente implicados na etiopatogénese da doença, são os PiZ – a variante do défice de AAT clássica- e PiS, em particular quando em homozigotia, mas também em heterozigotia composta com o alelo Z. A manifestação clínica mais frequente é o enfisema pulmonar precoce, resultante da destruição das paredes dos alvéolos dos pulmões causada pela perda de protecção da elastina face à acção proteolítica da elastase neutrofílica. A homozigotia para o alelo Z representa cerca de 95% das formas mais graves da deficiência de Pi e é o principal genótipo associado a este tipo de enfisema, conduzindo a um aumento de cerca de 20 vezes o risco de doença relativamente aos indivíduos MM. Nos casos em que envolvem alelos nulos ocorre uma antecipação significativa da idade de aparecimento dos primeiros sintomas de enfisema (Gadek & Crystal, 1983; Cox, 1995; Eriksson, 1986). Observa-se que indivíduos com o fenótipo SZ, cujas concentrações estão abaixo de

11 $\mu\text{mol/L}$, apresentam risco aumentado de enfisema (Turino *et al.*, 1996), Mas aqueles indivíduos em que o valor AAT é superior a 11 $\mu\text{mol/L}$, não parecem estar sob risco de desenvolvimento de enfisema. Assim, surge o denominado “nível mínimo de protecção”. Portanto, um nível sérico de AAT de 11 μM foi estipulado como o nível mínimo indispensável para uma protecção pulmonar adequada (ATS/ERS, 2003). Portanto, todas as outras combinações alélicas que conduzam a níveis séricos inferiores a 11 μM (cerca de 30% da concentração normal) comprometem a barreira antiproteolítica e aumentam o risco de patologia pulmonar, independente dos mecanismos moleculares envolvidos na deficiência (Crystal, 1990). Na prática, o risco de expressão clínica da doença está principalmente restrito ao genótipo PiZZ (96%). Os restantes 4% de indivíduos em risco apresentam variantes deficitárias raras (referidas como M-like ou S-like) ou genótipos nulos muito raros (PiZ(nulo)) (McElvaney *et al.*, 1997; ATS/ERS, 2003).

As causas da deficiência da proteína AAT nos indivíduos PiZ estão já esclarecidas. O gene PiZ é normalmente transcrito e o mRNA resultante é normalmente traduzido. Contudo, a mutação conduz a uma alteração conformacional da proteína recém sintetizada que sofre um atraso no normal pregueamento que ocorre no retículo endoplasmático, permitindo a agregação de muitas moléculas e, a sua deposição anormal nos hepatocitos (Perlmutter, 2000). É esta acumulação anómala, que pode induzir reacções inflamatórias e, que resulta no défice de AAT nos tecidos periféricos. A variante Z na forma homozigótica está associada com o nível plasmático de 10-20% do normal (WHO, 1997). A capacidade da proteína AAT Z como inibidor da elastase encontra-se reduzida a 50-80% (Perlmutter, 2000).

A variante alélica S é clinicamente menos importante. Em indivíduos homozigóticos, a variante S apresenta níveis plasmáticos de cerca de 50-60% do

normal, não estando associada a doença clinicamente significativa (WHO, 1997). A variante S inibe normalmente a elastase dos neutrófilos; não se associa com acumulação intracelular da proteína, que seja clinicamente relevante, mas com aumento da proteólise intracelular da mesma (Brantly *et al.*, 1998). A sua importância clínica limita-se aos casos de heterozigotia com a variante Z ou com uma variante nula, nos quais os níveis séricos de proteína são suficientemente baixos para colocar o indivíduo em risco de lesão proteolítica. Além disso, em caso de heterozigotia com a variante Z há formação de heteropolímeros que podem induzir doença hepática severa. Concluindo, os genótipos de AAT que conferem um maior risco para o desenvolvimento de enfisema pulmonar são aqueles em que os alelos deficientes ou nulos estão combinados em formas homozigóticas ou heterozigóticas (DeMeo & Silverman, 2004).

A segunda consequência clínica mais frequente da deficiência de AAT é constituída por formas de doença hepática, geralmente associadas ao genótipo PiZZ, que podem manifestar-se na infância ou em adultos de idade mais avançada (Crystal, 1990; Cox, 1995; Massi, 1996). A evidência disponível sugere que a patologia hepática resulta dos efeitos tóxicos da acumulação de AAT nos hepatócitos, e não do défice da proteína em circulação (Cox, 1995). As variantes nulas, não estão associadas a doença hepática, uma vez que a proteína AAT não é produzida e, conseqüentemente, não se forma qualquer inclusão hepática (ATS/ERS, 2003).

A tabela III-3 mostra a relação entre as concentrações de AAT e os genótipos. Os valores normais de AAT no sangue rondam 20-53 $\mu\text{M/l}$.

Como é possível observar na tabela III-3, genótipos anormais de AAT estão associados a concentrações subnormais de AAT a nível sérico. As concentrações de AAT são mais elevadas em indivíduos com PiMM ou PiMS e, não existe qualquer diferença entre os níveis de AAT de PiMM, PiMS e PiSS (apenas com risco possível) e

aqueles associados a PiSZ e PiZZ. A única diferença significativa é entre a concentração de AAT e os fenótipos PiSZ e PiZZ (Vidal *et al.*, 2006).

Tabela III- 3. Características dos fenótipos comuns de alfa-1 antitripsina, respectivas concentrações e risco de doença pulmonar e hepática (Adaptado de Vidal *et al.*, 2006)

<i>Fenótipos</i>	<i>Concentração sérica de alfa-1 antitripsina</i>		<i>Risco de enfisema</i>	<i>Risco de doença hepática</i>
	<i>Valor real (mmol/l) (ou μM)</i>	<i>Valor-padrão comercial (mg/dl)</i>		
MM	20-53	150-350	Sem risco	Sem risco
MS	18-52	110-340	Sem risco	Sem risco
MZ	17-33	90-210	Risco possível	Risco aumentado
SS	15-33	100-200	Sem risco	Sem risco
SZ	8-16	75-120	Risco aumentado (20-50%)	Risco aumentado
ZZ	2.5-7	20-45	Alto risco (80-100%)	Alto risco
Nulo-nulo	0	0	Alto risco (100%)	Sem risco

3.2. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

Dois aspectos sintetizam as características epidemiológicas da deficiência de alfa-1 antitripsina (AAT): (1) é um distúrbio relativamente comum; e (2) é frequentemente subdiagnosticado na prática clínica (Stoller & Aboussouan, 2005).

Na Europa e nos Estados Unidos da América (EUA) a deficiência de AAT encontra-se entre uma das doenças fatais hereditárias mais comuns entre os caucasianos. Dois métodos têm sido usados para estimar a frequência da deficiência de AAT: *estudos efectuados na população geral e rastreios dirigidos a grupos específicos* em que o risco de défice é superior à média (*case finding*) (WHO, 1997).

Os rastreios dirigidos a grupos específicos têm sido a estratégia geralmente adoptada em estudos de identificação de casos de deficiência que pretendem minorar as situações correntes de subdiagnóstico e avaliar o impacto da doença (WHO, 1997). Estes estudos envolvem, geralmente, populações de indivíduos adultos com afecções respiratórias como a doença pulmonar obstrutiva crónica e/ou asma e podem ser alargados aos seus familiares. Os casos de deficiência assim identificados têm constituído a base de registos de vários países, com o intuito de caracterizar a história natural da doença e centralizar os cuidados de saúde diferenciados a prestar aos doentes. Assim, a frequência da deficiência de AAT nos Estados Unidos da América pode ser acedida directamente na *National Health Information Survey*, que estimou que cerca de 3.1 milhões de indivíduos americanos apresentam enfisema. Lieberman *et al.*, (1986) avaliaram uma amostra de 965 pacientes com doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC) em que foi feita a pesquisa de défice de AAT; o estudo revelou que 1.9-2.1% daqueles pacientes apresentavam a doença devido ao défice severo de AAT. Aplicando esta prevalência estimada ao número estimado de americanos com enfisema, prevê-se que 59.000 indivíduos apresentem DPOC sintomática devido a défice severo de AAT.

DeSerres *et al.* (2003b), com base em estudos genéticos epidemiológicos, concluíram que a mutação que mais frequentemente causa défice severo de AAT origina o alelo Z. Esse estudo estimou a frequência média do alelo Z numa dada população; este valor foi depois extrapolado ao total da população em risco. No caso dos EUA, estimou-se que 59.047 indivíduos apresentem o fenótipo ZZ. Um outro artigo de DeSerres (2002), uma revisão de 373 coortes com défice de AAT em 58 países, estimou que existem 3-4 milhões de indivíduos em todo o mundo com os fenótipos ZZ, SZ ou SS.

Os estudos efectuados na população geral permitem estimar a prevalência e distribuição geográfica dos alelos que provocam a deficiência e podem ser realizados em amostras com um número limitado de indivíduos, ou envolver programas mais vastos de rastreio neonatal (WHO, 1997). Nestes programas, o principal objectivo é a identificação precoce de casos de deficiência que possam usufruir de estratégias adequadas de prevenção, incluindo a evicção tabágica e, possam ser seguidos longitudinalmente com o fim de esclarecer aspectos da história natural do défice. Apesar das suas vantagens, a relação custo-benefício dos programas de rastreio neonatal e as suas implicações éticas têm vindo a pôr em causa a utilidade e pertinência deste tipo de iniciativas (WHO, 1997). Vários estudos foram levados a cabo (Sveger, 1976; O'Brien *et al.*, 1978; Silverman *et al.*, 1989); sendo que os dois maiores rastrearam 200.000 recém-nascidos na Suécia (Sveger, 1976) e 107.038 recém-nascidos em Oregon (EUA) (O'Brien *et al.*, 1978). No estudo sueco, o número de bebés com a variante Z foi de 122 ou 1 em 1639. No estudo de Oregon, a frequência do fenótipo ZZ foi 3 vezes mais baixa que aquele valor, cerca de 1 em 5097. Combinando os estudos anteriormente referidos, Stoller & Aboussouan (2005) encontraram uma frequência estimada de 1 em 4455 indivíduos e, aplicando esta estimativa para a população de 294.716000 (US Census Bureau 2002) nos EUA, calcularam que o número de indivíduos com o fenótipo

ZZ nos EUA, dos quais se pode esperar o desenvolvimento de enfisema, é de 66.000. Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO), nos Estados Unidos da América cerca de 80.000 a 100.000 indivíduos apresentam o défice de AAT. Isto corresponde a uma prevalência de 1 em cada 3000 indivíduos (0.03%), tornando o défice de AAT tão prevalente quanto a fibrose quística (Miravittles, 2000).

A observação de uma prevalência tão elevada coloca de imediato a seguinte dúvida: por que razão tão poucos indivíduos são identificados com esta entidade clínica? Um aspecto indicativo deste não reconhecimento é, que menos de 10.000 indivíduos nos EUA com défice severo de AAT se encontram a receber tratamento específico para a referida doença (Stoller & Aboussouan, 2005). Parece que o défice é muitas vezes sub-diagnosticado ou não é associado com doença clínica, já que com base em estudos realizados em vários países, persiste uma esmagadora maioria de indivíduos ZZ sem identificação (95%) (tabela III-4). (Stoller *et al.*, 1995; WHO, 1997). De facto, a *British Thoracic Association* efectuou uma análise de todas as amostras sanguíneas contendo o alelo Z, em dois laboratórios de Inglaterra, mostrando que apenas 4.5% dos indivíduos britânicos com o alelo Z foram detectados até 1980 (Tobin *et al.*, 1983). Estimativas mais recentes de oito países a nível mundial (Canadá, Itália, Alemanha, Nova Zelândia, Austrália, Espanha, Suécia e Reino Unido) sugerem que apenas 0.41% e 0.35% dos indivíduos, respectivamente, com os fenótipos ZZ e SZ são reconhecidos (Luisetti & Seersholm, 2004).

Tendo em conta as estimativas previamente apresentadas, é bem patente que esta condição é insuficientemente reconhecida. A comunidade científica internacional, em resposta a uma recomendação em 1996 da OMS sobre o défice de AAT, estabeleceu um registo internacional (*Alpha-1 Foundation*) (AIR) de indivíduos com a referida condição, que agrega os registos nacionais de diferentes países (Luisetti, 2000). Apesar

dos esforços que têm sido feitos para identificar indivíduos com défice de AAT, é bem notório que apenas uma minoria de casos é confirmada (tabela III-4).

Tabela III-4. Relação entre o número de casos esperados e diagnosticados com défice de AAT (PiZZ e PiSZ). Os casos esperados baseam-se em: *Serres et al., 2002* e *Martin et al., 1976*; os casos diagnosticados são do Registo Internacional Alfa-1 (AIR) (Adaptado de *Luisetti & Seersholm, 2004*).

<i>Países</i>	<i>Número de indivíduos esperados com défice de AAT</i>	<i>Número de indivíduos diagnosticados com défice de AAT</i>
Canadá	42372	144
Itália	46068	100
Alemanha	9790	136
Nova Zelândia/Austrália	33707	93
Espanha	86899	90
Suécia	6717	181
Reino Unido	79456	324
Total	305009	1068

Portugal ainda não apresenta qualquer registo nacional de pacientes com défice de AAT. Assim, a persistência de uma esmagadora maioria de indivíduos ZZ por identificar, implica a ocorrência de uma situação epidemiológica indefinida, em que é difícil saber quais as situações em que não há qualquer manifestação clínica e quais as situações que, envolvendo um maior ou menor grau de patologia, continuam por diagnosticar.

Como resultado do sub-diagnóstico, indivíduos com o referido défice experimentam longos períodos de tempo entre o surgimento do primeiro sintoma e o diagnóstico inicial, muitas das vezes com efeitos adversos psicológicos. Por exemplo, num estudo efectuado com 304 indivíduos com défice severo de AAT (fenótipo ZZ), *Stoller et al. (1994)*, encontraram os seguintes achados:

1. intervalo médio de 7.2 anos entre o sintoma inaugural e o diagnóstico inicial de défice de AAT.
2. 43% dos pacientes reportaram terem sido vistos por pelo menos três clínicos antes do défice ser diagnosticado.

3. 12% dos pacientes foram avaliados por seis a dez clínicos antes do diagnóstico ser feito.

Um estudo mais recente veio confirmar estes achados, não mostrando qualquer redução no tempo decorrido entre o aparecimento dos primeiros sintomas e o estabelecimento do diagnóstico (Campos *et al.*, 2005).

3.2.1. Distribuição Genética do défice de AAT

Vários trabalhos relativamente recentes analisaram os dados disponíveis sobre a distribuição geográfica do défice de AAT (Hutchison, 1998; deSerres *et al.*, 2002; deSerres *et al.*, 2003a; Blanco *et al.*, 2006). Dada a ampla aceitação de que esta entidade terá tido origem em populações europeias, foi lógico para Hutchinson dirigir o seu trabalho para a distribuição do referido transtorno na Europa. No entanto, à luz dos conhecimentos actuais em termos genéticos, deSerres *et al.* (2002) ampliou recentemente a análise prévia a um grande número de estudos realizados mundialmente, analisando adicionalmente as diferenças raciais/étnicas na prevalência do défice de AAT.

Os alelos PiM1, PiM2, PiM3, PiS e PiZ são os mais comuns e atingem frequências polimórficas em várias populações humanas (Brantly, 1996). As variantes deficitárias mais comuns são a variante Z e a variante S, com uma frequência genética de 0.02-0.03 e de 0.01-0.02, respectivamente (deSerres *et al.*, 2002). A prevalência mais elevada da variante Z foi registada nos países do norte e oeste europeus, nomeadamente, a nível do sul da Escandinávia, Dinamarca, Holanda, Inglaterra e nordeste da França (deSerres *et al.*, 2002). A prevalência diminui gradualmente nos países europeus na direcção norte-sul (Hutchison, 1998). A variante Z é igualmente comum na América do

Norte, Austrália e Nova Zelândia. É extremamente rara nos Asiáticos e na população descendente de indivíduos de raça negra originários de África.

A prevalência mais elevada de PiS verifica-se no sul da Europa (frequência genética média 0.0564) (deSerres *et al.*, 2002), com o valor máximo a nível da Península Ibérica (Espanha, Portugal) (Carracedo & Concheiro, 1983; Martin *et al.*, 1976). A distribuição geográfica da frequência genética de ambas as variantes PiZ e PiS a nível da Europa encontra-se esquematizada na figura III-4. A distribuição de PiS difere marcadamente da relativa a PiZ e é mais homogénea (Blanco *et al.*, 2001). Tal como o observado com o alelo Z, existe um gradiente em termos de prevalência, diminuindo gradualmente na direcção sul-norte da Europa. O alelo S é raro ou mesmo inexistente em Asiáticos e indivíduos de raça negra.

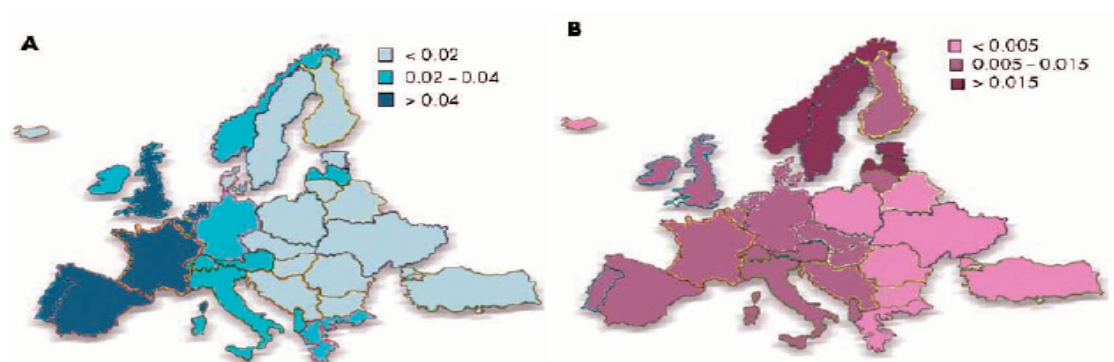


Figura III-4. Frequências genéticas na Europa das variantes PiS (A) e PiZ (B) (Retirado de Luisetti & Seersholm, 2004).

No caso particular da Península Ibérica a variante S é a predominante (Hutchison, 1998). Segundo dados de uma metanálise recente, a frequência estimada dos alelos S e Z em Espanha é de 104 em 1000 indivíduos para PiS e 17 em 1000 indivíduos para PiZ. A estimativa da prevalência em Espanha de fenótipos heterozigóticos é de 1 em cada 4.4. indivíduos (Blanco *et al.*, 2004). A estimativa para a prevalência do gene em Portugal responsável pelo défice de AAT para as cinco principais classes fenotípicas de alelos deficientes PiS e PiZ (PiMS, PiMZ, PiSS, PiSZ e PiZZ) é de 1 em 3.8 indivíduos (deSerres *et al.*, 2003a). DeSerres *et al.* (2002)

calcularam que a frequência do alelo PiS é de 86/100 e a do alelo PiZ de 12.9/100, o que se traduz numa prevalência estimada de cerca de 2.2 milhões de indivíduos com o fenótipo PiMS, 232.000 com o fenótipo PiMZ, 167.000 com o fenótipo PiSS, 35.000 com o fenótipo PiSZ e 1000 com o fenótipo PiZZ numa população de 10 milhões de habitantes.

A frequência dos alelos nulos é cerca de 1 em 6 000 (0.017%). Ao contrário dos alelos Z e S, os alelos nulos ocorrem em todos os grupos étnicos (WHO, 1997). Sabe-se pouco sobre a epidemiologia das variantes deficitárias raras, considerando-se que não excedem cerca de 2-4 % de todas as variantes existentes (Zorzetto *et al.*, 2002). No entanto, a prevalência destas variantes pode ser maior do que se crê. De facto, estas variantes raras podem confundir-se com a variante PiZ e, portanto, serem diagnosticadas incorrectamente. Os dados preliminares do registo italiano para a deficiência de AAT indicam que as variantes raras podem atingir valores de 22 % do total das variantes (Luisetti, 2002). A nomenclatura de algumas destas variantes reflecte a sua provável origem italiana (M_{procida} , M_{palermo} , $QO_{\text{isola di procida}}$, $QO_{\text{trastevere}}$) (Brantly, 1996). Olhando com cautela para estes dados é possível observar que naqueles países em que a frequência do gene PiZ é mais baixa, aparentemente são mais frequentes as variantes raras (Luisetti & Seersholm, 2004). Os dados disponíveis da ilha da Sardenha parecem apoiar esta hipótese (Sergi *et al.*, 1994). Este facto particular pode ser objecto de estudo em investigações posteriores, de forma a disponibilizar e aumentar o conhecimento no que se refere aos fenótipos clínicos associados com as variantes raras do défice de AAT (Luisetti & Seersholm, 2004).

DeSerres *et al.* (2002) afirmam que pode existir um total populacional de 4.4. biliões de indivíduos com défice de AAT nos 58 países estudados, com pelo menos 16 milhões de portadores (PiMS e PiMZ) e 3.4 milhões com combinações alélicas

deficientes (PiSS, PiSZ e PiZZ). Com base nos dados da frequência dos alelos deficitários e da prevalência de PiZ e PiS em todo o mundo, pode-se concluir que a deficiência de AAT não é uma doença rara, mas é uma doença que tem sido raramente diagnosticada.

3.2.2. Análise da importância dos dados epidemiológicos

Analisando os dados epidemiológicos disponíveis relativos à incidência mundial da deficiência de AAT, estes sugerem que a deficiência de AAT pode ser uma das doenças hereditárias mais comuns que aumentam a susceptibilidade de indivíduos deficitários a doença pulmonar e hepática. Os estudos epidemiológicos disponíveis podem fornecer informação precisa sobre a magnitude da deficiência de AAT numa determinada área; factor crítico para o desenvolvimento de programas de rastreio para a detecção, diagnóstico e tratamento daqueles indivíduos com défice de AAT e/ou famílias em risco. Além disso, mostram que o défice de AAT se encontra em várias populações de raça negra em África; árabes e judeus do Médio Oriente, Asiáticos do Centro e Sul; assim como indivíduos de raça branca na Europa do Norte e seus descendentes na América do Norte, Austrália e Nova Zelândia (deSerres *et al.*, 2003b). Adicionalmente, indicam que existem marcadas diferenças raciais e étnicas na frequência genética e prevalência dos alelos PiZ e PiS em todo o mundo (deSerres *et al.*, 2002). Isto sugere que o défice de AAT não é uma doença da raça branca na Europa, mas que ultrapassou as barreiras raciais e étnicas, afectando indivíduos de todos os grupos raciais distribuídos mundialmente. Isto coloca mais um desafio: a correcta caracterização dos principais critérios implicados no diagnóstico da deficiência de AAT ao nível dos Cuidados de Saúde Primários e dos Cuidados Hospitalares (Imunoalergologistas, Pneumologistas e Hepatologistas).

As vantagens potenciais de um diagnóstico precoce de défice de AAT incluem: aconselhamento sobre estilos de vida (especialmente cessação tabágica), aplicação de medidas preventivas e instituição de terapêutica de substituição específica em estádios iniciais da doença pulmonar (estudos observacionais sugerem que este tipo de terapêutica parece aumentar a sobrevivência e impedir a progressão para doença pulmonar). A detecção precoce de casos não índice (pacientes descobertos no decurso de estudos familiares ou rastreios na população em geral) pode facilitar o aconselhamento genético e conduzir à detecção de novos casos antes do desenvolvimento da doença pulmonar.

Relativamente ao sub-diagnóstico desta entidade clínica, existem pelo menos duas razões para o seu não reconhecimento. Em primeiro lugar, os fenótipos clínicos associados com o défice de AAT (enfisema pulmonar, bronquite crónica, bronquiectasias, asma e, em menor grau, doença hepática crónica) não lhe são exclusivos (DeMeo & Silverman, 2004). Mesmo a agregação familiar do fenótipo, uma característica típica dos distúrbios hereditários, não é um sinal útil, na medida em que a doença pulmonar obstrutiva crónica tende a agrupar-se em famílias (McCloskey *et al.*, 2001). Em segundo lugar, o gene PiZ é transmitido por penetrância incompleta, isto é, a relação entre o genótipo e o fenótipo clínico não é linear. Na prática, existe evidência de que muitos indivíduos com deficiência severa de AAT não apresentam disfunção pulmonar clinicamente significativa (Luisetti & Seersholm, 2004).

3.3. FISIOPATOLOGIA MOLECULAR

3.3.1. Função normal de alfa-1 antitripsina

Muitos processos biológicos requerem um equilíbrio entre as proteases que iniciam as vias proteolíticas essenciais à vida e os inibidores que limitam a actividade proteolítica excessiva. A alfa-1 antitripsina (AAT) é o membro protótipo duma superfamília de proteínas, que são designadas pelo acrónimo SERPIN (*SER*ine *Protease* *I*nhibitors ou formalmente Pi) que regulam uma variedade importante de cascatas fisiopatológicas como, por exemplo, inflamação, coagulação, fibrinólise, apoptose e *remodelling* da matriz extracelular (Salzet *et al.*, 1999; Irving *et al.*, 2000). Esta família inclui proteínas tão diversas, como: alfa-1 antitripsina (ou alfa-1 antitripsina), alfa 2-antiplasmina, activador do plasminogénio I, globulina de ligação à tiroxina, globulina de ligação ao cortisol, angiotensinogénio, calistatina e inibidor de leucócitos (Potempa *et al.*, 1994).

A proteína AAT é sintetizada maioritariamente nos hepatócitos (Brantly *et al.*, 1988), pelo que é uma proteína de fase aguda. Apesar do nome utilizado para a designar – resultante dos primeiros estudos sobre a sua capacidade inibidora terem sido realizados com a tripsina – e apesar de poder inibir um amplo espectro de proteases, a principal função da AAT é a protecção do trato respiratório inferior da acção proteolítica da elastase dos neutrófilos (NE). Esta enzima digere a elastina, a membrana basal e outros componentes da matriz extracelular (Cox, 1995). A proteína AAT é abundante a nível sérico, circulando normalmente em concentrações entre 120 a 220 mg/dl (valor médio de 130 mg/dl) (Cox, 1995). A AAT a nível sérico corresponde a apenas 40% do total corporal; os restantes 60% estão localizados no espaço extracelular, junto aos tecidos (Vidal *et al.*, 2006). Sob condições normais, o fígado secreta 34 mg/dl de AAT cada 24 horas, mas a sua produção pode aumentar cerca de 2 a 5 vezes no

decurso de processos inflamatórios, tumorais, de gravidez ou terapêutica com estrogénios. A AAT atinge o tecido pulmonar por simples difusão da circulação ou pela produção local das células epiteliais ou macrófagos (Lomas & Mahaveda, 2002; Stecenko & Brigham, 2003). Adicionalmente, à sua actividade anti-protease, a AAT apresenta importantes propriedades anti-inflamatórias (Stockley *et al.*, 2002). Estes efeitos não se relacionam com a inibição de proteases, mas incluem o bloqueio dos efeitos pró-inflamatórios do peptídeo neutrofilico humano e a regulação da expressão de citocinas pró-inflamatórias (como, por exemplo, factor de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8), proteína 1 quimioatráctica de monócitos e interleucina 1 β (IL-1 β)) (Brantly, 2002; Aldonyte *et al.*, 2004). Além disso, regula a adesão da elastase neutrofilica ao receptor de membrana neutrofilico fosfatidilserina, um importante pré-requisito para o processo de apoptose. Desta forma, pode desempenhar um papel muito importante na resolução da inflamação. Adicionalmente às propriedades referidas anteriormente, a AAT também apresenta 9 radicais de metionina, tornando-a um potente anti-oxidante. Todos estes factos sugerem que a provável função da AAT é regular as reacções inflamatórias que ocorrem continuamente no corpo humano (Brantly *et al.*, 2002; Blanco *et al.*, 2005).

Todos os membros da superfamília SERPIN apresentam a mesma estrutura proteica base, particularmente nas regiões móveis da molécula (Carrell & Lomas, 2002). As mutações que afectam estas regiões podem simplesmente resultar em perda de função, com consequências que se reflectem no papel fisiopatológico de cada inibidor. A noção do mecanismo preciso de actuação permite um conhecimento detalhado de como, alterações na sua estrutura, podem modificar a sua função e originar uma variedade de apresentações clínicas. O processo de inibição é iniciado pela ligação da

protease com a serpina; segue-se uma alteração conformacional na serpina que resulta na inibição irreversível e posterior destruição da protease (Carrell & Lomas, 2002).

O modelo de actuação das proteínas pertencentes à família SERPIN, em particular da AAT, encontra-se representado na figura III-5 (Carrell & Lomas, 2002). A elastase neutrofílica (NE) (protease) liga-se ao centro activo da AAT, cliva-o e liberta-a do seu estado de alta energia. Isto transloca a NE do pólo superior (figura III-5A) para o pólo inferior da AAT (figura III-5B), inactivando-a e, permitindo à AAT adquirir um estado conformacional estável. Este processo é simultaneamente suicida, isto é, assegura a destruição das duas moléculas, existindo normalmente um excesso de AAT no pulmão, o que providencia uma defesa adequada contra a NE (Stoller & Aboussouan, 2004).

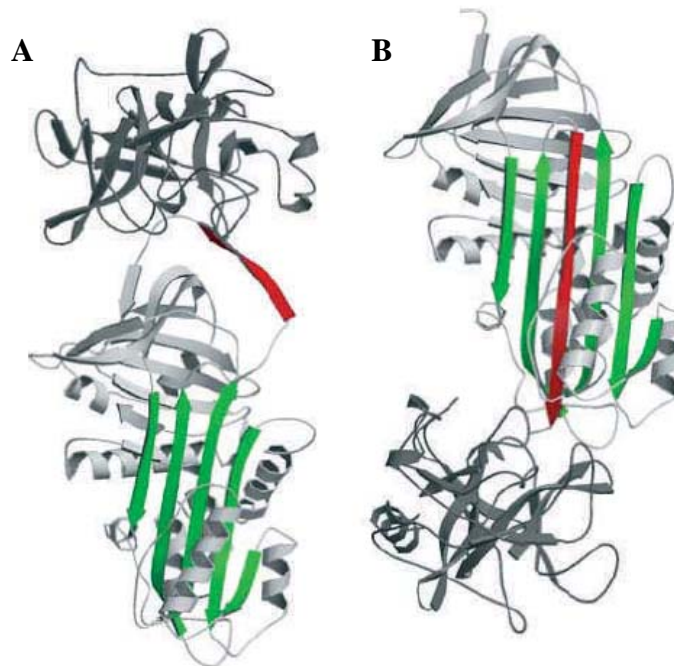


Figura III-5. Representação do mecanismo de ligação da protease à proteína alfa-1 antitripsin (AAT). Este processo está associado com a inserção do domínio reactivo (a vermelho) como uma ansa extra na folha β -A (a verde) (Adaptado de *Carrell & Lomas, 2002*).

A instabilidade conformacional da folha β das serpinas aumenta a sua susceptibilidade às mutações e à polimerização (Kopito & Ron, 2000). De facto, no

caso de deficiência de AAT com o fenótipo ZZ, a retenção de agregados polimerizados de AAT nos hepatocitos (processo denominado polimerização) pode conduzir a cirrose. Da mesma forma, a perda do equilíbrio protease-antiprotease predispõe a enfisema e, como será discutido posteriormente, a perda dos efeitos anti-inflamatórios de AAT provavelmente tem um papel preponderante na patogénese do enfisema (Stoller & Aboussouan, 2004).

3.3.2. Processo de polimerização

O conhecimento actual do mecanismo molecular é que a proteína AAT normal na forma activada sofre uma alteração conformacional para inibir a protease-alvo - elastase neutrofílica (NE) (Stoller & Aboussouan, 2004). A mutação Z ocorre no resíduo P17 (17 resíduos mais próximos em relação ao centro activo P1) (figura III-1). A mutação abre folha β -A, permitindo assim a inserção do domínio reactivo de uma segunda molécula, para formar um dímero. Isto pode estender-se até formar polímeros que ficam retidos no interior do retículo endoplasmático do hepatocito, formando corpos de inclusão. Isto é suportado pelo facto de AAT Z plasmático purificado formar cadeias de polímeros quando incubado sob condições fisiológicas (Lomas *et al.*, 1992).

A via de polimerização da AAT encontra-se esquematizada na figura III-6 (Gooptu *et al.*, 2000). O passo 1 representa a alteração conformacional de AAT para uma forma monomérica de polímero (M^*). O passo 2 representa a formação de dímeros (D) e polímeros (P) e o passo 3 representa uma via alternativa que leva à formação de um estado conformacional estável monomérico latente (L) (Lomas & Parfrey, 2004). As moléculas de AAT Z ficam retidas no interior do hepatocito agregadas em polímeros e são normalmente degradadas por proteínas do proteossoma.

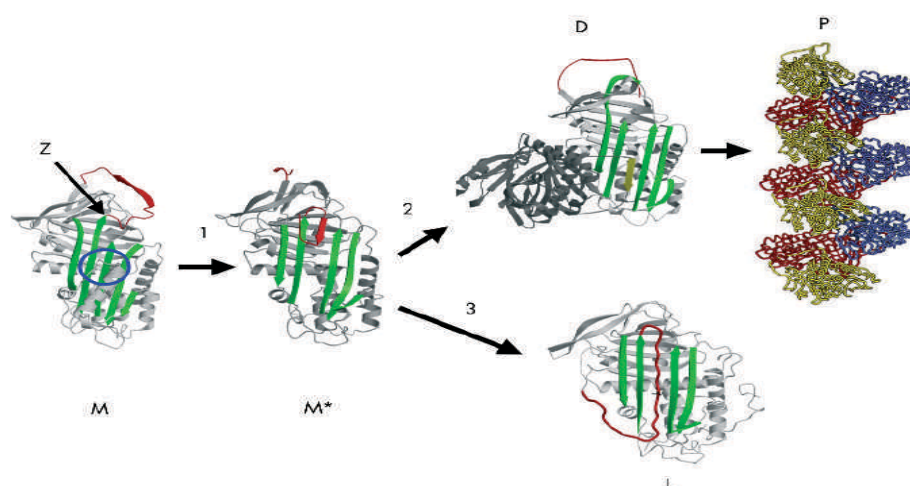


Figura III-6. Efeito da mutação Z na conformação final da molécula de alfa-1 antitripsina (Retirado de Gooptu *et al.*, 2000)

O processo de polimerização também está subjacente ao défice plasmático moderado das variantes S (Glu264Val) e I (Arg39Cis) de AAT. As mutações pontuais que são responsáveis por estas variantes causam, contudo, menor grau de alteração conformacional da molécula que no caso da variante Z. Assim, a taxa de formação dos polímeros é muito mais lenta, resultando num menor grau de retenção da proteína no interior dos hepatocitos, défice plasmático ligeiro e ausência de fenótipo clínico (Mahadeva *et al.*, 1999).

3.3.3. Mecanismo molecular da doença pulmonar

A correlação entre a doença pulmonar e os níveis reduzidos de AAT foi descrita pela primeira vez em 1960 por dois investigadores suecos (Laurell & Ericksson, 1963; Ericksson, 1964). Na década de 70 foi demonstrado que a elastase neutrofílica humana introduzida no trato respiratório de modelos animais era capaz de induzir enfisema pulmonar (Senior *et al.*, 1977). Com base neste facto, a hipótese protease-antiprotease foi formulada. De acordo com esta hipótese, as anti-proteases (como, por exemplo, a AAT) actuam normalmente para proteger o parênquima pulmonar contra elastases

libertadas pelas células pró-inflamatórias (maioritariamente neutrófilos) (Stockley, 1999). O pulmão normal sequestra cerca de 80 milhões de neutrófilos da circulação arterial pulmonar a cada segundo e liberta um número similar nas veias pulmonares (Muir *et al.*, 1984). Como resultado desta passagem de neutrófilos pelos tecidos pulmonares, o parênquima pulmonar fica exposto a uma grande quantidade de enzimas proteolíticas. A protease mais importante e com relação no desenvolvimento de enfisema pulmonar é a elastase neutrofilica (NE), uma glicoproteína encontrada nos grânulos azurófilos dos neutrófilos. Outras enzimas elastolíticas provenientes de neutrófilos e macrófagos também foram implicadas na patogénese do enfisema – metaloproteinases da matriz 9 e 12 (Mahaveda & Shapiro, 2002; Shapiro, 2002).

Vários estudos demonstraram que a enzima anti-elastase mais prevalente no trato respiratório inferior humano é a AAT e, que pacientes com deficiência de AAT apresentam baixas concentrações desta proteína nesta região do pulmão (Gadek *et al.*, 1981). A concentração de AAT no interstício é, portanto, crítica para a protecção da integridade pulmonar, e esta é de um modo geral semelhante à do plasma (Stockley, 2000). Estudos fisiológicos prévios sobre a difusão da albumina (Gorin & Stewart, 1979) demonstraram que o endotélio é relativamente permeável à proteína, sendo a concentração no interstício de aproximadamente 80% da concentração plasmática (figura III-7). Em contraste, o epitélio constitui uma barreira relativamente impermeável ao movimento da molécula. A concentração de elastase dentro dos grânulos azurófilos dos neutrófilos é de aproximadamente 50 μ M, quantidade muito maior que a concentração de AAT no plasma e no interstício, que é de 30 μ M e de 24 μ M. Os níveis de AAT a nível pulmonar são extremamente reduzidos em indivíduos com défice da proteína AAT Z. No fenótipo PiZZ, a concentração plasmática média de AAT é de 5 μ M, o que resulta teoricamente numa concentração intersticial de 4 μ M.

Consequentemente, a quantidade de elastase libertada nos pulmões excede a quantidade de AAT presente, resultando numa actividade persistente da elastase com a consequente destruição do parênquima pulmonar (Gorin & Stewart, 1979).

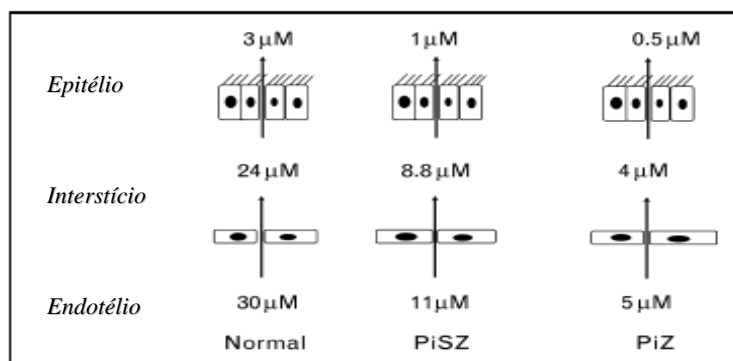


Figura III-7. Previsão da concentração de alfa-1 antitripsina (AAT) de pacientes com diferentes fenótipos a nível do interstício pulmonar (Adaptado de Gorin & Stewart, 1979).

Logo, perante um desequilíbrio entre a acção protectora da AAT e a acção proteolítica da NE, as estruturas alveolares permanecem desprotegidas e ficam sujeitas a uma lesão irreversível ao longo do tempo, conduzindo ao desenvolvimento de enfisema. Isto é, mesmo perante apenas um pequeno aumento na acção elastolítica (que pode ocorrer com o fumo do tabaco ou na presença de infecção pulmonar) ou uma pequena redução na defesa anti-elastase (que pode ocorrer com défice severo de AAT), pode ser suficiente para favorecer a aceleração da lesão pulmonar (Stoller & Aboussouan, 2005).

Além disso, a polimerização e a retenção de polímeros no retículo endoplasmático das células hepáticas provocam uma diminuição na quantidade de AAT plasmático disponível para proteger o pulmão contra a lesão elastolítica (Lomas *et al.*, 1992). A adicionar a este facto, a variante Z da molécula AAT disponível a nível pulmonar é cerca de cinco vezes menos efectiva na inibição da elastase neutrofílica que a variante normal (M) da AAT (Ogushi *et al.*, 1987; Lomas *et al.*, 1993). A actividade inibitória de AAT Z pode ainda ser mais reduzida, uma vez que a AAT é susceptível à inactivação, pensa-se que por oxidação do resíduo P1 metionina, por acção dos radicais

livres libertados pelos leucócitos ou por oxidação directa do fumo do tabaco (Gadek *et al.*, 1979; Janoff *et al.*, 1979). A combinação do défice de AAT e o fumo do tabaco provoca um efeito devastador na função pulmonar, provavelmente pelo facto de não ser possível uma resposta opositora consistente à acção das enzimas proteolíticas. Além disso, o fumo do tabaco é moderadamente ácido e, estudos prévios demonstram que a polimerização da AAT é acelerada pelo pH baixo (Dafforn *et al.*, 1999). Assim, o fumo do tabaco pode actuar sob diversas formas para a promoção da inactivação da proteína AAT Z *in vivo*. De facto, o factor de risco mais importante no desenvolvimento de enfisema em pacientes com deficiência de AAT é o tabagismo (Piitulainen & Eriksson, 1999).

3.3.3.1. Produção local de AAT no pulmão

A mutação Z favorece a formação espontânea de polímeros a nível pulmonar (Elliott *et al.*, 1998). Os mecanismos que conduzem à formação destes polímeros a nível pulmonar são desconhecidos. A fonte celular potencial de produção de AAT a nível pulmonar inclui células epiteliais, macrófagos e, possivelmente, neutrófilos. Estudos *in vitro* indicam não só que células epiteliais pulmonares são capazes de produzir AAT, mas também que a sua produção local aumenta em resposta a mediadores inflamatórios específicos, nomeadamente oncostatina M, interleucina-1 e dexametasona (Cichy *et al.*, 1997; Boutten *et al.*, 1998; Kalsheker *et al.*, 2002). É, então, possível que a polimerização seja acelerada pelo estado inflamatório existente no pulmão de indivíduos com défice de AAT Z. Outros estudos analisando células mononucleares do sangue periférico em voluntários saudáveis demonstraram um aumento de 2 a 3 vezes da secreção de AAT em resposta ao tratamento com LPS, IL-1 β e TNF- α (Knoell *et al.*, 1998). Estes dados sugerem um papel importante de defesa desempenhado pela

produção local de AAT em resposta à inflamação aguda pulmonar. A falha neste aumento local de produção de AAT pode contribuir para a lesão pulmonar durante os processos infecciosos num paciente com défice de AAT.

A possibilidade de que a produção local de AAT na superfície epitelial pulmonar pudesse ser objecto de amplificação conduziu a investigação posterior. Estudos *in vivo* de pacientes AAT Z que, foram sujeitos previamente a transplante hepático, confirmam a presença de produção local de AAT (Mulgrey *et al.*, 2004). Contudo, a AAT Z detectada existe na forma polimerizada, na maioria dos casos, e é ineficaz como anti-protease.

3.3.3.2. Propriedades anti-inflamatórias da alfa-1 antitripsina

A lesão pulmonar e o enfisema resultantes do défice de AAT foram tradicionalmente atribuídos a actividade anti-protease ineficaz (Gadek & Pacht, 1990). A elastase neutrofílica livre não só causa destruição tecidual directa, como também induz a expressão de citocinas pró-inflamatórias e quimioatraentes neutrófilicas (Parmar *et al.*, 2002; Mulgrey *et al.*, 2004). Todavia, a AAT por si só tem um papel potencial na regulação da inflamação pulmonar em pacientes com défice de AAT. Estudos em pacientes com défice de AAT demonstraram que o número de neutrófilos nas vias aéreas está marcadamente aumentado (Morrison *et al.*, 1987). As formas poliméricas de AAT Z atraem neutrófilos por diversos mecanismos. Hubbard *et al.* (1991) argumentaram que tal facto se deve a um aumento na concentração de leucotrieno B4 (LTB4) secretado pelos macrófagos alveolares. Além disso, demonstraram que a elastase neutrófila pode estimular aquelas células a libertar LTB4. Este estudo sugere, então, que a concentração reduzida de AAT, no fluido epitelial das vias aéreas, falha em inibir a elastase libertada pelos neutrófilos, permitindo assim que esta estimule os

macrófagos a libertar LTB₄, recrutando ainda mais neutrófilos. A migração resultante destas células através do interstício parece ser fundamental para a lesão do tecido pulmonar, com o conseqüente desenvolvimento de enfisema (figura III-8).

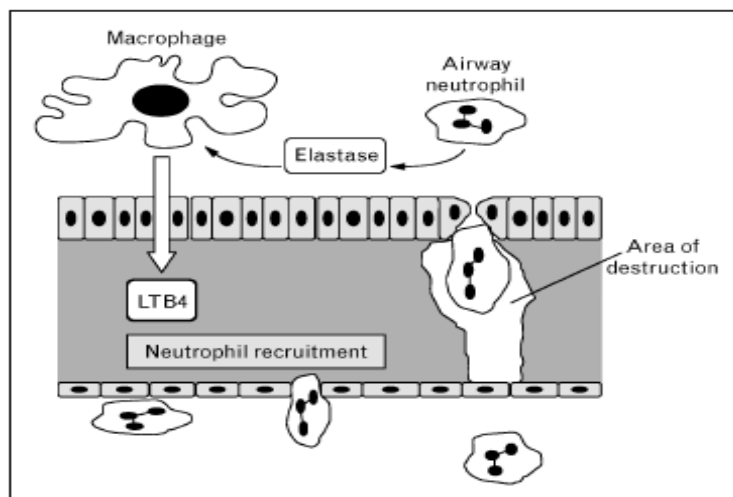


Figura III-8. Processo de quimioatração neutrofílica em pacientes com a mutação Z no déficit de alfa-1 antitripsina (Retirado de *Mulgrew et al. 2007*).

Adicionalmente ao seu efeito directo nos neutrófilos, os polímeros de AAT Z interagem com o epitélio brônquico para aumentar a activação do promotor de IL-8. Além disso, células de origem epitelial pulmonar, quando infectadas por AAT Z, produzem de forma significativa mais citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e IL-8) do que aquelas transferidas com vector vazio (Lawless *et al.*, 2004).

Este novo conhecimento providenciou a formulação de um novo modelo para a compreensão da patogénese do enfisema em indivíduos homozigóticos para a mutação Z (figura III-9). A resposta inflamatória pulmonar não pode, portanto, ser apenas explicada pela teoria protease-antiprotease. De facto, a presença de polímeros de AAT Z, não só exacerbam o desequilíbrio protease-antiprotease existente, como podem potencialmente induzir a expressão de IL-8 e atrair neutrófilos como efeito directo da alteração conformacional da proteína AAT (Mulgrew *et al.*, 2007). Isto pode explicar a progressão da doença pulmonar em homozigóticos para a mutação Z no déficit de AAT

após a cessação tabágica apesar da terapêutica de substituição plasmática intravenosa de AAT. A relação entre os polímeros intra-pulmonares AAT Z e o tabagismo, a infecção, a produção de citocinas e a taxa de declínio da função pulmonar requer estudos prospectivos para uma melhor compreensão do modelo fisiopatológico da doença (Lomas & Parfrey, 2004).

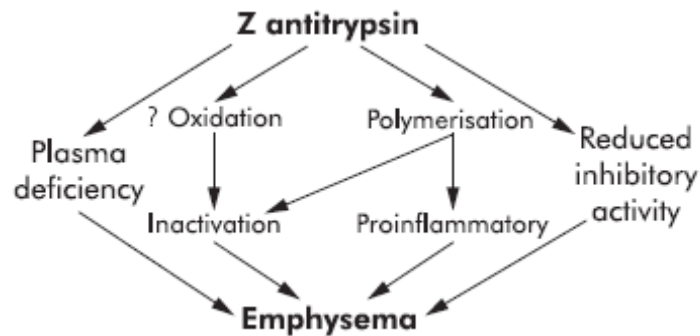


Figura III-9. Modelo proposto para a patogênese do enfisema em pacientes com a variante Z do déficit de AAT (Retirado de *Lomas & Mahaveda, 2002*).

3.3.4. Mecanismo molecular da doença hepática

A patogênese da doença hepática nos pacientes com deficiência de AAT ainda não está completamente esclarecida. Historicamente, duas hipóteses etiopatogénicas, foram sugeridas. A primeira – hipótese do desequilíbrio proteolítico – sugeria que as alterações hepáticas se deviam a um déficit de AAT na circulação sistémica e portal, permitindo que proteases, tais como a elastase pancreática ou neutrofílica, actuassem na matriz celular hepática lesando os hepatocitos (Sharp, 1982). A lesão hepática frequente no período neonatal relacionar-se-ia, segundo esta teoria, com a maior permeabilidade do intestino no período neonatal, o que permitiria a passagem para a circulação fetal de macromoléculas, tais como enzimas proteolíticas, relativamente às quais os hepatocitos dos indivíduos deficientes em AAT seriam incapazes de se defender (Sharp, 1982). Uma segunda hipótese – hipótese imunológica – baseou-se na observação de que os linfócitos periféricos de indivíduos PiZZ são citotóxicos para hepatocitos isolados, o

que deverá provavelmente ser interpretado como um efeito inespecífico da lesão hepática, dado que também é evidente em indivíduos PiMM com hepatite neonatal (Povey, 1990). A constatação de que, indivíduos homozigóticos para mutações nulas, em que não existe qualquer produção de AAT, não apresentavam lesão hepática explicável pelas hipóteses anteriores, veio dar suporte a uma terceira hipótese – hipótese da acumulação. Esta hipótese sugeria que a lesão hepatocitária se devia ao efeito tóxico da proteína acumulada intracelularmente (Feldmann *et al.*, 1975). Apesar do mecanismo preciso não ser ainda completamente compreendido, a patogénese da doença hepática no défice de AAT é diferente da subjacente ao aparecimento de enfisema. Assim, a disfunção hepática deve-se à acumulação no interior dos hepatocitos de AAT mutada não secretada em indivíduos cujos fenótipos estão associados com pregueamento anormal da proteína (i.e. Z, M_{malton} e M_{duarte}). Todas as outras variantes alélicas (S, por exemplo), na generalidade, não conduzem a uma polimerização das moléculas de AAT e não predis põem para doença hepática (Brantly *et al.*, 1988). Os trabalhos desenvolvidos por Permuter *et al.* (1991) permitiram um melhor esclarecimento desta hipótese ao demonstrar que um defeito no transporte intracelular da proteína AAT do retículo endoplasmático (RE) para o complexo de Golgi resulta na sua acumulação no RE, numa forma indevidamente pregueada. É possível que a alteração conformacional sofrida pela AAT Z resulte na exposição de domínios da proteína antes ocultos e que são reconhecidos por factores – proteínas ligadoras de cadeias polipeptídicas, tendo, como exemplo, a calnexina – que medeiam a sua retenção dentro do RE (Permuter *et al.*, 1991). Estes factores participam provavelmente no metabolismo da generalidade das proteínas, permanecendo ligados a estas até que atinjam a sua conformação definitiva. No caso dos indivíduos PiZZ, este estadio nunca é atingido, dado que a mutação envolvida impede a proteína produzida de atingir a conformação normal, ocorrendo

retenção da proteína mutada no interior do RE (Permuter *et al.*, 1991). Nos indivíduos com variantes deficitárias, as biópsias hepáticas revelaram, através de microscopia electrónica, na generalidade, a presença de inclusões intra-hepatocitárias que coram após aplicação de *periodic acid Schiff* (PAS positivo) e são resistentes à digestão pela diastase. A análise dessas inclusões demonstrou que estas efectivamente representam AAT não secretada, como resultado do pregueamento proteico anormal produzido por aqueles alelos (Parfrey *et al.*, 2003).

Os trabalhos de Lomas e dos seus colaboradores contribuíram para o esclarecimento dos mecanismos de acumulação da proteína mutada no hepatocito (Lomas *et al.*, 1992). O estudo das implicações estruturais da substituição do resíduo de ácido glutâmico pelo resíduo de lisina na posição 342 sugeriu que esta, ao alterar a carga da molécula, previne a inserção da ansa que contém o local reactivo da proteína na sua posição usual da estrutura quaternária da proteína, o que favorece a sua polimerização (Lomas *et al.*, 1992). Por outro lado, ao contrário da sua variante M, a AAT Z sofre pregueamento a uma velocidade muito lenta o que leva à acumulação de formas intermediárias com tendência acrescida para polimerização (Yo *et al.*, 1995). Esta polimerização, presente mesmo em situação basal, ocorrerá de forma particularmente importante em caso de elevação da temperatura, infecção sistémica ou aumento da produção da proteína (Yo *et al.*, 1995; Burrows *et al.*, 2000). Nestes períodos, a formação de polímeros geralmente é superior à sua degradação, favorecendo a exacerbação da formação de inclusões hepáticas e a lesão hepática associada (Lomas & Parfrey, 2004). Estudos *in vitro* sugerem que a taxa de polimerização é acelerada pelo aumento da temperatura até 41°C e pode ser bloqueada por pequenos péptidos que competem com a ligação às folhas β (Carrell & Lomas, 2002). Esta hipótese tem sido posta em causa, uma vez que, em alguns estudos celulares não foi demonstrado um

aumento intracelular de AAT Z em resposta a temperaturas elevadas (Burrows *et al.*, 2000). No entanto, outro estudo, conduzido por Green *et al.* (2003), em que é usada a mosca *Drosophila*, o défice de AAT mostra uma dependência clara entre a temperatura e a polimerização *in vivo*. Estas observações levaram à inclusão da deficiência de AAT no grupo das doenças conformacionais – resultantes da acumulação intra-celular de proteínas com defeitos de pregueamento (Carrell & Lomas, 1997; Carrell & Lomas, 2002). Por outro lado, o RE parece dispor de sistemas degradativos responsáveis pela destruição das proteínas retidas, que em alguns casos estão em articulação com proteossomas, que desempenham funções de controlo de qualidade das proteínas produzidas pelas células (Teckman *et al.*, 1996). De acordo com este modelo conceptual, a variabilidade do envolvimento hepático em pacientes PiZZ poderá ser explicada por factores de índole ambiental ou genética, que afectem a taxa de síntese da proteína, a sua interacção com a calnexina ou o sistema degradativo do RE e proteossoma (Permuter *et al.*, 2002). Assim, por exemplo, a existência de alteração nos sistemas degradativos do RE, clinicamente silenciosa num indivíduo normal, poderá, num indivíduo PiZZ, predispor à ocorrência de lesão hepática. De facto, parece que a retenção de polímeros no retículo endoplasmático pode dever-se a uma diminuição da interacção entre a proteína AAT Z e a sua molécula-alvo, calnexina (Qu *et al.*, 1996). Igualmente, outros estudos sobre a deficiência de AAT causada pela mutação Z elucidaram outros mecanismos pelos quais as glicoproteínas anormalmente pregueadas são degradadas. O conhecimento existente actualmente sugere que o processo de degradação envolve a modificação da proteína indevidamente pregueada pela enzima manosidase I presente no retículo endoplasmático, que gera um sinal que incita à degradação da glicoproteína. Os inibidores da manosidase atrasam a degradação e

aumentam a secreção da AAT Z (Marcus & Permuter, 2000; Sifers, 2003; Wu *et al.*, 2003).

Contudo, se estes estudos permitem esclarecer os mecanismos de acumulação intracelular de AAT nos indivíduos PiZZ, em nada elucidam os mecanismos pelos quais esta acumulação induz lesão celular. Parece que a AAT mutada, por si só, não é tóxica para os hepatocitos, pois pode também ser encontrada nos indivíduos PiZZ sem lesão hepática (Eriksson, 1986). A resposta celular à acumulação de proteína Z mutada tem sido alvo recente de múltiplos estudos. A AAT Z induz uma resposta celular específica para a qual contribui de forma importante a autofagia, mecanismo pelo qual os organelos são sequestrados e, posteriormente, degradados pelos lisossomas (Teckmann *et al.*, 2004). A AAT Z pode ser detectada por mecanismos imunológicos no interior de autofagossomas em hepatocitos de indivíduos PiZZ e a sua degradação encontra-se diminuída na presença de inibidores da autofagia, sugerindo que esta contribui para os mecanismos de degradação da AAT acumulada. A resposta autofágica parece acontecer para proteger os hepatocitos das acções deletérias da AAT Z, uma vez, que não ocorre noutras situações clínicas que cursam com deposição intracelular de outras proteínas mutadas (Teckmann *et al.*, 2004).

Apesar da doença hepática e pulmonar poderem coexistir no mesmo indivíduo (usualmente PiZZ), isso é relativamente incomum. Apenas duas mutações (para além do alelo Z) foram associadas simultaneamente com défice plasmático e inclusões hepáticas: AAT S_{iiyama} (⁵³serina→fenilalanina) que é a maior causa de défice de AAT no Japão (Lomas *et al.*, 1993) e a M_{malton} (delecção da fenilalanina na posição 52), que é a maior causa de défice de AAT na Sardenha (Lomas *et al.*, 1995). Ambas as mutações ocorrem num domínio da molécula que controla a conformação e o movimento da folha β (Carrell & Lomas, 2002).

3.4. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

A deficiência de alfa-1 antitripsina (AAT) pode predispor para doença pulmonar (ex: enfisema e bronquiectasias) (Tomashefski *et al.*, 2004), distúrbios hepáticos (ex: hepatite crónica, cirrose e hepatocarcinoma) (Ericksson *et al.*, 1986; Hussain *et al.*, 1986), patologia cutânea (ex: paniculite) (McBean *et al.*, 2003) e vasculite (especialmente vasculite com anticorpos anti-citoplasma positivos, como ocorre na granulomatose de Wegener) (Elzouki *et al.*, 1996; Elzouki *et al.*, 1999). Outras doenças associadas foram sugeridas, mas sem uma relação consistentemente estabelecida como, por exemplo, glomerulonefrite (Montanelli *et al.*, 2002), doença celíaca (Pons *et al.*, 1986), carcinoma pulmonar, do colo-rectal e da bexiga (Sun *et al.*, 2004), aneurismas intracranianos e intrabdominais (Elzouki *et al.*, 1999), displasia fibromuscular (Bofinger *et al.*, 2000) e pancreatite (Rabassa *et al.*, 1995).

As manifestações clínicas do défice de AAT variam consideravelmente entre os indivíduos, desde ausência de sintomas até doença pulmonar ou hepática fatais (Hutchison, 1988). Geralmente, os pacientes são diagnosticados com défice de AAT, após a apresentação de sintomas ou através de rastreio familiar de um caso índice. Apenas uma pequena proporção de indivíduos é identificada por exames anormais radiológicos ou testes sanguíneos ou pelo desenvolvimento de doença hepática (Needham & Stockley, 2004)

3.4.1. Doença pulmonar

O quadro respiratório inicialmente é inespecífico, caracterizando-se por presença de tosse seca ou produtiva crónica, dispneia, sibilos e infecções pulmonares. A apresentação clássica do défice de AAT é similar à da doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC) clássica. Por exemplo, os sintomas mais frequentes dos 1129

participantes do registo norte-americano *National Heart, Lung and Blood Institute* (NHLBI) incluem dispneia (84%), tosse (42%), expectoração (46%) e sibilos na presença de infecções respiratórias superiores (76%) (McElvaney *et al.*, 1997). O primeiro sintoma é, geralmente a dispneia progressiva. Cerca de 60% dos indivíduos não fumadores desenvolvem os sintomas iniciais por volta dos 40 anos e 90% por volta dos 50 anos de idade; contudo, nos indivíduos fumadores está descrito um aparecimento mais precoce. Consequentemente, em muitos casos é difícil diferenciar entre DPOC por deficiência de AAT e DPOC por outras causas (Vidal *et al.*, 2006).

As manifestações pulmonares do défice de AAT que serão objecto de análise incluem: enfisema, asma, bronquite crónica e bronquiectasias.

A associação forte entre o défice de AAT e o desenvolvimento de enfisema foi inicialmente descrita em 1963 (Ericksson *et al.*, 1963). O enfisema é definido, segundo o NHLBI como “a condição do pulmão caracterizada por alargamento anormal e permanente dos espaços aéreos distais ao bronquíolo terminal, acompanhada de destruição das suas paredes e, sem fibrose evidente” (McElvaney *et al.*, 1997). O enfisema por deficiência de AAT apresenta três aspectos particulares e distintos, que devem conduzir à suspeita do diagnóstico. Em primeiro lugar, o aparecimento do enfisema ocorre mais precocemente (quarta ou quinta décadas de vida), comparativamente com os indivíduos sem défice de AAT (sexta ou sétima décadas de vida) (Tomashefski *et al.*, 2004). O início precoce de doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC) pode ser avaliado pelo volume expiratório forçado no primeiro segundo (FEV₁). Nos 1129 participantes do registo *National Heart Lung and Blood* (NHLBI), com idade média de cerca de 46 anos, o VEV₁ foi de 43% do previsto (McElvaney *et al.*, 1997). Além disso, o enfisema associado ao défice de AAT é do subtipo panacinar, que se caracteriza frequentemente por padrões radiográficos ou

tomográficos de alterações enfisematosas que atingem sobretudo os andares inferiores pulmonares (em vez de distribuição apical) (Brantly *et al.*, 1988). Por último, nestes indivíduos com défice de AAT, o enfisema parece ser desproporcional à sua história tabágica. Actualmente, há dados suficientes que estabelecem uma clara diferença na expressão clínica do défice em fumadores e não fumadores. Nas situações de deficiência menos acentuada, como na heterozigotia SZ, a que correspondem concentrações da proteína situadas no limiar de risco e, mesmo em condições de défice mais atenuado, a existência de hábitos tabágicos pode desencadear enfisema precoce em indivíduos que, ao contrário, não estariam expostos a uma probabilidade acrescida de o desenvolver (Cox, 1995; WHO, 1997). Nos doentes fumadores, os primeiros sintomas de enfisema surgem com maior precocidade e a doença evolui mais rapidamente do que nos não fumadores. Tendo em conta que a maioria dos dados sobre sobrevivência é compilada através do seguimento de pessoas com a deficiência de AAT que foram identificadas por apresentarem algum tipo de queixa respiratória (caso índice), é natural que haja um enviesamento no sentido da sobreavaliação do impacto do enfisema, especialmente, entre os não fumadores. Há estudos recentes de seguimento de indivíduos assintomáticos que indicam que uma fracção considerável dos indivíduos com deficiência de AAT que nunca fumaram pode mesmo chegar a não ter queixas respiratórias significativas durante a maior parte da sua vida. Estes dados salientam a importância da cessação tabágica nos indivíduos com este défice, nos quais, apesar da presença de uma condição hereditária, a escolha entre fumar ou não fumar, pode representar a diferença entre ter enfisema precoce ou permanecer livre de doença pulmonar durante um período quase normal da vida activa (WHO, 1997).

A obstrução do fluxo aéreo, indicada pela diminuição do volume expiratório forçado no primeiro segundo (FEV₁) e a redução da razão entre o FEV₁ e a capacidade

vital forçada (CVF) pode ser observada em pacientes com deficiência de AAT. A limitação do fluxo aéreo não é sempre fixa e os sinais e sintomas podem ser semelhantes aos da asma. De facto, a deficiência de AAT em pacientes com história de asma brônquica tem sido descrito. Como acontece na maioria dos pacientes com DPOC, a obstrução ao fluxo aéreo é parcialmente reversível após prova com broncodilatador ou outro similar, nos indivíduos com défice de AAT (isto é, como indicado por 12% ou aumento de 200 ml no FEV₁) (Anthonisen *et al.*, 1986). Existe uma grande variação na resposta ao broncodilatador nestes pacientes. Um estudo que avaliou a presença de sibilos, a resposta ao broncodilatador, a atopia e o aumento da imunoglobulina E (IgE) verificou que estavam presentes três ou mais destes marcadores para a asma em 22% dos indivíduos com défice de AAT, comparativamente com os pacientes com DPOC sem este défice que apresentavam 5% (Éden *et al.*, 1997). Por exemplo, no registo NHLBI, a reversibilidade parcial foi observada em 63% dos pacientes testados até três espirometrias seguidas (McElvaney *et al.*, 1997). Nestes pacientes, o aumento médio do FEV₁ foi de 330 ml, o que explica a razão pela qual muitos destes pacientes em idades jovens são diagnosticados inicialmente como asmáticos (cerca de 35% dos participantes do registo NHLBI) (McElvaney *et al.*, 1997). Apesar da obstrução das vias aéreas e da destruição parenquimatosa poderem ser observadas em associação no mesmo paciente, isto geralmente não se verifica. Alguns pacientes apresentam enfisema grave com doença ligeira das pequenas vias aéreas e, a razão para esta relativa preservação da função pulmonar é desconhecida. Em contraste, alguns pacientes apresentam obstrução severa do fluxo aéreo com ligeira doença parenquimatosa pulmonar e preservação da difusão de gases (Needham & Stockley, 2004).

Os registos de pacientes com défice de AAT demonstram que cerca de 43% dos pacientes apresentam expectoração crónica (definição de acordo com o critério

estipulado pelo *Medical Research Council*, mesmo os não fumadores) (Sem autor, 1965). Os pacientes com bronquite crónica tendem a ter uma obstrução das vias aéreas mais grave e enfisema mais extenso do que aqueles que não a apresentam, apesar das similaridades na história tabágica e idade (Dowson, 2002).

A evidência da associação das bronquiectasias com o défice de AAT é variada; Larsson (1978) relatou a presença de bronquiectasias em 11.3% de 246 indivíduos com o fenótipo ZZ. O registo NHLBI refere a presença de bronquiectasias em apenas 2% dos 1129 participantes (McElvaney *et al.*, 1997). Dowson (2002), contudo, expôs que a incidência de bronquiectasias foi de 26%, valor similar ao verificado na doença obstrutiva crónica pulmonar (O'Brien, 2000). Cuvelier *et al.* (2000) compararam um grupo de pacientes com bronquiectasias, cujo diagnóstico foi realizado por TAC torácico, e um grupo sem bronquiectasias. Concluíram que não existe um excesso na frequência de défice de AAT em pacientes com bronquiectasias relativamente àqueles sem bronquiectasias. Perante estes resultados díspares, as recomendações actuais da ATS/ERS em 2003, indicam a necessidade de investigar a presença de défice de AAT quando a causa das bronquiectasias permanece por esclarecer, isto é, após considerar os motivos principais (fibrose quística, hipogamaglobulinemia, disfunção ciliar, entre outras).

3.4.2. Doença hepática

A evidência disponível sugere que as manifestações hepáticas podem dever-se às diferenças genéticas e/ou ambientais na resposta hepatocelular à acumulação da proteína Z modificada nos hepatocitos (Luisetti *et al.*, 2004).

A doença hepática (incluindo hepatite, cirrose e hepatocarcinoma) é a manifestação da deficiência de AAT mais comum em crianças (mas não exclusiva)

(Eriksson *et al.*, 1986). O envolvimento hepático no défice de AAT, quando clinicamente evidente, é aparente nos primeiros meses de vida pela ocorrência de síndrome de hepatite neonatal (cerca de 10% dos neonatos), caracterizada pela ocorrência de hiperbilirrubinemia conjugada, hepatomegalia e elevação das transaminases. Na maioria dos doentes, a doença é clinicamente silenciosa, auto-limitada, com alteração persistente das aminotransferases hepáticas durante os primeiros anos de vida, mas que pode persistir até à adolescência (Birrer *et al.*, 1990). Contudo, em cerca de 10% destes indivíduos, vem instalar-se um quadro de doença hepática crónica moderada a severa com disfunção da síntese hepática traduzida por diátese hemorrágica, ascite e atraso estato-ponderal. A cirrose desenvolve-se num terço dos pacientes com síndrome de hepatite neonatal e o carcinoma hepatocelular pode aparecer em casos avançados (Sveger, 1988). No adulto, a deficiência de AAT deve ser considerada no diagnóstico diferencial de hepatite crónica, cirrose, hipertensão portal ou hepatocarcinoma de etiologia não esclarecida (Eriksson *et al.*, 1986; Cox, 1995; Massi, 1996). De facto, em cerca de 5-10% dos pacientes com deficiência de AAT com idade superior a 50 anos foi reportado cirrose (Cox, 1983). No doente idoso que não apresentou manifestações respiratórias importantes ao longo da vida é frequente o aparecimento de doença hepática, particularmente a cirrose hepática e o carcinoma hepático primitivo e, que são muitas vezes a causa de morte nesta faixa etária (Needham & Stockley).

Vários estudos têm procurado determinar a prevalência da doença hepática em indivíduos com a deficiência de AAT. Sveger *et al.* (1976) verificaram num estudo de rastreio neonatal realizado com 200.000 recém-nascidos, que 22 (18%) dos 120 bebés com o alelo Z apresentavam evidência de alguma disfunção hepática após um follow-up até aos 6 meses de idade, incluindo icterícia obstrutiva (12%) e anormalidades menores

(7%). Num outro estudo, o risco de desenvolvimento de cirrose naqueles indivíduos com disfunção hepática prévia situava-se nos 50%; 25% morriam na primeira década de vida e 2% desenvolviam cirrose mais tarde durante a infância (Hussain, 1991). Larsson *et al.* (1978) levaram a cabo um estudo em que 246 indivíduos com a mutação Z foram seguidos ao longo de 11 anos. Evidenciaram a presença de doença hepática em 12.2% (cirrose em 11.8%, hepatite neonatal em 0.4% e hepatocarcinoma em 3.3.%). A homozigotia ZZ constitui uma das principais causas de transplante hepático pediátrico.

A forte associação entre o fenótipo ZZ e a doença hepática, conduziu a *American Thoracic Association* (ATS/ERS) em 2003 a recomendar a pesquisa do défice de AAT em todos os indivíduos com “doença hepática inexplicada, incluindo recém-nascidos, crianças e adultos, especialmente os idosos”.

3.4.3. Outras Manifestações Clínicas

Para além das doenças referidas anteriormente, também têm sido descritas algumas associações entre a deficiência de AAT e patologias relacionadas com hiperreactividade da resposta imune, tais como, paniculite, glomerulonefrite, artrite reumatóide e asma (previamente analisada).

Warter *et al.* (1972) descreveram pela primeira vez a associação entre paniculite e a deficiência de AAT. Contudo, a paniculite ocorre de forma pouco frequente, com uma prevalência estimada de cerca de 1 em 1000 indivíduos com défice de AAT (Mc Elvaney *et al.*, 1997). A paniculite caracteriza-se por nódulos cutâneos eritematosos dolorosos, num sítio traumático em cerca de um terço dos pacientes e, pode estar presente em vários fenótipos do défice de AAT, incluindo ZZ, SZ, SS (Edmonds *et al.*, 1991; Pinto *et al.*, 1993; Chng *et al.*, 2001). O diagnóstico, por vezes, requer biópsia excisional das lesões, que demonstra áreas de necrose gorda intercaladas com áreas

aparentemente normais. As opções terapêuticas incluem corticoterapia, dapsona e tetraciclina, contudo, a terapia de substituição parece particularmente eficaz (Humbert *et al.*, 1991; Chowdhury *et al.*, 2002).

Foi descrita em várias séries, a alta incidência de fenótipos deficientes de AAT em grupos de pacientes com vasculite sistêmica, particularmente, naqueles com anticorpos anti-protease 3 positivos (i.e, c-ANCA-positivos) e granulomatose de Wegener's (Esnault *et al.*, 1993; Lhotta *et al.*, 1994; Elzouki *et al.*, 1994; Savige *et al.*, 1995; Callea *et al.*, 1997). Nas várias séries anteriormente referidas foi descrita a prevalência do alelo Z nos indivíduos c-ANCA-positivos na ordem dos 5.6-17.6%, valor que excede, três a nove vezes, o valor normal em indivíduos saudáveis. Contudo, parece que a incidência de anticorpos antiprotease 3 em pacientes com deficiência de alfa-1 antitripsina é baixa, e muitos destes não chegam sequer a desenvolver características de vasculite sistêmica (Audrain, 2001). Apesar da relação fisiopatológica entre o déficit de AAT e a vasculite permanecer pouco compreendida, foram propostos três mecanismos possíveis. Em primeiro lugar, porque a protease 3 é um dos maiores substratos da AAT, a sua deficiência pode conduzir ao desenvolvimento de um mecanismo de auto-imunidade para a proteinase 3. Em segundo lugar, pode ocorrer herança de genes de auto-imunidade simultaneamente à formação dos fenótipos anormais de AAT. Finalmente, o fenómeno de polimerização de Z pode predispor ao desenvolvimento de respostas auto-ímmunes vasculíticas (Stoller & Aboussouan, 2005). Segundo Luisetti *et al.* (2004) parece que o déficit de AAT é apenas um factor de risco menor para o desenvolvimento de vasculite sistêmica.

Em síntese, as manifestações clínicas da deficiência de AAT representam dois processos fisiopatológicos distintos: desequilíbrio protease-antiprotease tipificado pela

doença enfisematosa pulmonar e a doença conformacional hepática típica. As diferentes manifestações clínicas sistêmicas encontram-se esquematizadas na tabela III-5.

Tabela III-5. Manifestações clínicas do défice de alfa-1-antitripsina (Adaptado de *Mulgrew et al., 2007*)

<i>Sistema de órgãos</i>	<i>Manifestações</i>
Pulmão	Enfisema de início precoce Enfisema na ausência de um factor de risco conhecido Enfisema com hipertransparência basal proeminente Doença das vias aéreas reversível e irreversível
Fígado	Colestase neonatal Doença hepática crónica na infância Cirrose Aumento da incidência de hepatocarcinoma
Pele	Paniculite necrotisante
Doença vascular	Vasculite anti-protease 3 positiva

3.5. HISTÓRIA NATURAL DO ENFISEMA NO DÉFICE DE ALFA-1

ANTITRIPSINA

A deficiência de alfa-1 antitripsina (AAT) é um bom exemplo de uma doença monogénica onde existe uma interacção significativa entre o genótipo e o ambiente. A deficiência severa de AAT é um factor de risco genético provado para doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC) (Laurell & Eriksson, 1963). Contudo, esta predisposição genética está presente em apenas 1-2% dos pacientes com DPOC, sugerindo que a presença desta patologia na população geral provavelmente representa uma complexa doença genética com múltiplos determinantes genéticos e ambientais (DeMeo & Silverman, 2004). Mesmo em indivíduos com défice severo de AAT, o desenvolvimento e as manifestações da DPOC são altamente variáveis, o que sugere que factores genéticos, factores ambientais e a interacção genética versus ambiente são relevantes para a expressão da doença.

3.5.1. Factores Genéticos

Certos alelos do locus Pi resultam em níveis baixos de AAT. Martin *et al.* (1987) estudaram os níveis séricos de AAT em 583 indivíduos e concluíram que o *locus* Pi é o seu principal determinante. Silverman *et al.* (1992) concluíram igualmente que o *locus* Pi contribui para 72-92% da variação dos níveis séricos de AAT no seio de famílias com indivíduos PiZ conhecidos. Portanto, apesar de grande parte da variabilidade do nível sérico de AAT se dever ao genótipo no *locus* Pi, indivíduos com concentrações similares de AAT diferem consideravelmente na sua susceptibilidade para desenvolver doença pulmonar, provavelmente, como resultado da intervenção de outros modificadores genéticos (DeMeo & Silverman, 2004). Um exemplo disso é o caso dos indivíduos com o fenótipo PiZ. Muitos estudos de indivíduos PiZ com DPOC têm sido

publicados (Larsson *et al.*, 1978; Janus *et al.*, 1985; Brantly *et al.*, 1988). Contudo, em muitos destes indivíduos foi feito o despiste da deficiência de AAT por apresentarem DPOC, o que conduz a um certo grau de enviesamento (DeMeo & Silverman, 2004), daí que seja necessário considerar este importante aspecto quando se pretende analisar a história natural da doença. Silverman *et al.*, (1990) avaliaram 52 indivíduos PiZ e observaram que 20 dos 30 indivíduos PiZ sem o diagnóstico prévio de DPOC (caso não índice) apresentavam volume expiratório forçado no primeiro segundo (FEV₁) superior a 65% do previsto. Em contraste, nos indivíduos diagnosticados com défice AAT porque apresentavam DPOC (caso índice), todos apresentavam níveis de FEV₁ reduzidos. A variabilidade na história natural da doença pulmonar em casos não índice suporta a hipótese de que outros factores modificadores, potencialmente genéticos, são relevantes na expressão da doença.

Apesar do risco previsto de desenvolvimento de enfisema em indivíduos com défice severo de AAT (i.e. ZZ) ser incompletamente compreendido e, sabendo que alguns indivíduos com o fenótipo PiZZ podem não desenvolver a doença, os achados dos vários estudos já publicados sugerem que a probabilidade de desenvolver enfisema é relativamente alta (Stoller & Aboussouan, 2005). Para além dos níveis séricos deficientes de AAT, apresentam ainda susceptibilidade adicional devido à disfunção da própria proteína na sua função de inibição da elastase neutrofílica. Ogushi *et al.*, (1987) compararam a capacidade inibitória e a taxa de ligação de AAT à elastase neutrofílica, em 10 indivíduos PiZZ e 7 indivíduos PiM1M1 e observaram que os complexos formados pela AAT-elastase no tipo Z eram menos estáveis que os complexos no tipo M1. Além disso, notaram que, comparativamente com o tipo M1, a AAT Z requeria concentração superior, cerca de duas vezes mais, para inibir a elastase neutrofílica. Isto sugere que os indivíduos PiZ são susceptíveis ao desenvolvimento de enfisema por duas

razões: níveis deficientes de AAT e disfunção da própria proteína (Ogushi *et al.*, 1987; Lomas *et al.*, 1993). Existe evidência clínica de que relativamente à deficiência de AAT existem genes ainda por identificar que contribuem para o fenótipo clínico. Este facto é corroborado pela agregação em famílias de anormalidades espirométricas em indivíduos PiZ e PiMZ (Silverman *et al.*, 1990), assim como, o declínio na função pulmonar em indivíduos PiMZ (Sandford *et al.*, 2001).

A informação disponível sobre a agregação familiar de características do défice de AAT em indivíduos PiZ é limitada. Silverman *et al.*, (1990), no estudo de St. Louis, investigaram quantitativamente os fenótipos de 82 indivíduos PiMZ, parentes em 1º grau de indivíduos PiZ, considerando a existência de obstrução significativa das vias aéreas (se $FEV_1 < 65\%$ do previsto) ou sem obstrução significativa das vias aéreas (se $FEV_1 > 65\%$ do previsto). Concluíram que os parentes PiMZ de indivíduos PiZ com obstrução significativa das vias aéreas apresentavam valores de FEV_1 inferiores aos encontrados no outro grupo (FEV_1 93.1% vs 101.1% previsto, respectivamente).

Como referido previamente, existe marcada variabilidade no desenvolvimento e na gravidade da doença pulmonar em indivíduos PiZ. De facto, para identificar genes que modificam a expressão da deficiência de AAT, uma hipótese é seleccionar genes potenciais, com base na fisiopatologia conhecida da doença. Seguidamente, investigar as variantes genéticas como, por exemplo, polimorfismos de uma única base (SNPs), como forma de identificar uma provável associação com a doença ou fenótipos intermédios da mesma (DeMeo & Silverman, 2004). Estudos genéticos epidemiológicos sobre a DPOC revelaram vários genes potenciais, que também podem contribuir para a doença em indivíduos com deficiência de AAT (Wood & Stockley, 2006). Ainda não foram publicados, em número significativo, estudos caso-controllo procurando identificar potenciais factores genéticos relevantes na expressão da deficiência de AAT

em indivíduos PiZ (DeMeo & Silverman, 2004). Contudo, dois polimorfismos foram implicados na obstrução severa das vias aéreas em indivíduos PiZ: um gene codificador da sintetase do óxido nítrico endotelial (NOS)3 e um gene P1 glutatíon S transferase (GSTP1) (Novoradovsky *et al.*, 1999; Rodriguez *et al.*, 2005).

Novoradovsky *et al.* (1999), ao avaliarem o polimorfismo (NOS)3 demonstraram que existe uma correlação significativa entre a gravidade da doença pulmonar e o valor de FEV₁. Não obstante, este polimorfismo apesar de não contribuir de forma óbvia para alterações funcionais na proteína (NOS)3, pode estar localizado próximo de outras variantes funcionais. O polimorfismo GSTP1 consiste numa alteração adenosina(A)→guanina(G) no nucleótido +313, resultando numa simples substituição de um aminoácido (Ile105Val) (Rodriguez *et al.*, 2005). Perante isto, seria de esperar que a variante 105Ile estivesse associada a níveis de lesão pulmonar mais elevados e menos activa contra os agentes oxidantes (DeMeo & Silverman, 2004). No entanto, na deficiência de AAT tal facto não se verifica (Rodriguez *et al.*, 2005). São necessários mais estudos para clarificar o papel destes e doutros polimorfismos como agentes modificadores genéticos da doença pulmonar em indivíduos PiZ.

3.5.2. Factores ambientais

O grau de diminuição da função pulmonar pode variar consideravelmente entre indivíduos com deficiência de AAT e diferentes fenótipos e, pode ser significativamente diferente dentro do mesmo fenótipo (Tobin *et al.*, 1983). Alguns factores ambientais, como, por exemplo, o tabagismo demonstraram efectivamente afectar o desenvolvimento e a progressão da doença nos pacientes PiZ, mas parece que outros factores também podem estar implicados.

O tabagismo é o factor de risco mais importante para o desenvolvimento de enfisema em indivíduos PiZZ com défice de AAT (Larsson, 1978; Tobin *et al.*, 1983; Janoff, 1985; Silverman *et al.*, 1989). De facto, o fenótipo PiZ confere um risco acrescido de anormalidades da função pulmonar e declínio acelerado em fumadores relativamente a não fumadores (Janus *et al.*, 1985). Os vários estudos já publicados demonstraram que os indivíduos com deficiência de AAT que fumam apresentam sintomas pulmonares mais cedo e deterioração mais rápida da função pulmonar. A idade média do aparecimento dos sintomas é dos 30 aos 40 anos de idade em fumadores versus dos 45 aos 55 anos de idade em não fumadores (Black & Kueppers, 1978; Brantly *et al.*, 1988). Um estudo britânico (Hutchison & Cooper, 2002) realizado com 194 homozigóticos para o tipo PiZ avaliou o volume expiratório forçado no primeiro segundo (FEV₁) e a capacidade vital (CV). Foi demonstrado que a história passada ou actual de tabagismo tem uma forte relação com a redução do FEV₁ ($p < 0.001$), mas nos indivíduos ex-fumadores, a quantidade total de tabaco consumida durante a vida não estava significativamente relacionada com o FEV₁. Piitulainen & Eriksson (1999) descreveram um declínio acelerado do FEV₁ ao longo de 12 meses em fumadores activos (70 ml/ano, CI 58-82) comparativamente com ex-fumadores (41 ml/ano, CI 36-48) e não fumadores (47 ml/ano, CI 41-53); indicando uma taxa de declínio similar em não fumadores e ex-fumadores. Outros estudos anteriores reportaram taxas de declínio da função pulmonar ainda mais altas em fumadores, nomeadamente, de cerca de 130 ml/ano em fumadores comparativamente a 70 ml/ano em ex-fumadores (Seersholm *et al.*, 1995).

Seersholm *et al.* (1994), não detectaram qualquer anormalidade na função pulmonar em indivíduos não fumadores de fenótipo PiZZ (caso índice). O tabagismo activo pode afectar a função pulmonar tão cedo quanto os 18 anos de idade, com

diminuição significativa no FEV₁ e na relação FEV₁/CV em fumadores relativamente a não fumadores (Piitulainen & Sveger, 1998). Foi demonstrado ainda que os fumadores apresentam uma menor esperança média de vida (Larsson, 1978; Janus *et al.*, 1985; Brantly *et al.*, 1988). Hutchison *et al.* (1987) não encontraram qualquer efeito da cessação tabágica sobre o declínio do FEV₁. Seersholm & Kok-Jensen (1995), comprovaram que a taxa de sobrevivência de pacientes com défice de AAT e função pulmonar consideravelmente afectada (FEV₁<50%) melhora significativamente se estes abandonaram o tabagismo (figura III-10).

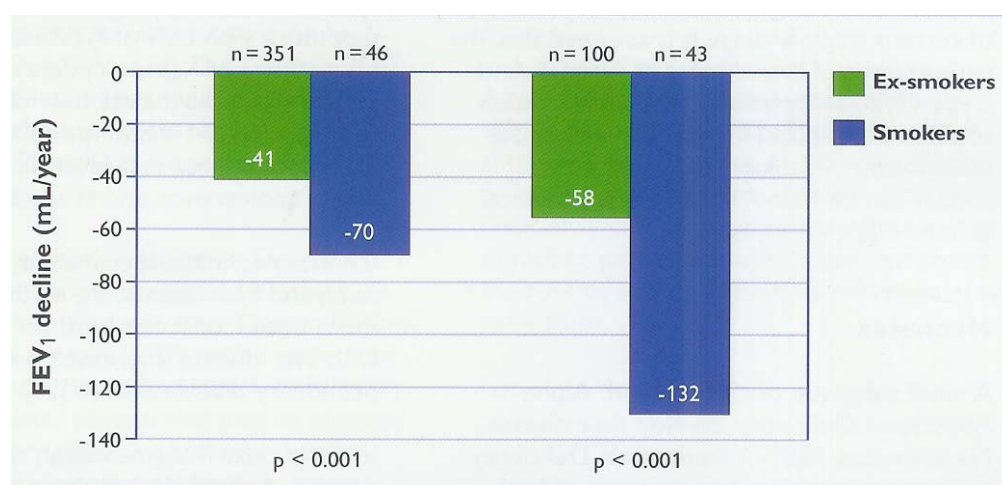


Figura III-10. Variação do declínio no FEV₁ em pacientes com deficiência de alfa-1 antitripsina (AAT) com o tabagismo (Retirado de Seersholm & Kok-Jensen, 1995).

Contudo, o tabagismo activo não explica toda a variabilidade existente. Black & Kueppers (1978) descrevem que os indivíduos que nunca fumaram também apresentam variações no seu curso clínico. No que respeita ao tabagismo passivo, estudos em pacientes com deficiência de AAT demonstraram um aumento no risco de deterioração da função pulmonar. Neste caso, a prevalência de sintomas respiratórios está aumentada (Mayer *et al.*, 2000; Senn *et al.*, 2005). O tabagismo passivo em idade pediátrica com uma exposição de mais de 10 anos foi associado ao desenvolvimento de bronquite crónica, na idade adulta, mas não existe qualquer evidência que prove uma associação

entre o tabagismo passivo na idade adulta e o declínio na função pulmonar (Piitulainen *et al.*, 1998). Por outro lado, o tabagismo parental foi associado com algumas alterações na função pulmonar em adolescentes com esta condição e, parece que o tabagismo passivo em idade pediátrica reduz o potencial máximo da capacidade vital pulmonar na idade adulta (Piitulainen & Sveger, 1998).

Outros factores ambientais foram identificados, incluindo, infecções do trato respiratório inferior (Silverman *et al.*, 1989) e exposições ocupacionais ao fumo, pó e gás. As infecções do trato respiratório inferior podem afectar o curso clínico da doença (Silverman *et al.*, 1989). O efeito das exacerbações é mais evidente em pacientes com doença moderada a grave e, um aumento no número de exacerbações parece estar correlacionado com um declínio na difusão de gases (Dowson *et al.*, 2001). Portanto, parece evidente que as intervenções que reduzem o número de exacerbações, podem também ajudar a reduzir a taxa de declínio da função pulmonar. Na verdade, a terapêutica de substituição, que pode diminuir a taxa de declínio da função pulmonar em alguns pacientes, pode também estar associada à redução da frequência e gravidade das exacerbações (Lieberman, 2000). Contudo, são necessários estudos clínicos prospectivos que confirmem esta aparente relação.

Piitulainen *et al.* (1997) estudaram indivíduos não fumadores provenientes do registo sueco de pacientes com deficiência severa de AAT de fenótipo PiZ. Observaram que em homens com idade igual ou superior a 50 anos, a função pulmonar era inferior naquele grupo que reportava exposição ocupacional (gases, fumos, pó) relativamente ao grupo não exposto (FEV₁ 54% vs FEV₁ 69% do previsto, respectivamente, com $p < 0.05$). Não foi encontrada nenhuma interacção entre o uso de tabaco e a exposição ocupacional (Mayer *et al.*, 2001). Os dados disponíveis em pacientes geneticamente susceptíveis ao desenvolvimento de enfisema precoce apontam fortemente para que as

exposições ocupacionais estejam independentemente associadas com sintomas respiratórios e com a limitação do fluxo aéreo (Mayer *et al.*, 2001). Estes estudos sugerem que a exposição ambiental pode estar associada ao desenvolvimento de sintomas respiratórios nestes pacientes e, que pode ser um factor contribuinte para o declínio da função pulmonar. Mais estudos são necessários para isolar os efeitos de agentes individuais específicos, assim com, identificar grupos de indivíduos mais susceptíveis a estes efeitos (Needham & Stockley, 2004).

3.5.3. Causas de mortalidade

A causa mais comum de morte nos pacientes com deficiência de AAT é a falência respiratória (50-72%), seguida pela cirrose hepática (10-13%) (Larsson (1978); Dawkins *et al.*, 2003). Segundo o registo NHLBI, os factores associados a uma mortalidade superior são: idade avançada, baixo nível educacional, FEV₁ muito inferior ao previsto, transplante pulmonar e ausência de terapêutica de substituição de AAT (Alpha-1 antitrypsin Deficiency Registry Study Group, 1998). Num outro estudo, apenas a idade avançada e a quantificação da severidade do enfisema por TC predizem as causas de mortalidade (Dawkins *et al.*, 2003).

3.6. DIAGNÓSTICO

A deficiência de alfa-1 antitripsina (AAT) deve ser presumida na presença de apresentações clínicas variadas. A apresentação clássica é de um adulto jovem, fumador ou não fumador, com dispneia progressiva e enfisema. Contudo, outros pacientes são diagnosticados muito mais tarde, após vários anos de doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC) com enfisema. Outros ainda são assintomáticos e são diagnosticados no decurso de estudos familiares, programas de rastreio ou devido à presença de anormalidades hepáticas na infância (Vidal *et al.*, 2006). Em muitos casos, a deficiência de AAT é reconhecida tardiamente como causa subjacente de doença pulmonar. De acordo com as recomendações da *American Thoracic Society* (ATS/ERS) em 2003, todos os pacientes com doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC) e/ou asma devem ser testados para o défice de AAT.

3.6.1. Exames Laboratoriais

As diferentes técnicas de diagnóstico disponíveis encontram-se representadas na tabela III-6. O diagnóstico laboratorial desta entidade clínica é baseado na quantificação do nível sérico de AAT e na identificação do fenótipo. A análise molecular do gene da AAT é o *gold standart* para a identificação de variantes alélicas raras.

Tabela III-6. Técnicas comuns de diagnóstico (Adaptado de *Mulgrew et al.*, 2007)

Teste de diagnóstico	Valor de “protecção”	Comentário
Quantitativo		
Imunodifusão radial	80 mg/dl	Geralmente usado
Nefelometria	50 mg/dl	Pode superestimar os níveis séricos
Qualitativo		
Focagem isoeléctrica	Não aplicável	Fenotipagem
Genotipagem	Não aplicável	Kits comercialmente disponíveis apenas para os genótipos comuns

3.6.1.1. Testes Quantitativos

Os níveis plasmáticos de AAT são usualmente determinados por imunoelectroforese, imunodifusão radial ou, mais recentemente, por nefelometria. A nefelometria, o método mais utilizado, baseia-se na formação de complexos imunes quando a proteína é misturada com anticorpos anti-AAT. Este método pode superestimar os níveis de AAT, devido à possível interferência com os lípidos ou a hemoglobina (ATS/ERS 2003). O nível de AAT pode ser expresso sob duas formas - microgramas por decilitro (mg/dl) ou micromoles ($\mu\text{mol/l}$ ou μM), de acordo com o método em causa.

A medição quantitativa dos níveis séricos de AAT é a chave para o diagnóstico desta deficiência (Vidal *et al.*, 2006). Valores abaixo de 35% do normal são indicativos de um possível genótipo homozigótico PiZZ. Quanto se interpreta o resultado do nível sérico de AAT de forma isolada, é importante ter em atenção que a AAT é uma proteína de fase aguda, pelo que pode estar elevada em processos inflamatórios ou infecciosos. Isso pode distorcer os resultados e, podem ser medidos níveis pseudo-normais em pacientes com défice moderado de AAT (ex: indivíduos heterozigóticos para o genótipo Z) (Crystal *et al.*, 1998). Por isso, é recomendada ainda a determinação da proteína C reactiva (PCR) simultaneamente com a determinação da AAT.

Os candidatos principais para a pesquisa de deficiência de AAT são indivíduos não fumadores, sem asma brônquica, que se apresentam com dispneia e função pulmonar anormal e indivíduos fumadores com idade inferior a 40 anos com diminuição da função pulmonar (Vidal *et al.*, 2006). Contudo, apenas a aplicação destes critérios pode deixar por diagnosticar muitos pacientes com apresentações clínicas atípicas. A ATS/ERS (2003) recomendou que em todos os pacientes com DPOC, pelo menos uma vez, devem ser avaliados os níveis de AAT. Portanto, uma vez na vida, a determinação

dos níveis de AAT é, sempre indicada em pacientes que apresentam DPOC associada a uma das condições incluídas na tabela III-7.

Tabela III-7. Condições associadas que devem ser objecto de investigação na pesquisa da concentração sérica de alfa-1 antitripsina (Adaptado de *Rafael et al, 2006*).

1. Pacientes com doença pulmonar obstrutiva crónica;
2. Adultos com bronquiectasias;
3. Pacientes com asma parcialmente reversível na idade adulta;
4. Parentes directos de indivíduos com deficiência de AAT conhecida;
5. Dispneia e tosse crónica em muitos membros da mesma família;
6. Doença hepática de causa desconhecida;
7. Redução do pico de globulina $\alpha 1$ no proteinograma.

3.6.1.2. Testes Qualitativos

O método mais extensamente usado para identificar as variantes da proteína AAT é a técnica de focagem isoeléctrica (IEF). Esta técnica usa a electroforese para separar as proteínas, pelo seu ponto isoeléctrico num gel de acrilamida com pH de 4.2 a 4.5. Usualmente referida como fenotipagem, requer experiência e capacidade, pelo que deve ser levada a cabo em laboratórios de referência (ATS/ERS 2003). A determinação do fenótipo é essencial para confirmar o diagnóstico do défice de AAT e está indicada em pacientes cujos níveis de AAT se encontram abaixo do valor normal ou perto do seu limite inferior (tabela III-8). Indivíduos com níveis abaixo do normal podem apresentar o fenótipo MS, SS ou MZ.

O diagnóstico a nível molecular (ou genotipagem) é o *gold standart* para identificar variantes alélicas raras associadas com défice hereditário e para caracterizar novas variantes (ATS/ERS 2003). Esta técnica consiste na amplificação do DNA extraído de células mononucleares circulantes por *polymerase chain reaction* (PCR). A genotipagem também é útil quando existe discrepância num indivíduo entre os níveis de

AAT e o seu fenótipo (tabela III-8) como, por exemplo, num paciente com défice de AAT apesar de apresentar um genótipo normal PiMM (variante F). Isto provavelmente ocorre devido à presença da variante proteica de AAT num ponto isoeléctrico similar ao da variante PiMM, o qual é, impossível de classificar por fenotipagem (Vidal *et al.*, 2006).

Tabela III-8. Candidatos à determinação do fenótipo e genótipo (Adaptado de Vidal *et al.*, 2006).

Fenótipo

1. Indivíduos com níveis séricos normais de AAT;
2. Parentes directos de pacientes com deficiência de AAT;
3. Parceiros de indivíduos com fenótipos com 1 ou 2 alelos Z antes de engravidar;

Genótipo

1. Discrepância entre os níveis baixos de AAT e o fenótipo teoricamente normal.

Na figura III-11 está representado o algoritmo diagnóstico que deve ser usado para confirmar o diagnóstico de deficiência de AAT.

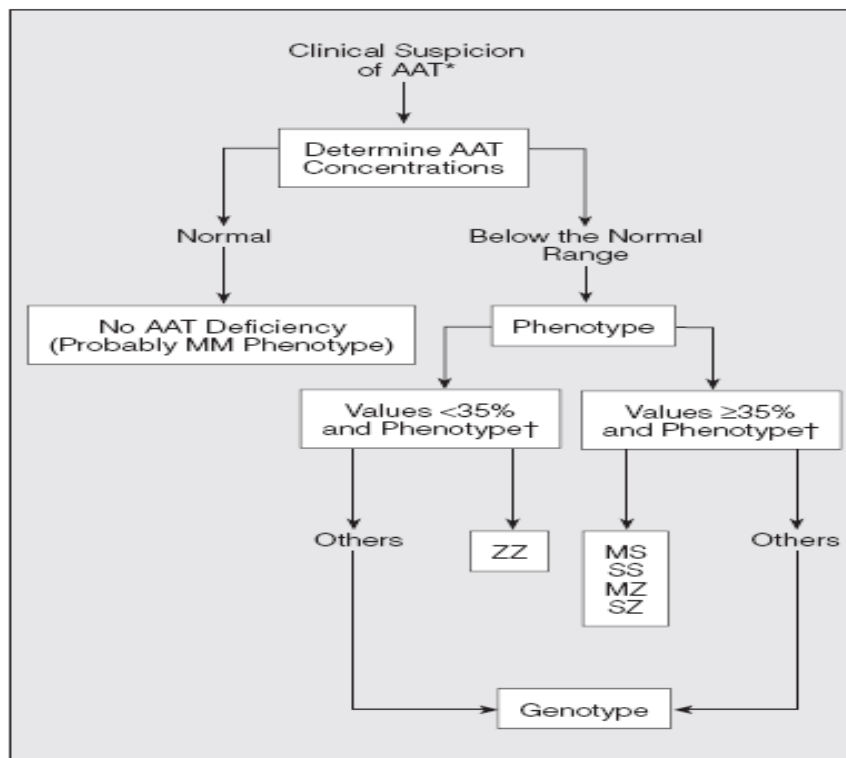


Figura III-11. Algoritmo de diagnóstico para a deficiência de alfa-1 antitripsina (AAT) (Retirado de Vidal *et al.*, 2006).

3.6.1.3. Outros testes de diagnóstico

Existem outros testes disponíveis para auxiliar na orientação do diagnóstico e, incluem: determinação da capacidade inibitória da AAT sobre a elastase neutrofílica, determinação das provas de função hepática e o proteinograma.

A capacidade inibitória da AAT sobre a elastase correlaciona-se com os seus níveis plasmáticos, isto é, quanto mais elevado o nível sérico de AAT, maior o seu poder inibitório. Contudo, a capacidade anti-elastase está diminuída em alguns pacientes com níveis séricos normais ou aumentados, uma vez, que nem toda a proteína é activa. Estes casos estão associados a AAT que é oxidada, degradada ou com escassa capacidade de ligação aos neutrófilos. A determinação da actividade anti-elastase está indicada primariamente no estudo de pacientes com DPOC com níveis aparentemente normais de AAT, mas em que se suspeita clinicamente da presença de deficiência de AAT. O objectivo nestes casos é averiguar quando é que o aumento nos níveis de AAT durante as exacerbações de DPOC é proporcional à actividade anti-elastase e, em geral, avaliar as repercussões do défice de AAT na gravidade da doença pulmonar (Vidal *et al.*, 2006). A função hepática em pacientes com défice de AAT é determinada analisando alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), bilirrubina e albumina, assim como, as provas de coagulação (AST/ERS 2003). O diagnóstico do défice de AAT com base na observação da ausência ou redução da banda α_1 não é mais útil. Este método não é sensível nem específico e, requer sempre a confirmação do resultado dos níveis de AAT por métodos quantitativos e qualitativos (Vidal *et al.*, 2006).

3.6.2. Testes genéticos familiares e rastreio populacional

Quando a clínica é compatível com a suspeita de deficiência de AAT, o paciente deve efectuar sempre testes genéticos. Antes disso, é necessário avaliar o risco-

benefício, isto é, as vantagens e as desvantagens. Os benefícios incluem diagnóstico precoce, medidas de prevenção, aconselhamento genético e tratamentos específicos. As desvantagens são potencialmente psicológicas, sociais e profissionais (WHO, 1997).

Existem duas razões para determinar o nível sérico de AAT e o fenótipo em indivíduos saudáveis (Vidal *et al.*, 2006). A primeira relaciona-se com parentes directos de indivíduos recentemente diagnosticados com deficiência de AAT. Apesar de poderem não apresentar sintomas específicos, são considerados indivíduos de alto risco, pois têm predisposição genética para esta anormalidade hereditária (Vidal *et al.*, 2006). Por exemplo, filhos de pais heterozigóticos com um alelo Z têm probabilidade de 25% de apresentar genótipo homozigótico PiZZ ou filhos de um pai homozigótico ZZ e dum pai heterozigótico, todos têm probabilidade de ser PiZZ ou portadores do alelo Z. Quando estes pacientes apresentam sintomas hepáticos ou enfisema, o diagnóstico deve ser estabelecido sem demora. Além disso, todos os familiares directos de indivíduos homozigóticos ZZ ou heterozigóticos MZ ou SZ, ou portadores de alelos deficitários raros devem igualmente realizar o teste (ATS/ERS, 2003). A segunda razão prende-se com o rastreio da população em geral. O rastreio neonatal ou da população em geral apenas deve ser efectuado para obter dados de uma população específica ou área geográfica, se estiverem reunidas as seguintes condições: se existe suspeita de uma alta prevalência, se a patologia é subdiagnosticada e se o tabagismo é muito prevalente. Sempre que um indivíduo é diagnosticado com défice de AAT no decurso de um rastreio da população em geral ou estudo familiar, devem ser efectuados: testes da função hepática, telerradiografia do tórax e testes de função pulmonar (ATS/ERS 2003). De salientar que existe uma importante diferença – quer na expressão clínica, quer no prognóstico – entre casos índice (pacientes diagnosticados como resultado da suspeita clínica) e casos não índice (pacientes diagnosticados com base em estudos familiares ou

rastreio da população geral). Estes últimos são geralmente assintomáticos e, o seu prognóstico a longo-prazo é mais favorável, particularmente se foram implementadas medidas preventivas (Seersholm *et al.*, 1994).

3.6.3. Exames Imagiológicos

As características clínicas do enfisema podem apenas ser identificadas tardiamente no decurso da doença e podem ser imprecisas no diagnóstico desta patologia. Contudo, os sinais de hiperinsuflação e diminuição da trama broncovascular nas bases presente na terradiografia torácica não são mais precisas que as características clínicas para o diagnóstico de deficiência de AAT (Shaker *et al.*, 2004). A anormalidade pulmonar patológica característica do



Figura III-12. Radiografia póstero-anterior do tórax de um indivíduo com déficit de alfa-1 antitripsina (AAT) por mutação Z (Retirado de *Stoller & Aboussouan 2005*).

enfisema difuso panacinar, com envolvimento desproporcional das bases pulmonares (Gishen *et al.*, 1982), embora possa afectar todas as zonas do pulmão (figura III-12). Na telerradiografia do tórax são usualmente observadas bolhas de enfisema acompanhadas de aumento da hipertransparência dos campos pulmonares. Gishen *et al.* (1982), ao avaliarem 165 películas de radiografias do tórax, de indivíduos com a deficiência de alfa-1 antitripsina com a mutação do alelo Z, verificaram que 15% das radiografias eram normais e que apenas 20% mostraram alterações enfisematosas com padrão distinto limitado às bases pulmonares. Um outro estudo mais recente, com 102 indivíduos com o fenótipo ZZ, demonstrou que em 64% aparecia predomínio do enfisema a nível das

bases pulmonares e que em 36% era a distribuição a nível apical que mais predominava (Parr *et al.*, 2004).

A partir do momento que o enfisema é definido em termos patológicos como “perda de tecido pulmonar”, o maior avanço para o diagnóstico e quantificação do enfisema deveu-se à aplicação da tomografia computadorizada de alta resolução (TCAR) (Shaker *et al.*, 2004). A TCAR torácica permite identificar melhor a presença de enfisema, quantificá-lo e avaliar melhor a sua progressão (figura III-13).

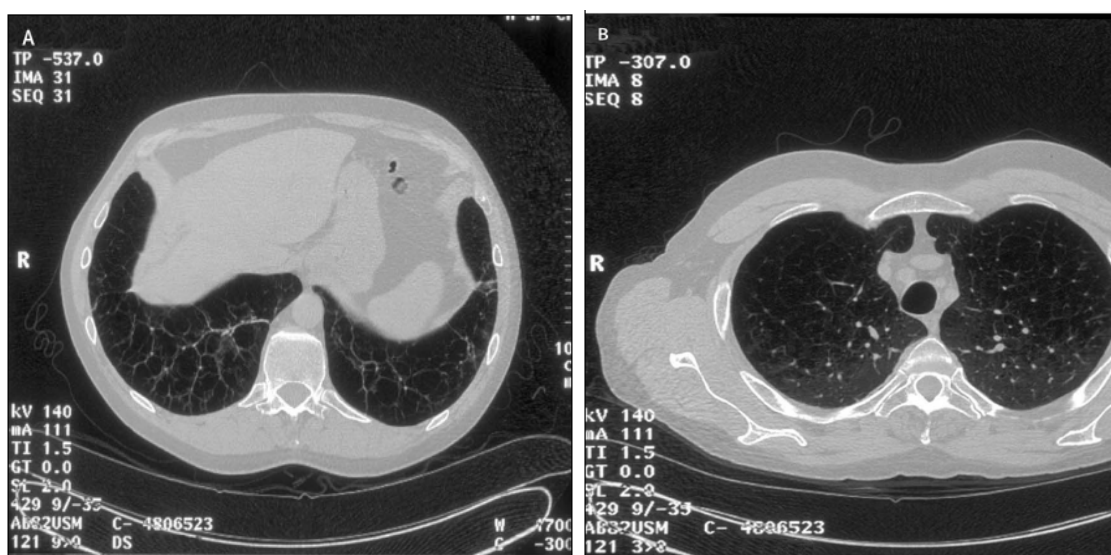


Figura III-13. Secções de uma tomografia computadorizada torácica de um paciente com défice de alfa-1 antitripsina com fenótipo ZZ. (A) Corte seccional a nível das bases pulmonares mostra uma alteração enfisematosa mais pronunciada que ao nível do ápice do pulmão (B) (Retirado de *Stoller & Aboussouan, 2005*).

A TCAR torácica demonstra claramente a destruição do parênquima pulmonar com aumento dos espaços aéreos e formação de bolhas (Fallat *et al.*, 1973). Estudos sugerem a associação entre a deficiência de AAT e a presença de bronquiectasias ou espessamento da parede brônquica (Shin & Ho, 1993; King *et al.*, 1996). As bronquiectasias estão presentes em 25 % dos casos (Dawson *et al.*, 2002). A TCAR é o método mais sensível para o diagnóstico de enfisema, permitindo a determinação do seu subtipo e da sua severidade, sendo que os seus achados estão intimamente ligados com a

extensão patológica do enfisema. Contudo, permanece insensível para a detecção de lesões muito precoces. Guest & Hansell (1992) demonstraram uma boa correlação entre o *score visual* do enfisema na TC torácica e o FEV₁/CVF. Foi igualmente descrita uma correlação significativa com a obstrução ao fluxo aéreo no défice de AAT (Dowson *et al.*, 2001). Assim, a TCAR torácica pode em breve vir a substituir os testes de função pulmonar como método *standart* para a avaliação da resposta aos novos tratamentos aplicados no défice de AAT em estudos clínicos (Shaker *et al.*, 2004).

3.6.4. Testes de função pulmonar

Apesar da função respiratória variar, a maioria dos pacientes apresenta-se com um padrão obstrutivo e um declínio do FEV₁ e da relação FEV₁/CVF mais acentuados, do que seria de esperar, tendo em conta a sua história tabágica. Outras características são o aumento do volume residual, a hiperinsuflação e o declínio da difusão gasosa. Contudo, este último facto, não é universal e, mesmo pacientes com obstrução grave das vias aéreas e enfisema predominante na TC torácica podem apresentar trocas gasosas normais (Wilson & Galvin, 2000).

3.7. TRATAMENTO

Actualmente, o tratamento para a deficiência de alfa-1 antitripsina (AAT) depende da apresentação individual: para a maioria dos indivíduos isto significa intervenções dirigidas para a doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC). As opções terapêuticas que têm como base o mecanismo molecular da doença, em vez dos seus efeitos, têm o potencial de tratar todos os aspectos relacionados com a patologia, e são objecto das investigações actualmente em curso.

3.7.1. Tratamento base para a DPOC

O tratamento geral para o défice de alfa-1 antitripsina (AAT) compreende a terapêutica habitual para a DPOC (ex.: cessação tabágica, vacinação preventiva, broncodilatadores, oxigénio suplementar quando indicado, reabilitação pulmonar, etc.).

A prevenção do desenvolvimento do enfisema depende somente do sucesso das intervenções em termos de saúde, empregues para eliminar os principais determinantes da progressão da doença, como o tabagismo e os pneumopoluentes ambientais. Como medida geral, está indicada a cessação tabágica. A evidência disponível demonstra que o declínio do FEV₁ é significativamente menor naqueles indivíduos que desistem de fumar. A cessação precoce do tabagismo é particularmente importante naqueles indivíduos homozigóticos para a doença. Infelizmente, os adultos jovens são menos receptivos a estas mensagens.

O controlo das infecções respiratórias e da hiperreactividade brônquica é teoricamente vantajoso por diminuir o encargo dos neutrófilos ao nível dos pulmões e das vias aéreas. A exposição ao tabagismo passivo, pó, fumo ou outros irritantes deve ser minimizada. Estratégias preventivas como a vacinação para o vírus influenza e para o pneumococcus são recomendadas. Com vista a minimizar o risco de desenvolver

doença hepática, a ATS/ERS recomenda efectuar o teste serológico para a hepatite. Relativamente à vacinação contra a hepatite no défice de AAT, em que o indivíduo não apresenta doença pulmonar ou hepática isolada, devem seguir-se as recomendações para a generalidade da população do respectivo local de residência. Contudo, a vacinação contra o vírus da hepatite B é recomendada aos pacientes com défice de AAT com doença hepática evidente. Uma vez que não foram encontrados casos entre os pacientes que estão a receber a terapêutica de substituição de AAT, a ATS/ERS sugere que não é obrigatório imunizar contra a hepatite B antes de iniciar a terapêutica substitutiva naqueles indivíduos com doença hepática (ATS/ERS, 2003).

3.7.2. Terapêutica para a doença pulmonar

3.7.2.1. Terapêutica de substituição da AAT

Com base no conhecimento disponível de que a redução local na concentração de AAT é a chave para o desenvolvimento de enfisema em indivíduos com o défice severo de AAT, parece lógico adoptar a estratégia de administrar AAT purificado de forma a aumentar os níveis circulantes de AAT - a denominada terapêutica de substituição (Stoller & Aboussouan, 2005).

Estudos prévios demonstraram que é possível administrar AAT de forma intravenosa no plasma de indivíduos com défice de AAT, resultando num aumento da concentração de AAT a nível do interstício pulmonar, indicando que a difusão passiva a partir do plasma de facto ocorre (Gadek *et. al.*, 1981). A concentração de AAT no interstício pulmonar depende primariamente da sua concentração sérica e da sua capacidade de se difundir através do epitélio e do endotélio pulmonares. Este facto tem uma importante implicação na decisão sobre a dose e a via de administração da AAT, de

forma a atingir a concentração “protectora” no espaço intersticial (Abusriwil & Stockley, 2007).

Têm sido usados para estabelecer a eficácia da terapêutica substitutiva dois tipos de critérios – bioquímico e clínico (Juvelekian & Stoller, 2004). Os critérios de eficácia bioquímica incluem a demonstração de que o fármaco pode aumentar os níveis séricos de AAT acima do valor protector estipulado (i.e, 11 $\mu\text{M/l}$) e é capaz de manter esses níveis durante todo o intervalo de tempo de actuação do fármaco. Além disso, uma vez que a determinação directa dos níveis de AAT intersticial em humanos não é tecnicamente possível, outro parâmetro é a demonstração de que o AAT intravenoso alcança o interstício pulmonar, verificando um aumento dos níveis no fluido adjacente ao epitélio pulmonar (ELF), obtido pelo processo de lavagem broncoalveolar. Finalmente, a eficácia bioquímica requer não só que os níveis de AAT sejam elevados a nível sérico e intersticial, mas também que a sua capacidade funcional de inibir a elastase neutrofílica esteja preservada depois de administrado o fármaco (Juvelekian & Stoller, 2004). Por seu lado, os critérios de eficácia clínica envolvem a demonstração de que a terapêutica de substituição confere protecção contra o desenvolvimento e/ou a progressão de enfisema; isto é, que seja capaz de desacelerar a taxa de declínio da função pulmonar ou confira outros benefícios clínicos como, por exemplo, contribuir para uma melhoria do estado funcional e da sobrevida (Juvelekian & Stoller, 2004).

Existem actualmente três preparações comercialmente disponíveis de AAT derivado de plasma humano com uso aprovado em diferentes países até à data: Prolastin®, AralastTM e ZemairaTM. A maior diferença entre os agentes de terapêutica substitutiva intra-venosa de AAT é o seu método de purificação (Stoller & Aboussouan, 2004).

Vários estudos foram efectuados para demonstrar a eficácia bioquímica da terapêutica substitutiva com AAT intravenosa. Wewers *et al.*, (1987) calcularam a dose requerida para aumentar a concentração de AAT acima de 11 $\mu\text{M/l}$ durante o intervalo de actuação do fármaco utilizado (Prolastin®). Cinco indivíduos homozigóticos PiZZ receberam AAT intra-venosa com dose situada no intervalo de 15-90 mg/Kg de peso corporal. Em todos os indivíduos foi demonstrado que a dose de 60 mg/Kg de peso de AAT semanalmente era a indicada para o tratamento a longo-prazo. Estudos subsequentes com doses alternativas, como 250 mg/kg uma vez por mês (Hubbard *et al.*, 1988) ou 120 mg/kg uma vez cada duas semanas (Barker *et al.*, 1997), foram menos promissores em termos bioquímicos, uma vez que as concentrações séricas de AAT foram mantidas acima do limite mínimo proposto por apenas um curto intervalo de tempo entre doses. Outro produto comercialmente disponível de AAT purificado (Aralast™) foi igualmente objecto de estudo em termos de eficácia bioquímica. Stoller *et al.* (2002), num estudo randomizado duplo-cego, compararam o Aralast™ com o Prolastin®, demonstrando que as duas formulações eram bioequivalentes.

A evidência disponível sobre a eficácia clínica de terapêutica substitutiva advém apenas de estudos observacionais e de pequenos estudos controlados randomizados e não de estudos clínicos controlados (Seersholm *et al.*, 1997; Dirkssen *et al.*, 1999; Lieberman *et al.*, 2000; Gottlieb *et al.*, 2000; Wencker *et al.*, 2001; Stockley *et al.*, 2002). Contudo, as *guidelines* internacionais (ATS/ERS, 2003) recomendam o uso da terapêutica substitutiva em pacientes com défice de AAT.

As causas para a ausência de estudos clínicos controlados até à data prendem-se com vários factos:

- a doença é rara e com poucos indivíduos identificados até ao momento;
- a doença desenvolve-se lentamente por um longo período de tempo;

- pequenas alterações na progressão do enfisema não podem ser monitorizadas com os métodos actualmente disponíveis.

Apesar destas limitações, têm sido feitas tentativas para obter informação sobre estudos observacionais que de alguma forma suportem o papel da terapêutica de substituição na desaceleração da progressão do enfisema. Os resultados desses estudos foram expressos em termos de taxa de declínio de FEV₁, alteração densitométrica na tomografia computadorizada torácica e frequência de exacerbações (Stoller & Aboussouan, 2005). Apenas um estudo randomizado duplo-cego comparou o tratamento com AAT derivado do plasma humano com um placebo (Dirksen *et al.*, 1999). Foi levado a cabo com 58 indivíduos tratados durante 3 anos, tendo sido utilizada uma dosagem de 250 mg/kg/28 dias. Os dados disponíveis não revelaram diferenças significativas em termos de função pulmonar. Contudo, os pacientes que receberam o tratamento com AAT apresentaram uma perda anual de densidade pulmonar, quantificada pela TC, de 1.50 g/L comparativamente com 2.57g/L nos pacientes que receberam o placebo (mas, sem significância estatística, i.e, p=0.07). Esta observação evidenciou um aspecto importante a considerar, que se prende com a possibilidade da determinação da densidade pulmonar pela TC poder ser usada como um parâmetro de monitorização da progressão do enfisema pulmonar em estudos clínicos (Shaker *et al.*, 2004).

Todos os outros dados disponíveis na literatura no que concerne à eficácia da terapêutica de substituição relacionam-se com estudos coorte comparativos. Esses estudos demonstraram uma redução significativa na taxa de declínio do FEV₁ em pacientes com FEV₁ entre 30-60% do valor previsto (Seersholm *et al.*, 1997; Wencker *et al.*, 2001). O maior estudo observacional disponível nos Estados Unidos, o *National Hearth, Lung and Blood Institute* (NHLBI), tem como base um registo prospectivo de

1129 indivíduos com défice severo de AAT (i.e. AAT inferior a 80 mg/dl). A comparação da taxa de sobrevida e do declínio da função pulmonar demonstrou que os pacientes que receberam terapêutica substitutiva (747 de 1129) apresentaram uma taxa de mortalidade inferior (risco relativo de morte 0.64%, 95% IC, 0.43-0.94; $p=0.02$) à apresentada por aqueles que nunca a receberam. As diferenças observadas entre os participantes, em termos de taxa de declínio do FEV₁, não foram significativas para a totalidade do grupo, mas apenas para aqueles indivíduos tratados que apresentavam défice moderado da função pulmonar (FEV₁ 35-49% do FEV₁ previsto). Um outro estudo observacional foi conduzido na Alemanha - *German Registry*- que colectou dados de forma prospectiva de pacientes que receberam terapêutica de substituição de AAT durante um período de 7 anos. O objectivo deste estudo era obter informação sobre a eficácia e a tolerância da terapêutica a longo-prazo com Prolastin® em pacientes com défice de AAT. Wencker e os seus colaboradores reportaram-se a 443 indivíduos do *German Registry* que receberam Prolastin® na dose de 60 mg/kg de peso semanalmente (Wencker *et al.*, 1997). A taxa média de declínio de FEV₁ nestes pacientes, sem diferenciação entre fumadores e não fumadores, foi de 57.1 ml/ano. Este valor corresponde a cerca de metade daquele descrito em indivíduos que não foram sujeitos a qualquer tratamento. Outro estudo publicado comparou o declínio do FEV₁ num grupo de 198 pacientes do *German Registry* tratados com Prolastin® com um grupo controlo de 97 indivíduos não tratados do *Danish Registry* (Seersholm *et al.*, 1997). A taxa média de declínio do FEV₁ foi mais lenta nos indivíduos do *German Registry*, mas análises subsequentes demonstraram que apenas os pacientes com FEV₁ entre 31 e 65% do previsto tinham benefício significativo. Isto sugere que se se observam benefícios, estes parecem restritos aos pacientes com défice de AAT com obstrução moderada do fluxo das vias aéreas.

Um subgrupo adicional que pode beneficiar do tratamento substitutivo com AAT foi encontrado recentemente (Wencker *et al.*, 2001). O estudo consistiu na avaliação retrospectiva da taxa de declínio do FEV₁ em pacientes com défice de AAT antes e durante o tratamento substitutivo. Os pacientes com FEV₁ acima de 65% de base cuja função pulmonar sofreu uma aceleração antes de iniciar o tratamento são os que beneficiam mais. Chapman *et al.* (2005), com base num registo de indivíduos no Canadá com défice de AAT, analisou retrospectivamente a evidência existente sobre a eficácia da terapêutica substitutiva de AAT, vindo a confirmar que esta terapêutica desacelera a taxa de declínio do FEV₁, principalmente, em pacientes com enfisema moderado (FEV₁ 30-65% do previsto). Contudo, em comparação com estudos prévios, não houve qualquer influência do FEV₁ de base na resposta à terapêutica de substituição (Abusriwil & Stockley, 2006). É difícil de analisar o efeito da terapêutica de substituição em pacientes com doença grave (FEV₁<30%), porque estes indivíduos muitas vezes falecem precocemente ou é considerada a hipótese de transplante pulmonar antes de realizar um *follow-up* suficientemente longo (Vidal *et al.*, 2006). Igualmente, é praticamente impossível avaliar o efeito deste tratamento em pacientes com doença moderada (FEV₁>60%). Portanto, os poucos pacientes que recebem o tratamento numa fase precoce são os casos índice, pois são os que apresentam sintomas particularmente graves ou que experimentam perda acelerada da função pulmonar. Em paralelo, os pacientes que pertencem ao grupo controlo, que não recebem o tratamento de substituição, são tendencialmente casos não índice, porque se apresentam assintomáticos ou com função pulmonar estável (Wencker *et al.*, 2001).

Em síntese, a terapêutica de substituição de AAT é indicada apenas em pacientes com enfisema pulmonar secundário a défice de AAT. Esta terapêutica não apresenta qualquer efeito na doença hepática associada a esta patologia. Além disso, esta

terapêutica só deve ser prescrita a pacientes com défice severo de AAT, o genótipo PiZZ ou uma variante deficitária rara e, evidência funcional de enfisema pulmonar (Miravitles *et al.*, 1999). Na tabela III-9 encontram-se indicados os critérios necessários para iniciar a terapêutica de substituição.

Tabela III-9- Critérios para iniciar a terapêutica de substituição de AAT (Adaptado de Vidal *et al.*, 2006).

1. Após os 18 anos de idade.
2. Défice de AAT demonstrado pela presença de concentração sérica de AAT abaixo de 35% do valor normal.
3. Fenótipo PiZZ ou variantes deficitárias raras.
4. Não fumadores ou ex-fumadores, pelo menos nos últimos 6 meses.
5. Enfisema pulmonar demonstrado pela sintomatologia ou $FEV_1/CVF < 70\%$ e $FEV_1 < 80\%$.
6. Em casos não índice, se evidência de perda acelerada da função pulmonar durante pelo menos um ano em pacientes com FEV_1 de 70-80%.
7. Exclusão de défice de IgA deve ser realizada.
8. Pacientes devem ter motivação de forma a efectuar um tratamento regular a nível hospitalar.

Um efeito interessante da terapêutica de substituição é que parece oferecer protecção contra as infecções brônquicas, um aspecto importante, dada a alta prevalência de bronquiectasias nesta população (Miravitles *et al.*, 1999). Needham & Stockley (2005), num estudo recente evidenciaram que mais de 50% dos pacientes com défice de AAT apresentam uma exacerbação durante um período de follow-up de 12 meses. As exacerbações frequentes correlacionam-se com o agravamento da difusão de gases (Dowson *et al.*, 2001; Needham & Stockley, 2005) e do estado de saúde

(Needham & Stockley, 2005) em pacientes com défice de AAT. Segundo Lieberman (2000) a terapêutica de substituição pode reduzir a frequência e gravidade das exacerbações em indivíduos com défice de AAT. Este facto parece estar relacionado com a restauração do desequilíbrio protease-antiprotease e a redução da inflamação nas vias aéreas de pacientes que recebem tratamento substitutivo (Stockley *et al.*, 2002). Com base nos dados disponíveis, este reduz o nível de leucotrieno B4 (LTB4) nas vias aéreas (Stockley *et al.*, 2002), o qual se pensa ter um papel importante nas exacerbações, e inibe significativamente os efeitos pró-inflamatórios induzidos pelas endotoxinas bacterianas *in vitro* e *in vivo* (Nita *et al.*, 2005).

No que diz respeito à segurança da terapêutica de substituição de AAT, os dados disponíveis de mais de 15 anos de utilização da terapêutica em causa sugerem que, de forma geral, é um tratamento bem tolerado e sem importantes efeitos adversos (Wencker *et al.*, 1998; Stoller *et al.*, 2003). Wencker *et al.* (1998) relataram a experiência de 443 indivíduos com défice de AAT, dos quais 65 apresentaram um total de 124 efeitos adversos. As reacções adversas mais comuns foram febre e arrepios (17 pacientes), urticária (18), náuseas e vômitos (21) e fadiga (7). Até à data, não foram reportados casos de doenças transmissíveis por transfusão sanguínea (ex: hepatite, HIV ou doença dos priões). No maior registo existente (NHLBI), com 747 indivíduos a receberem terapêutica de substituição, 174 indivíduos reportaram 720 efeitos adversos, dos quais os mais comuns foram dispneia (47%), vertigem (17%), náusea (9%) e dispneia (9%) (Alpha-1 Antitrypsin Deficiency Registry Group, 1998). A incidência média de eventos adversos foi significativamente baixa (0.02 eventos por paciente-mês), em que apenas 9% foram considerados efeitos graves e 1.7% exigiam tratamento urgente ou necessidade de hospitalização (Stoller *et al.*, 2003).

Relativamente ao custo, a terapêutica de substituição é dispendiosa (Stoller & Aboussouan, 2005). As estimativas anuais médias do custo por paciente da terapêutica de substituição rondam os 28 075 - 65 973 dólares/por ano, três vezes os custos anuais de pacientes com DPOC. Vários estudos analisaram a questão do custo-efectividade. As estimativas disponíveis rondam os 28.000 – 128.000 dólares de custo/ano de vida salvo (Hay & Robin, 1991), 13.971 dólares de custo adicional por ano de vida salvo (Alkins & O'Malley, 2000) e 207.841-312.511 dólares por qualidade de vida-ano (Gildea *et al.*, 2003).

Como apenas 2% da dose de AAT administrada de forma intra-venosa atinge o fluido adjacente ao epitélio pulmonar (ELF), vias alternativas de administração do fármaco têm sido investigadas (Hubbard & Crystal, 1990). A forma inalada pode ser um método mais eficaz de administração. Hubbard *et al.*, (1989a) avaliaram a AAT administrada sob a forma de aerossol (100 mg cada 12h durante 7 dias) para o tratamento de 12 pacientes com défice de AAT. Após esse período de tratamento, a concentração de AAT no ELF aumentou de $0.28 \pm 0.07 \mu\text{M}$ inicialmente para $5.86 \pm 1.03 \mu\text{M}$, próximo do valor normal. Como o esperado, um aumento na capacidade de inibir a elastase neutrofílica foi igualmente encontrado, passando do nível de $0.78 \pm 0.38 \mu\text{M}$ para $4.16 \pm 0.95 \mu\text{M}$.

A administração de AAT recombinante (rAAT) sob a forma de aerossol em indivíduos com défice foi também estudada (Hubbard *et al.*, 1989b). Em 16 indivíduos, rAAT foi administrada sob a forma de dose única em aerossol entre 10-200 mg. A concentração de AAT no ELF aumentou 40 e 5 vezes o nível basal nas 4 e 24h, respectivamente, após a administração da AAT. Apesar desta via não atingir o valor necessário a nível intersticial, a actividade de AAT a nível do ELF seria benéfico na redução da inflamação das vias aéreas induzida pela elastase neutrófila, protegendo

assim de forma indirecta o interstício pulmonar. Um modelo da DPOC em ratos veio sustentar o uso de AAT inalada na redução da severidade do enfisema (Pemberton *et al.*, 2006). Actualmente, o efeito da AAT em aerosolterapia tem ainda de ser testado em termos de eficácia clínica na prevenção do enfisema associado com o défice de AAT.

Apesar da terapêutica de substituição parecer ter um papel importante na desaceleração da progressão da doença pulmonar, novas formas de obter o produto têm de ser descobertas, pelo facto da AAT derivada do plasma humano ser variável em termos de pureza e de actividade e ser insuficiente para responder às exigências impostas. O gene Pi humano tem sido expresso numa variedade de hospedeiros, mas nenhum produto recombinante terapêutico obteve licença de comercialização até agora. Este produto necessita de ser seguro, clinicamente eficaz e custo-efectivo.

A expressão na *Escherichia coli* tem sido o sistema mais amplamente utilizado, mas é problemático porque a AAT recombinante (rAAT) não é glicosilada, o que afecta a conformação final da proteína, isto é, esta agrega-se mais facilmente e tem uma actividade reduzida e uma semi-vida média curta no sangue (Karnaukova *et al.*, 2006). Foi comprovado que a conjugação do rAAT com o glicol de polietileno prolonga a semi-vida média da E.coli-derivada rAAT, o que pode ser uma estratégia útil no futuro (Cantin *et al.*, 2002). As leveduras apresentam vantagens relativamente às bactérias para a produção de proteínas terapêuticas, visto que não produzem enterotoxinas (Karnaukova *et al.*, 2006). Todavia, os problemas ainda existem, porque o processo de glicosilação nas leveduras é diferente do dos humanos – o que pode conduzir a respostas imunes (Fukada, 2000). A utilização de rAAT a partir de animais transgénicos pode eventualmente ultrapassar o referido problema, e é executável em produções de larga-escala (Wright *et al.*, 1991; Carver *et al.*, 1993). Contudo, a primeira fase dum estudo utilizando rAAT inalado de leite de ovelha revelou a existência de uma resposta

sistémica com anticorpos (agravada se exposição repetida) a pequenas quantidades de rAAT de ovelha no produto (Spencer *et al.*, 2005).

3.7.2.2. Cirurgia de redução de volume pulmonar

A cirurgia de redução do volume pulmonar (CRVP) é uma técnica que consiste na ressecção de parte do parênquima pulmonar, reduzindo a hiperinsuflação e melhorando a mecânica ventilatória. Permite um aumento da elasticidade pulmonar e melhora os débitos expiratórios. Existem vários estudos randomizados que têm comparado a CRVP com a terapêutica médica otimizada; o mais importante é o *National Emphysema Treatment Trial* (NETT), que envolveu 1218 pacientes com enfisema. Os resultados deste estudo sugerem que a eficácia deste tipo de cirurgia é variável consoante a gravidade dos doentes. De facto, demonstrou benefícios em alguns pacientes, nomeadamente doentes com enfisema dos lobos superiores e reduzida capacidade de exercício, que apresentaram uma maior sobrevivência do que doentes similares que apenas efectuaram terapêutica médica (54% *versus* 39.7%). Além disso registou-se ainda uma melhoria da capacidade de exercício e qualidade de vida nestes doentes (Fishman *et al.*, 2003). Contudo, tendo sido dada pouca atenção à efectividade da CRVP no enfisema associado ao défice severo de AAT. Alguns estudos randomizados explicitamente excluíram indivíduos com défice de AAT (Miller *et al.*, 2005). Até ao momento, os resultados de três estudos observacionais de pequena dimensão, descrevendo 6 (Gelb *et al.*, 1999), 12 (Cassina *et al.*, 1998) e 21 (Tutic *et al.*, 2004) pacientes, sugerem que CRVP pode conferir melhoria inicial similar (Cassina *et al.*, 1998; Tutic *et al.*, 2004) ou mais modesta (Gelb *et al.*, 1999) no FEV₁ ao tratamento médico. Além disso, esses benefícios são menos sustentados em indivíduos com défice de AAT do que em indivíduos com doença pulmonar obstrutiva crónica (Cassina *et al.*,

1998; Tutic *et al.*, 2004). Um outro estudo vem corroborar que o subgrupo de pacientes que beneficia mais da CRVP é aquele que apresenta doença mais heterogênea, com predomínio nas zonas superiores do pulmão (Koebe *et al.*, 2002). A análise comparativa dos três estudos referidos anteriormente revela diferenças nas intervenções cirúrgicas e nos resultados, e nas características dos indivíduos estudados, pelo que deve ser avaliado de forma cautelosa. Mais recentemente, o estudo levado a cabo por Stoller e os seus colaboradores aumentou para 49 casos a experiência publicada com a CRVP em pacientes com défice severo de AAT. Stoller *et al.* (2007) concluíram que a CRVP, em comparação com o tratamento médico nos pacientes com défice de AAT presentes no NETT, apresenta uma mortalidade superior. Além disso, os resultados sugerem que os benefícios da CRVP são mais modestos em pacientes com défice de AAT do que em indivíduos sem esse défice. Actualmente é recomendada cautela na avaliação do benefício da CRVP em indivíduos com défice severo de AAT.

3.7.2.3. Transplante pulmonar

A incidência do transplante pulmonar no défice de AAT tem crescido exponencialmente ao longo das últimas duas décadas, contribuindo para cerca de 10-15% dos transplantes realizados nos Estados Unidos da América. O procedimento mais amplamente efectuado é o transplante unilateral (Mal *et al.*, 1989), mas devido à relativa idade jovem dos candidatos, uma proporção mais elevada de pacientes com défice de AAT relativamente aos pacientes com DPOC tem sido sujeita a transplante bilateral (Low *et al.*, 1992). Os dados mais recentes apontam para que o transplante bilateral resulte numa melhoria do resultado obtido nos pacientes com enfisema, incluindo aqueles com défice de AAT (Cassivi *et al.*, 2002). O transplante pulmonar tem algumas limitações, relacionadas com a escassez de órgãos e com o custo elevado, quer com a

cirurgia quer com o tratamento imunossupressor. O papel da terapêutica de substituição após o transplante ainda não é completamente conhecido, uma vez, que a taxa de declínio da função pulmonar no pulmão transplantado, com ou sem terapêutica substitutiva, ainda não foi descrito. Dados limitados sugerem que em patologias do foro respiratório, é mais provável ser detectada a elastase neutrofílica no ELF dos indivíduos transplantados por défice de AAT do que em indivíduos transplantados por outras razões (King *et al.*, 1994). Este dado pode, assim, suportar o uso de terapêutica substitutiva de AAT durante a fase aguda da inflamação pulmonar. De facto, a ATS/ERS (2003) nas suas recomendações publica que: *“Insufficient evidence regarding the benefits of augmentation therapy in patients who have undergone lung transplantation for [alpha-1 antitrypsin] deficiency precludes a firm recommendation. However, it has been observed that inflammation results in free elastase activity in epithelial lining fluid in individuals who have undergone lung transplantation (e.g. during acute rejection and infection). In the context of available data regarding this issue, this observation leads the Task Force to favor augmentation therapy for lung transplant recipients during such episodes”*.

3.7.2.4. Transplante pulmonar versus cirurgia de redução de volume pulmonar

O transplante pulmonar e a CRVP são procedimentos que podem ser usados em pacientes muito similares. A relação entre estes dois procedimentos e as razões para seleccionar um em vez do outro têm sido objecto de investigação no NETT. Schulman (2002) referiu que existem cinco formas pelas quais o transplante pulmonar e a CRVP se podem relacionar: (1) CRVP em vez de transplante pulmonar, (2) CRVP como “ponte” para o transplante, (3) CRVP simultaneamente com transplante pulmonar unilateral para reduzir a hiperinsuflação, (4) CRVP após transplante pulmonar unilateral para reduzir a hiperinsuflação e (5) CRVP após transplante pulmonar unilateral para salvaguardar a rejeição crónica. Benditt (2004) apresenta a seguinte proposta (tabela III-

10) para a definição de critérios que permitam com segurança optar por uma das opções cirúrgicas.

Tabela III-10. Proposta de algoritmo para a selecção de pacientes para cirurgia de redução de volume pulmonar versus transplante pulmonar em pacientes com DPOC (Adaptado de *Benditt, 2004*)

<i>Transplante pulmonar</i>	<i>CRVP</i>	<i>CRVP ou Transplante pulmonar ou CRVP seguida de transplante pulmonar</i>
Doença obstrutiva crónica “purulenta” Bronquiectasias >1/4cup expectoração/dia Associada a hipertensão arterial pulmonar e/ou insuficiência cardíaca direita Ausência de hiperinsuflação CPT<100% do previsto ou VR<150% do previsto FEV1<20% do previsto com enfisema homogéneo ou DLCO <20% do previsto Sem enfisema dos lobos superiores, com reduzida capacidade de exercício PaCO ₂ > 55 mmHg PaO ₂ <50 mmHg Distância <300m na prova dos 6 minutos	Idade > 65 anos com enfisema dos lobos superiores e reduzida capacidade de exercício Idade > 65 anos com doença dos lobos superiores e alta capacidade de exercício Idade > 65 anos sem doença dos lobos superiores e reduzida capacidade de exercício Idade < 65 anos com FEV1 30-45% do previsto, mas sintomas severos apesar de terapêutica médica optimizada	Idade < 65 anos e preenche os critérios quer para CRVP quer para transplante pulmonar
CPT- capacidade pulmonar total; FEV1- volume expiratório forçado no primeiro segundo; PaO ₂ - pressão parcial de oxigénio; PaCO ₂ - pressão parcial de dióxido de carbono		

3.7.3. Terapêutica para a doença hepática

Uma vez que a causa da doença hepática no défice de AAT se relaciona com a acumulação de polímeros de AAT mutada nos hepatocitos, não existe qualquer benefício em termos hepáticos com a terapêutica substitutiva de AAT exógeno. Em vez disso, a única terapêutica curativa para pacientes com défice de AAT com doença hepática grave é o transplante hepático (Hood *et al.*, 1980; Gartner *et al.*, 1984). O transplante hepático está associado com uma boa taxa de sobrevivência, em adultos e em crianças (70-80% e 60-70%, respectivamente). Os efeitos do transplante hepático nos níveis plasmáticos de AAT e na deterioração pulmonar encontram-se pouco caracterizados, todavia, em termos teóricos, o procedimento deveria corrigir o desequilíbrio protease-antiprotease existente a nível pulmonar (Mulgrew *et al.*, 2007).

Nos casos em que o transplante não é possível, existem benefícios paliativos com a aplicação de um shunt porto-cava (Starzl *et al.*, 1983; Starzl *et al.*, 1990).

Tabela 11. Formas de tratamento (Adaptado de *Mulgrew et al.*, 2007)

Terapêutica	Comentários
Medidas gerais	Cessação tabágica Minimizar exposições ambientais
Vacinação	Vacina anti-influenza Vacina anti-pneumoc�ccica Hepatite B (se doença hepática) (considerar antes da terapêutica substitutiva)
Tratamento médico não específico	Broncodilatadores Esteróides inalados, se reactividade das vias aéreas ou como indicado nas guidelines DPOC Oxig�nio suplementar (segundo ATS/ERS guidelines) Antidepressivos/Ansiolíticos (se indicado) Reabilita�o pulmonar Suporte nutricional Antibioterapia de suporte precoce durante as exacerbações
Terapia de substitui�o	
AAT derivado de plasma humano (intravenosa)	Declínio rápido do FEV1 (>120 ml/ano) FEV1 entre 30% e 65% do previsto Considerar durante episódios de inflama�o pulmonar após transplante pulmonar
Terapêutica inalada/aerosol	Dados preliminares parecem sugerir que a administra�o 1-2x/dia pode produzir protec�o anti-elastase sustentada Forma potencial de administra�o para AAT transg�nico ou recombinante
Medidas cirúrgicas	
Transplante pulmonar	Transplante pulmonar unilateral � o mais frequentemente usado Melhores resultados com o transplante bilateral
Cirurgia de redu�o do volume pulmonar	Evidência insuficiente para recomendar
Transplante hepático	Sem terapia específica para a doença hepática

3.7.4. Novos tratamentos

Tratamentos promissores incluem a terapia genética (Flotte *et al.*, 2004), estratégias para inibir a polimerização intra-hepática de AAT (Parfrey *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2004) e promover a secreção hepática (Burrows *et al.*, 2000), inibição da elastase neutrofílica por pequenas moléculas inibidoras (Llewellyn-Jones *et al.*, 1994) e estudo sobre a aplicação de células estaminais (Wang *et al.*, 2007).

3.7.4.1. Terapia genética

A terapia genética oferece a oportunidade de corrigir a anormalidade primária e restaurar a síntese de AAT. Esta consiste na substituição de genes deficientes ou ausentes de uma célula de forma a permitir que esta funcione normalmente. Contudo, existe uma série de dificuldades associadas com a terapia genética. Mais de 10-20 mg de AAT têm de ser sintetizadas em cada dia e têm de ser capazes de atingir o interstício pulmonar (Mulgrew *et al.*, 2007). O sucesso da terapia genética relaciona-se com a escolha do vector e da célula-alvo. Os quatro principais vectores usados para transferir cDNA para células-receptoras são retrovírus (Kai *et al.*, 1992), adenovírus (Kay *et al.*, 1995; Schiedner *et al.*, 1998), *adeno-associated viruses* (AAV) (Song *et al.*, 2001; Lu *et al.*, 2006) e vectores não víricos (Alino *et al.*, 1994). Os *adeno-associated viruses* têm sido até agora a forma mais útil, uma vez que é capaz de atingir níveis terapêuticos de AAT e, são menos propensos a induzir respostas inflamatórias que os vectores adenovirais. Apresentam ainda um sítio específico de incorporação no genoma humano (denominado AVS), permitindo ao material genético transportado pelo vector a capacidade de expressão a longo-prazo.

Uma variedade de formas de administração tem sido tentada para a terapia genética. Inicialmente, foi experimentada a terapia direccionada ao fígado (Kay *et al.*,

1992; Kay *et al.*, 1995), incluindo injeção do vector pela veia porta (Song *et al.*, 2001), mas foi inexecutável para uso em humanos. A instilação por via aérea do vector sugeriu que o tratamento inalado ou nebulizado poderia ser uma via alternativa (Rosenfeld *et al.*, 1991; Canonico *et al.*, 1994). Contudo, o método com mais sucesso até agora foi a injeção intra-muscular (Lu *et al.*, 2006). Este sistema está agora na fase II de experimentação na Universidade da Florida, mas pode ser posto de lado por serem necessárias grandes doses de vector para atingir um nível terapêutico de AAT (Wood & Stockley, 2007). É de realçar, que estes resultados, são potencialmente úteis para a protecção do pulmão e outros tecidos, mas não influenciam a doença hepática. Estes resultados sugerem que a terapia genética pode, de facto, ser uma modalidade terapêutica promissora no futuro (Wood & Stockley, 2007).

3.7.4.2. Terapias modificadoras da polimerização e secreção de AAT

O mecanismo básico subjacente da doença hepática nas formas mais comuns de défice de AAT é a acumulação intra-hepática de AAT. A polimerização está na base da acumulação da forma PiZ do défice de AAT. Um grupo de factores que desempenham funções de controlo de qualidade das proteínas anormalmente pregueadas (como, a AAT), tem sido objecto de estudo (Wood & Stockley, 2007). Os componentes que se sabe terem essa actividade incluem glicerol, óxido N-trimetilamina e o ácido 4-fenilbutírico. Destes, o ácido 4-fenilbutírico demonstrou mediar um aumento na secreção de AAT Z em cultura celular e em modelos animais (Burrows *et al.*, 2000). O ácido 4-fenilbutírico demonstrou ser capaz de estabilizar a AAT nativa (Devlin *et al.*, 2001), mas não de prevenir a polimerização de AAT Z num modelo de cultura celular (Burrows *et al.*, 2000). A inibição precisa da polimerização de AAT Z pode ser alcançada pela ligação de pequenos péptidos à folha β -A. Estudos iniciais usaram

moléculas com 11-13 resíduos, mas que se revelaram inespecíficos para a AAT Z e por isso não puderam ser usados (Lomas *et al.*, 1992). Os mesmos investigadores conseguiram aceder a pequenas moléculas, estas agora com especificidade, e ainda efectivas no bloqueio do processo, permitindo que a AAT seja libertada das células (Mahaveda *et al.*, 2002; Parfrey *et al.*, 2004; Chang *et al.*, 2006). Os fármacos desenvolvidos a partir destas moléculas podem ajudar a prevenir a doença hepática por acumulação de AAT. Infelizmente, se o péptido se liga à molécula, também previne a AAT de ter uma acção antielastase, uma vez que deve ser igualmente capaz de se dissociar para proteger o pulmão. Parfrey *et al.* (2004) demonstraram que peptídeos 6-mer se dissociam da forma AAT Z sob condições fisiológicas, com o material dissociado a ter alguma actividade antiprotease. Investigação posterior é necessária e pode conduzir a terapêuticas potencialmente úteis.

3.7.4.3. Outros tratamentos

Os conceitos subjacentes à terapêutica de substituição de AAT podem ser aplicados às terapias com outros inibidores. Assim, o inibidor da proteinase leucocitária secretora recombinante pode ser dada aos pacientes por via inalada. Este inibidor é melhor que a AAT no que se refere à protecção do tecido conjuntivo contra a degradação por neutrófilos, talvez pela capacidade de se ligar na forma iónica ao substrato (Llewellyn-Jones *et al.*, 1994). Contudo, o papel dos inibidores químicos permanece desconhecido, apesar do pequeno tamanho molecular destes agentes sugerir que a penetração no interstício possa ser superior à das proteínas nativas e, assim, é necessário investigar novas formas de administração da terapêutica (parentérica, oral ou inalada).

A investigação usando células estaminais tem mostrado algum potencial para o tratamento do défice de AAT, contudo, esses resultados requerem uma apreciação cautelosa antes do seu uso clínico. As células estaminais podem diferenciar-se em células hepáticas capazes de expressar AAT (Saito *et al.*, 2006; Moriya *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2007), assim sendo, o transplante destas células em pacientes com défice de AAT poderia facilitar a produção normal de AAT. Porém, isto não seria capaz de prevenir a acumulação de polímeros a nível hepático e, poderia não afectar necessariamente as manifestações hepáticas da doença. Alternativamente, é possível diferenciar células estaminais de embriões humanos em células do epitélio alveolar tipo II (Wang *et al.*, 2007).

IV. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE UM CASO CLÍNICO

IV. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE UM CASO CLÍNICO

4.1. Apresentação do caso clínico

CMC, de 46 anos de idade, sexo masculino, raça caucasiana, operário da construção civil (mármore) durante 30 anos e residente em Almeida (Guarda). Fumador durante 30 anos (até 2000), com carga tabágica de 34 UMA; com hábitos etílicos moderados. Foi referenciado à consulta de Pneumologia em Janeiro de 2001, por apresentar quadro clínico com cerca de 2 anos de evolução e de agravamento progressivo, caracterizado por dispneia, intolerância ao esforço, anorexia e emagrecimento. Negava tosse, expectoração, pieira, toracalgia, febre ou sudorese. Na altura era seguido pelo médico assistente com o diagnóstico de doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC). Estava medicado com teofilina 125 mg 2 id desde há dois anos.

Dos antecedentes pessoais havia a salientar história de “problemas hepáticos” e diagnóstico de DPOC e gastrite crónica (biópsia do antro gástrico em 2000). Da história familiar de realçar: mãe, falecida com 65 anos de idade com hepatocarcinoma; pai com DPOC, falecido com 79 anos por “problema hematológico” e filha com história de “hepatite” na infância.

Durante o período de tempo anterior à referenciação para a consulta de Pneumologia, fez vários exames complementares de diagnóstico e foi observado nas consultas de Gastrenterologia e Cardiologia. Realizou estudo analítico (hemograma e bioquímica sem alterações, excepto discreta elevação das transaminases e gammaglutamiltransferase- 71 U/L), telerradiografia torácica (que revelou um padrão compatível com broncoenfisema), ecografia abdominal (sem alterações significativas), ecocardiograma (ritmo sinusal; extrassístolia ventricular; provável hipertrofia ventricular direita) e ecocardiograma (sem alterações significativas).

No exame objectivo apresentava um biótipo longilíneo (peso-55,5 kg; altura 1,63m e IMC=21%); mucosas coradas ligeiramente desidratadas; tórax simétrico, hipomóvel, timpânico à percussão; polipneico (FR: 20 ciclos/min); auscultação cardíaca: rítmica (FC 88 bat/min), sem sopros e hipofonese dos sons cardíacos; auscultação pulmonar: diminuição global do murmúrio vesicular; sem cianose, sem sinais de descompensação cardíaca ou organomegalias.

Foi aconselhado evicção tabágica e alcoólica, tendo sido medicado com formoterol, brometo de ipratrópio e mantida teofilina.

Foram solicitados posteriormente novos exames complementares de diagnóstico que revelaram: Hemograma (Hb 16 g/dl e Htc 47%), Bioquímica (elevação da gamaglutamiltransferase (GGT) e fosfatase alcalina); Ecocardiograma (normal). Radiografia do tórax evidenciando padrão de broncoenfisema (figura IV-1); TC torácica de alta resolução (TCAR): “destruição generalizada da densidade parenquimatosa em relação com o enfisema centro-lobular” (figura IV-2).

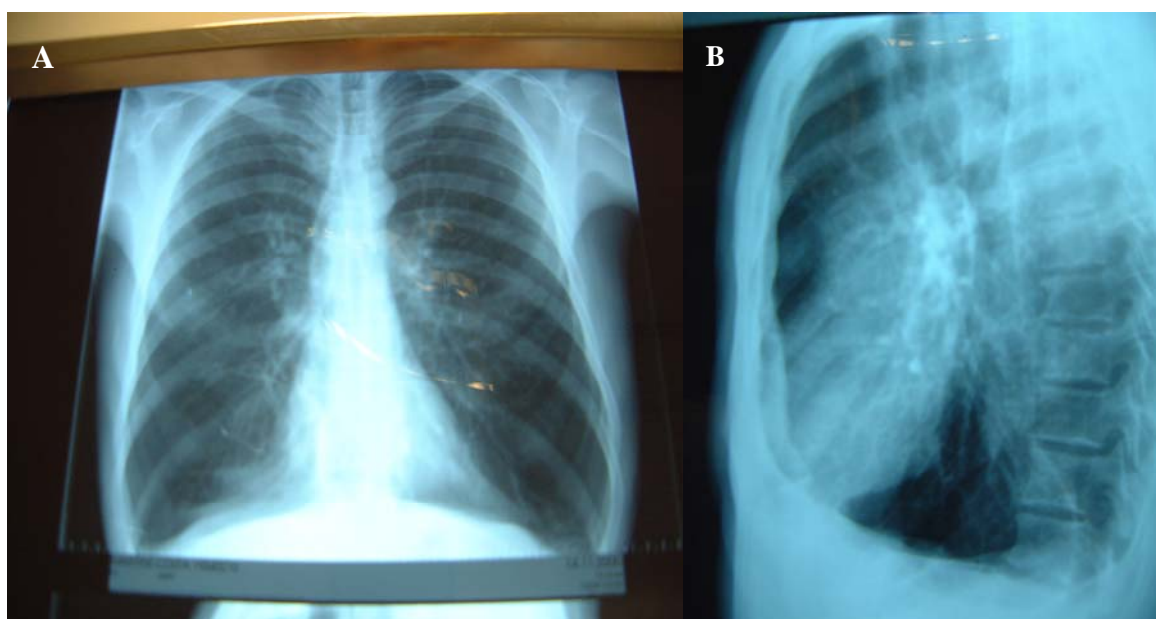


Figura IV-1. Evidência de sinais de hiperinsuflação, acompanhada de áreas de maior hipertransparência nas bases pulmonares na telerradiografia do tórax. (A) Perfil postero-anterior (B) Perfil lateral

O estudo funcional respiratório inicial evidenciou a presença de síndrome obstrutivo grave com hiperinsuflação pulmonar grave, sem resposta significativa ao broncodilatador e redução ligeira da difusão: CV 2,11 (56% do previsto), FEV₁: 0,92 (30% do previsto), V. residual: 5,54 (285%) e DLCO: 1,24 (65% do previsto). A gasimetria arterial em ar ambiente: pH- 7,48; pO₂- 59 mmHg; pCO₂- 30 mmHg; Sat.de O₂- 92%. O doseamento de alfa-1 antitripsina foi de 17 mg/dl (N:120-230 mg/dl). O resultado da biologia molecular (fenotipagem) revelou o genótipo PiZZ (2002).

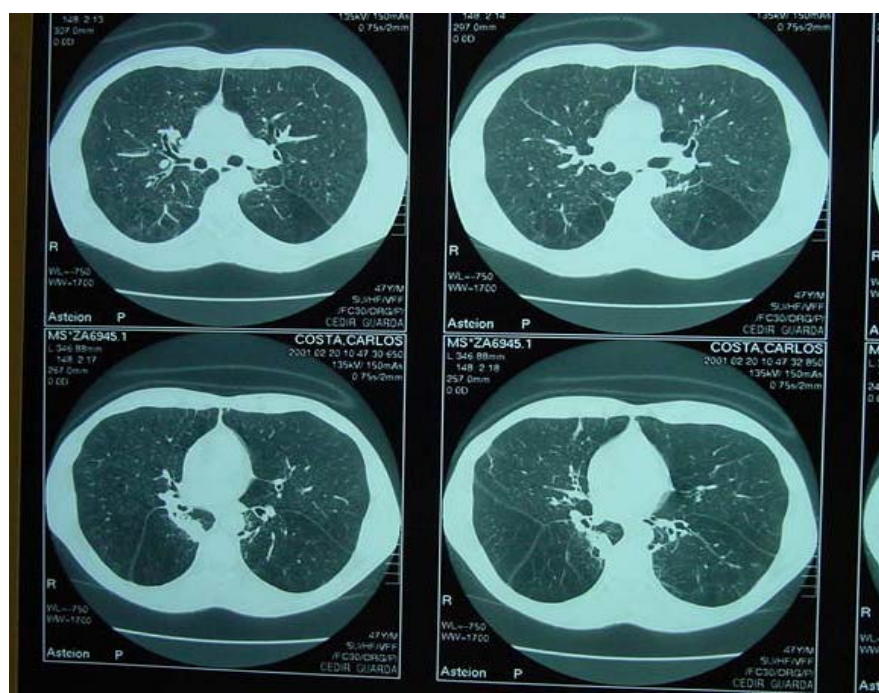


Figura IV-2. TC torácica de alta resolução com áreas de enfisema a nível das bases pulmonares.

O plano terapêutico teve três vertentes: as medidas gerais (evicção do local de trabalho, aconselhamento sobre evicção tabágica e alcoólica, a instituição de dieta hipercalórica, suplemento vitamínico - vitaminas lipossolúveis e aconselhamento sobre exercício físico e sinais de alerta para infecção respiratória) e a terapêutica médica inespecífica (imunizações – anti-influenza, anti-pneumococos e hepatite B, associação de corticoterapia inalatória, programa de cinesioterapia respiratória e oxigenioterapia domiciliária em SOS). Além disso, propôs-se o doente para terapêutica de substituição

com AAT (Prolastin®) semanalmente, que apenas iniciou em Julho de 2003, uma vez que esta terapêutica não estava ainda aprovada em Portugal.

Em Março de 2003 informou-se o doente da importância do estudo genético familiar (figura IV-3). É efectuado relatório para o médico assistente acerca dos familiares colaterais, aconselhando doseamento de AAT e fenotipagem. O estudo dos descendentes directos consistiu em: história clínica, doseamento de AAT e fenotipagem, Rx tórax AP e perfil esquerdo, provas de função respiratória, provas de função hepática (AST, ALT, fosfatase alcalina, bilirrubina total, albumina, provas de coagulação), ecografia hepática e alfa- fetoproteína. As medidas gerais implementadas relacionaram-se com a evicção tabágica.

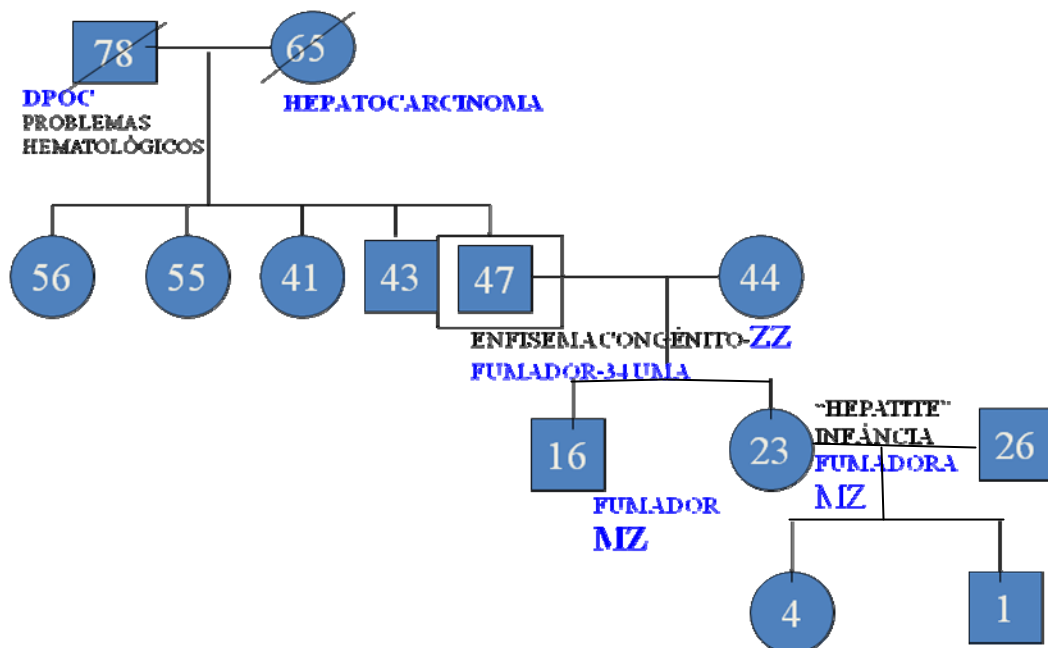


Figura IV-3. Heredograma familiar do indivíduo com fenótipo PiZZ.

Em Setembro de 2003, foi pedida colaboração da Gastreenterologia, por apresentar RMN abdominal que revelou “na transição de V-VIII, um nódulo de 1,2 cm com características de hemangioma”. Foi feita biópsia hepática guiada por TC, que em termos anatomopatológicos não apresentava qualquer significado patológico.

Em Maio de 2005 há agravamento progressivo das queixas, com dispneia e cansaço para pequenos esforços. Foi pedida nova TCAR que revelou “enfisema pulmonar centro-lobular nos lobos superiores e panlobular nos lobos inferiores”. O estudo funcional respiratório mostra FEV₁ de 27%, VR de 302% e a gasimetria arterial indica uma PaO₂ de 59 mmHg em repouso (com FiO₂ a 21%). A evolução funcional está assinalada na tabela IV-1, constatando-se a presença de uma deterioração significativa do FEV₁. O ecocardiograma apresentava PAPs de 42 mmHg com cavidades direitas normais.

Tabela IV-1. Evolução dos parâmetros funcionais respiratórios desde 2002 até 2007.

<i>ANO</i>	<i>CVF</i>	<i>FEV1</i>	<i>FEV1/CVF</i>	<i>FEV1 após BD</i>	<i>CVF após BD</i>
2002	2,11(56%)	0,92(30%)	44%	+0%	+1%
2003	3,26(87%)	1,17(38%)	36%	-3%	-1%
2004	2,51(67%)	0,98(32%)	39%	-2%	+5%
2005	1,76(47%)	0,83(27%)	47%	-2%	+10%
2007	1,63(44%)	0,57(19%)	35%	-1%	+1%

O paciente foi medicado com broncodilatadores de longa acção (formoterol e tiotrópio) e corticoterapia inalatória (budesonido). Realizou oxigenioterapia domiciliária e um programa de reabilitação pulmonar (com pouco adesão). Fez vacina hepatite B e vacina anti-pneumocócica (2003). Apesar de terapêutica de substituição regular e, perante o agravamento do quadro clínico do paciente (com quadro grave de insuficiência respiratória), foi solicitada uma decisão terapêutica por parte do Hospital de Santa Marta (Lisboa) sobre a possibilidade de cirurgia de redução de volume pulmonar versus transplante pulmonar.

Este paciente recebia duas ampolas de Prolastin® por semana (por sessão de tratamento), pelo que, o cálculo do custo total da terapêutica de substituição de AAT rondou os sessenta e dois mil euros (tabela IV-2).

Tabela IV- 2. Custo total da terapêutica substitutiva de alfa-1 antitripsina (Prolastin®) deste paciente

<i>Data</i>	<i>Internamento (n° de tratamentos)</i>	<i>Ambulatório (n° de tratamentos)</i>	<i>Custo (por ampola) (em euros)</i>	<i>Custo (ano) (em euros)</i>
22/07/03	0	25	230	11.500
2004	0	51	240	24.480
2005	2	50	250	26.000
2006	6	42	240	23.040
Total	8	168		61.620

Em Janeiro de 2006 é proposto para transplante pulmonar. Veio a ser transplantado em Maio de 2007, tendo falecido por complicações operatórias.

4.2. Discussão do caso clínico

O défice de alfa-1 antitripsina é com frequência subdiagnosticado (Mickel *et al.*, 2005; Stoller *et al.*, 2005). Além disso, o diagnóstico ocorre frequentemente em fases tardias com deterioração acentuada da função pulmonar, impedindo que o benefício, que advém das medidas de prevenção e de terapêutica precoce, seja otimizado.

A clínica apresentada por este paciente era sobreponível à referida na literatura. A queixa predominante que motivou a procura dos cuidados de saúde foi a dispneia, que corresponde ao sintoma mais frequentemente descrito pelos pacientes com défice de AAT (McElvaney *et al.*, 1997). A dispneia, como sintoma inespecífico, é frequentemente atribuída, em idades jovens, a causa cardíaca. Por isso, no caso em questão, o paciente foi enviado numa primeira fase à consulta de Cardiologia. A presença de factores de risco (o tabagismo e a exposição ocupacional) na sua história pessoal deveria ter evocado, logo de início, a possibilidade de patologia do foro pulmonar.

No presente caso clínico, o diagnóstico de doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC) por défice de AAT deveria ter sido evocado por vários motivos:

- a) tratava-se de um paciente jovem com DPOC;
- b) a presença de história familiar de doença pulmonar (pai) e doença hepática (mãe - hepatocarcinoma e filha - “hepatite”);
- c) a existência de alterações radiológicas características compatíveis com enfisema a nível das bases pulmonares.
- d) Estas situações constituem actualmente recomendações da ATS/ERS (2003),
 - 1) enfisema de aparecimento precoce (≤ 45 anos), na ausência de um factor de risco conhecido (tabagismo, exposição ocupacional, etc.) ou de predomínio basal bilateral;

- 2) doença hepática inexplicada;
- 3) paniculite necrotizante;
- 4) vasculite C-ANCA;
- 5) história familiar de enfisema, bronquiectasias, doença hepática ou paniculite e
- 6) bronquiectasias sem etiologia evidente.

No presente caso clínico, o tempo decorrido entre o início dos sintomas (ou melhor, a solicitação da assistência médica) e o diagnóstico foi de 2 anos, bastante inferior ao descrito na literatura (Stoller *et al.*, 1995; Campos *et al.*, 2005), que é de aproximadamente 7 anos. Mais do que um diagnóstico tardio, ocorreu um atraso na procura dos cuidados assistenciais de saúde. Presumivelmente, numa primeira fase, devido à desvalorização e atribuição dos sintomas por parte do paciente à sua exposição tabágica e profissional; e, num segundo momento, pela falta de sensibilização do clínico de Medicina Geral e Familiar (MGF) em relação à ocorrência de DPOC em idades jovens e da importância da pesquisa sistemática do défice de AAT em pacientes com esta patologia.

Na prática clínica, o exame mais frequentemente usado para o diagnóstico da DPOC é o Rx tórax. Sendo um exame morfológico apenas apresenta alterações em fases avançadas da doença pulmonar. A espirometria, um exame de diagnóstico simples e fundamental para avaliação de doença pulmonar em fase precoce, ainda não está suficientemente divulgada a nível dos cuidados de saúde primários.

A associação entre o défice de AAT e o tabagismo tem um efeito devastador em termos de função pulmonar. Apesar das recomendações da World Health Organization (WHO) e da ATS/ERS, muitos clínicos, assim como pacientes com DPOC,

permanecem completamente desconhecedores da realidade da situação. Existe um risco muito superior de declínio da função pulmonar em indivíduos com défice de AAT, quando este se encontra associado a factores ambientais. O tabagismo é, portanto, um elemento-chave na história natural de pacientes com deficiência de AAT. Os dados disponíveis salientam a importância da cessação tabágica nos indivíduos com o défice de AAT, nos quais, apesar da presença de uma condição hereditária, a escolha entre fumar ou não fumar, pode representar a diferença entre ter enfisema precoce ou permanecer livre de doença pulmonar durante um período quase normal da vida activa. Assim, a história natural da doença pulmonar por défice de AAT pode ser atrasada, com medidas gerais tão simples, como alterações dos estilos de vida e redução dos factores de risco (tabagismo e exposição ocupacional a pneumopoluentes). Sendo a componente genética igualmente um factor importante, impõe-se a aplicação de testes genéticos a familiares directos dos pacientes com défice de AAT, de forma a identificar os indivíduos em risco de desenvolver a doença. Estes familiares constituem uma oportunidade de intervenção “de ouro” em termos de saúde pública, na medida em que é possível actuar precomente sobre os determinantes ambientais da doença. É evidente que o rastreio de familiares pode desencadear ansiedade e questões de índole legal. Mas, actualmente, estão disponíveis estratégias para auxiliar os pacientes a parar de fumar (intervenção mais importante para travar a progressão da doença pulmonar), pelo que testar os familiares de pacientes com défice de AAT é perfeitamente justificável. No presente caso clínico na altura do diagnóstico o doente apresentava uma carga tabágica muito elevada que, por certo esteve na base da evolução acelerada do quadro clínico. A intervenção em termos de evicção tabágica nos descendentes terá sido fulcral na prevenção da manifestação da doença.

A terapêutica de substituição é a única terapêutica específica actualmente disponível quando existe enfisema pulmonar por défice de AAT. Está indicada em doentes portadores de fenótipos Pi(nulo)(nulo), PiZZ, PiZ(nulo) (ARS/ETS, 2003). É o caso do paciente apresentado (PiZZ). Segundo a literatura existente, foi constatada uma resposta favorável quando existe uma obstrução moderada (FEV_1 entre 35-65% do previsto) (Seersholm *et al.*, 1997; Wencker *et al.*, 2001; Chapman *et al.*, 2005). Os doentes com valores de $FEV_1 < 35\%$ ou $> 50-60\%$ do previsto não têm mostrado um benefício tão evidente (Vidal *et al.*, 2006). Neste paciente, apesar da instituição do tratamento de substituição com AAT ocorreu declínio significativo da função pulmonar (FEV_1 de 30% do previsto em 2002 e de 19% do previsto em 2007). Após o diagnóstico observa-se discreta melhoria no ano de 2003, por provável optimização terapêutica (terapêutica farmacológica e técnicas de reabilitação pulmonar). A falta de efeito desejado no declínio acelerado do FEV_1 pode ter relação com a fase avançada da doença (FEV_1 inicial de 30%), onde os resultados descritos com a terapêutica de substituição são mais modestos.

O FEV_1 é o factor mais importante na avaliação do prognóstico dos pacientes com défice de AAT. Tanto a mortalidade como o declínio do FEV_1 são influenciados directamente pela quantidade de tabaco consumida (superiores se carga tabágica > 30 UMA).). No caso clínico em análise, nos últimos dois anos (tabela IV-4), verifica-se um aumento progressivo do número de administrações da terapêutica de substituição em ambiente hospitalar. Estas são, provavelmente, coincidentes com períodos de agudização da doença. Este facto revela bem a severidade da doença e, de como as infecções constituem um factor agravante para a aceleração do declínio da função pulmonar. Portanto, devem ser objecto de tratamento agressivo.

As opções cirúrgicas colocam-se quando o paciente não apresenta uma resposta positiva ao tratamento e/ou quando este apresenta uma lesão pulmonar ou hepática extensa. Os resultados, contudo, não são muito animadores. Quer o transplante pulmonar quer a cirurgia de redução de volume pulmonar, estão ainda longe de representar uma verdadeira opção para aumentar a sobrevida dos pacientes com défice de AAT. No presente caso clínico o doente foi proposto para transplante pulmonar e apesar de transplantado veio a falecer no pós-operatório.

Resumindo, pode-se dizer que o doente foi submetido a todas as modalidades terapêuticas modernamente preconizadas. No entanto, não foi possível alterar o prognóstico, tendo o doente vindo a falecer ainda em idade jovem.

Este caso clínico ilustra bem a importante diferença – quer na expressão clínica quer no prognóstico – entre os casos índice (pacientes diagnosticados como resultado da suspeita clínica e os casos não índice (pacientes diagnosticados com base em estudos familiares ou rastreio da população em geral). Estes últimos são geralmente assintomáticos e o seu prognóstico a longo prazo é mais favorável, particularmente se foram implementadas medidas preventivas (Seersholm et al., 1994). Assim neste caso clínico, a verdadeira alteração da história natural da doença teria passado pela sua investigação como um caso não índice no estudo familiar dos seus antecedentes, que apresentavam já a patologia (pai com DPOC, mãe com hepatocarcinoma), que poderiam ter conduzido à investigação do défice de AAT. O diagnóstico nessa altura teria possibilitado a modificação dos hábitos tabágicos e da exposição profissional.

V. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

V. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

5.1. Conclusões

As conclusões principais deste trabalho resumem-se nos seguintes pontos:

- 1) O diagnóstico de enfisema por défice de alfa-1 antitripsina deve ser sempre evocado em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crónica, nomeadamente indivíduos jovens.

- 2) Após a identificação de um caso de défice de alfa-1 antitripsina é fundamental o estudo familiar, uma vez, que os familiares directos são os que mais podem beneficiar das alterações dos estilos de vida e da intervenção sobre factores de risco (tabagismo, exposição ocupacional), atrasando a evolução da doença e, melhorando o prognóstico a longo-prazo.

- 3) Actualmente encontra-se disponível a terapêutica de substituição para o tratamento do défice de alfa-1 antitripsina que, embora dispendiosa, foi-lhe reconhecida a capacidade de desacelerar o declínio da função pulmonar em fases moderadas da doença.

5.2. Sugestões

Presentemente, existem vários tipos de registos em vários países (por exemplo, Espanha, Suécia, Alemanha, Holanda, Dinamarca, Estados Unidos) e foi constituída uma estrutura internacional destinada a coordenar as iniciativas nacionais e a facilitar a difusão da informação (Alpha One Internacional Registry, AIR). Com a criação de registos de doentes com défice de alfa-1 antitripsina (AAT) pretende-se, essencialmente, reverter a tendência para o sub-diagnóstico da doença e evitar a dispersão do tratamento, além de fazer o seguimento dos casos identificados. Em Portugal não existe qualquer registo. É preferível que os futuros registos tenham características mistas, isto é, que incluam indivíduos quer com patologia pulmonar quer com patologia hepática. Assim, dessa forma, a vantagem seria atenuar a assimetria entre a abundância dos registos dedicados apenas ao acompanhamento de doentes de Pneumologia e a escassez dos que se destinam aos casos de Gastreenterologia (Strange *et al.*, 2002).

Pretende-se, assim, com a criação de um registo em Portugal acentuar fortemente a componente preventiva, ao contrário da generalidade dos modelos adoptados, baseados apenas no recrutamento de adultos, mais resistentes à modificação de hábitos adquiridos.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

Ali-Osman F, Akande O, Antoun G, Mao JX, Buolamwini J. Molecular cloning, characterization and expression in *Escherichia coli* of full-length cDNAs of three human glutathione S-transferase Pi gene variants: evidence for differential catalytic activity of encoded proteins. *J Biol Chem* 1997; 272:10004-10012

Alpha-1 antitrypsin Deficiency Registry Study Group. 1998. Survival and FEV1 decline in individuals with severe deficiency of alpha-1 antitrypsin. *Am J Respir Crit Care*. 158: 49-59.

Alpha-1-antitrypsin deficiency: memorandum from WHO meeting. *Bull WHO* 1997; 75: 397-41.

American Thoracic Society/European Respiratory Society Statement. Standards for the diagnosis and management of individuals with alpha-1 antitrypsin deficiency. *Am J Resp Crit Care Med* 2003; 168:818-900

Arnaud P, Gallbraith RM, Faulk WP, et al. Pi phenotypes of alpha 1-antitrypsin in Southern England: identification of M subtypes and implications for genetic studies. *Clin Genet* 1979; 15: 406-10.

Arnaud P, Koistien JM, Wilson GB, et al. Alpha 1-antitrypsin (Pi) phenotypes in a Finnish population. *Scan J Clin Lab Invest* 1977; 37: 339-43.

Beckman G, Beckman L, Nordeson I. Alpha-1-antitrypsin phenotypes in Northern Sweden. *Hum Hered* 1980; 30: 129-35.

Betty K, Bieth J, Travis J. Kinetics of association of serine proteases with native and oxidized alpha-1 proteinase inhibitor and alpha-1 antichymotrypsin. *J Biol Chem* 1980; 255: 3931-34

Birrer P, McElvaney NG, et al. 1991. Alpha-1 antitrypsin deficiency and liver disease. *J Inherit Metab Dis* 14 (4):512-525.

Black LF, Kueppers F. Alpha1-antitrypsin deficiency in non-smokers. *Am Rev Respir Dis* 1978; 117:421-8

Blanco I, de Serres FJ, et al. 2004. Déficit de alfa-1-antripsina en España (variantes deficientes PiS e PiZ): prevalencia estimada y número de sujetos deficientes calculados para cada fenotipo. *Med Clin(Barc)* 123:761-5.

Blanco I, Fernandez E, Bustillo EF. Alpha-1-antitrypsin Pi phenotypes S and Z in Europe: an analysis of the published surveys. *Clin Genet* 2001; 60: 31-41.

Blanco IE, de Serres FJ, et al. 2005. Alpha-1 antitrypsin and fibromyalgia: new data in favour of the inflammatory hypothesis of fibromyalgia. *Medical Hypotheses*. 64:759-69.

Blanco IE, de Serres FJ, Fernández-Bustillo E, Daniel Alkassam D, Arbesú D, Rodríguez C, et al. 2005. Alpha-1-antitrypsin and fibromyalgia: new data in favour of the inflammatory hypothesis of fibromyalgia. *Medical Hypotheses* 64: 759-69

Bofinger A, Hawley C, Fisher P, Daunt N, Stowasser M, Gordon R. Alpha-1-antitrypsin phenotypes in patients with renal arterial fibromuscular dysplasia. *J Hum Hypertens* 2000; 14: 91-94.

Brantly M, Wittes JT, Vogelmeier CF, Hubbard RC, Fells GA, Crystal RG. Use of a highly purified alpha-1 antitrypsin standard to establish ranges for the common normal and deficiency phenotypes. *Chest* 1991; 100:703-708.

Brantly M. 1996. Alpha 1-antitrypsin genotypes and phenotypes. In: Alpha 1-antitrypsin deficiency: Biology, Pathogenesis, Clinical Manifestations, Therapy. *Lung Biology in Health and Disease*, vol 88. New York:Marcel Dekker Inc., 45-59.

Brantly M. 2002. Alpha-1 antitrypsin: not just an antiprotease. Extending the half-life of a natural anti-inflammatory molecule by conjugation with polyethylene glycol. *Am J Respir Cell Mol Biol* 27:652-4.

Brantly M. 2002. Alpha-1-antitrypsin: not just an antiprotease. Extending the half-life of a natural anti-inflammatory molecule by conjugation with polyethylene glycol. *Am J Respir Cell Mol Biol* 27:652-4

Brantly M., Nukima T, Crystal , RG. Molecular basis of alpha-1 antitrypsin deficiency. *Am J Med* 1988;84:13-31.

Brantly MI, Paul LD, Miller BH, et al. 1988. Clinical features and history of the destructive lung disease associated with alpha-1 antitrypsin deficiency of adults with pulmonary symptoms. *Am Rev Respir Dis* 138; 327-36

Brantly, M., T. Nukima, and R. G. Crystal. Molecular basis of alpha-1 antitrypsin deficiency. *Am J Med* 1988; 84 (Suppl. 6A): 13-31

Burrows JAJ, Willis LK, Permuter DH. 2000. Chemical chaperones mediate increase secretion of mutant alpha-1 antitrypsin Z: a potential pharmacological strategy for prevention of liver injury and emphysema. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:1796-801.

Campos MA, Wanner A, Zhang G, Sandhaus RA. 2005. Trends in the Diagnosis of Symptomatic Patients with Alpha-1 Antitrypsin Deficiency between 1968 and 2003. *Chest* 128(3):1179-1186

Cantin AM, Woods DE, Cloutier D, Dufour EK, Leduc R. 2002. Polyethylene glycol conjugation at Cys232 prolongs the half-life of alpha-1 proteinase inhibitor. *Am J Respir Cell Mol Biol* 27:659-665

Carrel RW .2004. What we owe to α 1-antitrypsin and to Carl-Bertil Laurell. *COPD*; 1: 71-84.

Carracedo A, Concheiro L. Distribution of the Pi, TfC, and Gc subtypes in Galicia (North West Spain). *Z Rechtsmed* 1983; 90: 153-8

Carrel RW, Lomas D. 2002. Alpha-1 antitrypsin deficiency: a model for conformational diseases. *N Engl J Med* 346(1):45-53.

Cassin PC, teschler H, Konietzko N, et al. 1998. Two-year results after lung volume reduction surgery in alpha-1 antitrypsin deficiency versus smoker's emphysema. *Eur Respir J* 12:1028-32.

Chowdhury MM, Williams EJ, Morris JS, et al. 2002. Severe panniculitis caused by homozygous ZZ alpha-1 antitrypsin deficiency treated successfully with human purified enzyme (Prolastin). *Br J Dermatol* 147:1258-61.

- Cowden DI, Fisher GE, Weeks RL. 2005. A pilot study comparing the purity, functionality and isoform composition of alpha-1 proteinase inhibitor (human) products. *Curr Med Res Opin* 21:877-883
- Cox, DW.1995. Alpha-1 antitrypsin deficiency. In: Sriver, CR, Beaudet, AL., Sly W., Valle D (eds): *The metabolic e molecular bases of inherited disease*. Mc Graw-Hill, New York 4122-4152.
- Crystal, RG. 1989. The alpha-1 antitrypsin gene and its deficiency states. *Trends Genet* 5:411-417.
- Crystal, RG. 1990. Alpha-1 antitrypsin, emphysema and liver disease. Genetic bases and strategies for therapy. *J Clin Invest* 85: 1343-1352.
- Cuvelier A, Muir JF, Hellot MF, et al. 2000. Distribution of alpha(1)-antitrypsin alleles in patients with bronchiectasis. *Chest* 117: 415-19.
- Cox DW, Markovic VD, Teshima IE. 1982. Genes for immunoglobulin heavy chains and for alpha-1 antitrypsin are localized to specific regions of chromosome 14q. *Nature*; 79: 870-3.
- Cox DW, Woo SL, Mansfield T. 1985. DNA restriction fragments associated with alpha-1 antitrypsin indicate a single origin for deficiency allele PiZ. *Nature* 316:79-81.
- Dafforn TR, Mahadeva R, Elliott PR, et al. 1999. A kinetic description of the polymerization of α 1-antitrypsin. *J Biol Chem* 274: 9548-55.
- Darlington GJ, Astrin KH, Muirhead SP, et al. 1982 Assignment of human alpha-1 antitrypsin to chromosome 14 by somatic cell hybrid analysis. *Proc Natl Acad Sci USA*; 79:870-3.
- Dawkins PA, Dowson LJ, Guest PJ, Stockley RA. 2003. Predictors of mortality in alpha-1 antitrypsin. *Thorax* 58:1020-26.
- De Meo DL, Silverman EK. 2004. Alpha-1 antitrypsin deficiency.2: genetic aspects of alpha-1 antitrypsin deficiency:phenotypes and genetic modifiers of emphysema risk. *Thorax*;59:259-264.
- De Serres FJ, Blanco I, Bustillo EF. 2003. Genetic epidemiology of alpha-1 antitrypsin deficiency: France, Italy, Portugal and Spain. *Clin Genet* 63:490-509.
- De Serres FJ, Blanco I, Fernandez-Bustillo E. 2003 Genetic epidemiology of alpha-1 antitrypsin deficiency in North America and Australia/New Zealand: Australia, Canada, New Zealand and the United states of America, *Clin Genet*; no.64, pp.382-97.
- De Serres FJ, Blanco I, Fernandez-Bustillo E. Genetic epidemiology of alpha-1-antitrypsin in southern Europe: France, Italy, Portugal and Spain. *Clin Genet* 2003; 63:490-509
- De Serres FJ. 2002, Worlwide racial and ethnic distribution of alpha-1 antitrypsin deficiency: summary of an analysis of published genetic epidemiologic surveys, *Chest*, 122:1818-29.
- DeMeo DL, Silverman EK. 2004. α 1-antitrypsin deficiency: 2.Genetic aspects of α 1-antitrypsin deficiency: phenotypes and genetic modifiers of emphysema risk. *Thorax* 59:259-264.
- Dowson LJ, Guest PJ, Stockley RA. 2001. Longitudinal changes in physiological, radiological, and health status measurements in alpha(1)-antitrypsin deficiency and factors associated with decline. *Am J Respir Crit Care Med* 164:1805-1809

- Dowson LJ, Guest PJ, Stockley RA. 2002. The relationship of chronic sputum expectoration to physiologic, radiologic, and health status characteristics in alpha(1)-antitrypsin deficiency (Pi Z). *Chest* 122:1247–55.
- DuBois, RM, Bernaudin, JF, et al. 1991. Human neutrophils express the alpha-1 antitrypsin gene and produce alpha-1 antitrypsin blood 77:2724-2730.
- Eden E, Hammel J, Rouhani FN, et al. 2003. Asthma features in severe alpha1-antitrypsin deficiency: experience of the National Heart, Lung, and Blood Institute Registry. *Chest* 123:765–71.
- Eden E, Mitchell D, Mehlman B, Khouli H, Mejat M, Grieco MH, Turino GM. 1997. Atopy, asthma and emphysema in patients with severe alpha-1-antitrypsin deficiency. *Am J Respir Crit Care Med* 156: 68-74
- Elliot, PR, Lomas DA, et al. 1996. Inhibitory conformation of the reactive loop of alpha-1 antitrypsin *Nat Struct Biol* 3:676-681.
- Elliott PR, Bilton D, lomas DA. 1988.Lung polymers in Z alpha-1 antitrypsin related emphysema. *Am J Respir Cell Mol Biol* 18:670-4.
- Elzouki AN, Eriksson S, Lofberg R, Nassberger L, Wieslander J, Lindgren S. 1999. The prevalence and clinical significance of alpha 1- antitrypsin deficiency (PiZ) and ANCA specificities (proteinase 3, BPI) in patients with ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*; 5: 246–52.
- Elzouki AN, Ryden AA, Lanne T, Sonesson B, Eriksson S. 1999. Is there a relationship between abdominal aortic aneurysms and alpha1- antitrypsin deficiency (PiZ)? *Eur J Vasc Endovasc Surg* 17: 149–54.
- Elzouki AN, Segalmark M, Mazodier P, Eriksson S. 1996. Wegener’s granulomatosis in a patient with severe PiZZ alpha 1-antitrypsin deficiency. *QJM* 89:877.
- Ericksson S. 1963. Pulmonary emphysema and alpha-1-antitrypsin deficiency. *Acta Med Scan*; 175: 197-205.
- Ericksson S. 1996. A 30-year perspective on alpha 1-antitrypsin deficiency. *Chest* 110 (suppl 6): 237S-42S.
- Eriksson S, Carlson J, Velez R. 1986. Risk of cirrhosis and primary liver cancer in alpha 1-antitrypsin deficiency. *N Engl J Med* 314: 736–39.
- Eriksson S, Carlson J, Velez R. 1986. Risk of cirrhosis and primary liver cancer in alpha-1 antitrypsin deficiency. *N Engl J Med* 314(12):736-739.
- Eriksson S. 1963. Pulmonary emphysema and alpha-1-antitrypsin deficiency. *Acta Med Scand*;175:197–205.
- Fagerhol MK, Laurell CB. 1967 The polymorphism of “prealbumins” and alpha-1 antitrypsin in human sera. *Clin Chim Acta*; 16:199-203.
- Fagerhol MK, Laurell CB. 1970. The Pi system-inherited variants of serum α 1-antitrypsin. *Prog Med Gent*; 7: 96-111.

Feldmann G, J P Martin, R Sesboue, C Ropartz, R Perelman, M Nathanson, P Seringe, and J P Benhamou. 1975. The ultrastructure of hepatocytes in alpha-1-antitrypsin deficiency with the genotype Pi--. *Gut* 16(10): 796–799.

Fishman A, Martinez F, Naunheim K, et al. 2003. A randomized trial comparing lung-volume-reduction surgery with medical therapy for severe emphysema. *N Engl J Med* 348:2059-73.

Fukada M. 2000. Cell surface carbohydrates: cell type-specific expression; in Fukada M, Hinghaul O(eds): *Molecular and Cellular Glycobiology*. New York, Oxford University Press, pp 12-61.

Gadek JE, Fells GA, Zimmerman RL, et al. 1981. Antielastases of human alveolar structures: implications for the protease-antiprotease theory of emphysema. *J Clin Invest*; 68: 889-898.

Gadek JE, Fells, Crystal RG. 1979. Cigarette smoking induces functional antiprotease deficiency in the lower respiratory tract of humans, *Science* 206:1315-6

Gadek, JE, Crystal, RG. 1985. Alpha-1 antitrypsin deficiency. In: Standbury, JB, Wyngaarden, JB, Fredrickson, DS, Goldstein, J.L., Brown, M.S. (eds) *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. Mc Graw-Hill, New York, 1450-145.

Garver RI Jr, Mornex JF, Nukima, et al. 1986. Alpha-1 antitrypsin deficiency and emphysema caused by homozygous inheritance of non-expressing alpha-1 antitrypsin genes. *N Engl J Med* 314:766.

Gelb AF, McKenna RJ, Brenner M, et al. 1999. Lung function after bilateral lower lobe lung volume reduction surgery for alpha 1-antitrypsin emphysema. *Eur Respir J* 14:928-33.

Gishen P, Saunders AJ, Tobin MJ, Hutchison DC. 1982. 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. *Clin Radiol* 33: 371-77.

Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD, Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) 2007 (disponível em <http://www.goldcopd.org>).

Gooptu B, Hazes B, Chang W-SW, et al. 2000. Inactive conformation of the serpin α 1-antichymotrypsin indicate two stage insertion of the reactive loop; implications for inhibitory function and conformational disease. *Proc Natl Acad Sci* 97: 67-72.

Gorin AB, Stewart PA. 1979. Differential permeability of endothelial and epithelial barriers to albumin flux. *J Appl Physiol* 47:1315-1324

Green C, Brown G, Dafforn TR, et al. 2003. Mutations in the Drosophila serpin necrotic mirror disease-associated mutations of human serpins. *Development* 130:1473-8.

Guest PJ, Hansell DM. High resolution computed tomography (HRCT) in emphysema associated with alpha-1-antitrypsin deficiency. *Clin Radiol* 1992;45:260–6.

Hubbard RC, Brantly ML, Sellers SE, Mitchell ME, Crystal RG. 1989. Anti-neutrophil-elastase defenses of the lower respiratory tract in alpha-1 antitrypsin deficiency directly augmented with an aerosol of alpha-1 antitrypsin. *Ann Intern Med* 111:206-212

Hubbard RC, Crystal RG. 1990. Strategies for aerosolized alpha-1 antitrypsin deficiency by the aerosol route. *Lung* 168(suppl):656-578.

- Hubbard RC, Fells G, Gadek J, *et al.* Neutrophil accumulation in the lung in alpha 1-antitrypsin deficiency: spontaneous release of leukotriene B4 by alveolar macrophages. *J Clin Invest* 1991; 88: 891-897.
- Hubbard RC, McElvaney NG, Sellers SE *et al.* 1989. 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(4):1349-1354.
- Humbert P, Faivre B, Gilbey R, *et al.* 1991. Use of anti-collagenase properties of doxycycline in treatment of alpha-1 antitrypsin deficiency panniculitis. *Acta Derm Venerol* 71:189-94.
- Hussain M, Mieli-Vergani G, Mowat AP. 1991. Alpha 1-antitrypsin deficiency and liver disease: clinical presentation, diagnosis and treatment. *J Inher Metab Dis* 14: 497–511.
- Hutchison DC, Cooper D. 2002. Alpha-1-antitrypsin deficiency: smoking, decline in lung function and implications for therapeutic trials. *Respir Med*; 96: 872-880.
- Hutchison DCS. α 1-antitrypsin deficiency in Europe: geographical distribution of Pi types S and Z. *Respir Med* 1998; 92: 367-77
- Irving, JA, Pike RN, *et al.* 2000. Phylogeny of the serpin superfamily: implications of patterns of amino acid conservation for structure and function. *Genome Res* 10:1845-186.
- Janoff A, Carp H, Lee DK, *et al.* 1979. Cigarette smoke inhalation decreases alpha-1 antitrypsin activity in rat lung. *Science* 206:1313-4
- Janoff A. Elastase in the tissue injury. 1985. *Annu Rev Med*; 36: 207-216.
- Janus ED, Philips NT, Carrell RW. 1985. Smoking, lung function, and alpha 1-antitrypsin deficiency. *Lancet* 1:152-4
- Juvelekian GS, Stoller JK. 2004. Augmentation Therapy for Alpha-1 Antitrypsin Deficiency. *Drugs* 64(16):1743-1756.
- Karnaukhova E, Ophir Y, Golding B. 2006. Recombinant human alpha-1 proteinase inhibitor: towards therapeutic use. *Amino Acids* 30:317-332.
- Kiernan V. Warm hearts in a cold land. *New Scientist* 1995;4 March:10.
- King MA, Stone JA, Diaz PT, *et al.* Alpha 1-antitrypsin deficiency: evaluation of bronchiectasis with CT. *Radiology* 1996;199:137–41.
- Knoell DL, Ralston DR, *et al.* 1998. Alpha-1 antitrypsin and protease complexation is induced by lipopolysaccharide, interleukin-1beta, and tumor necrosis factor-alpha in monocytes. *Am J Respir Crit Care Med* 157 (1):246-255
- Koebe HG, Kugler C, Dienemann H. 2002. Evidence-based medicine: lung volume reduction surgery (LVRS). *Thorac Cardiovasc Surg* 50(5):315-322.
- Kopito RR, Ron D. Conformational disease. *Nat Cell Biol* 2000; 2: E207-09.
- Kuzemko, JA. Chopin's illnesses. *J R Soc Med* 1994; 87:769-72.
- Lai EC, Kao FT, Low ML, *et al.* Assignment of alpha-1 antitrypsin gene and a sequence-related gene to human chromosome 14 by molecular hybridization. *Am J Hum Genet* 1983; 35: 385-92.

- Larsson C. 1978 Natural history and life expectance in severe alpha 1- antitrypsin deficiency, PiZ. *Acta Med Scan* 204; 345-51.
- Laurell C-B, Eriksson A. 1963. The electrophoretic alpha 1-globulin pattern of serum in alpha 1-antitrypsin deficiency. *Scan J Clin Lab Invest*; 15: 132-40.
- Lee, JH, Brantly M. 2000. Molecular mechanisms of alpha-1 antitrypsin null alleles. *Respir Med* 94 (suppl C):S7-11.
- Lieberman J, Winter, Sastre A. 1986. Alpha 1-antitrypsin Pi-types in 965 COPD patients, *Chest* 89:370-73.
- Lieberman J. Augmentation therapy reduces frequency of lung infections in antitrypsin deficiency: a new hypothesis with supporting data. *Chest* 2000; 118: 1480-1485.
- Lomas DA, Elliott PR, Sidhar SK, et al. 1995. α 1-antitrypsin M_{malton} (Phe⁵²-delected) forms loop-sheet polymers in vivo: evidence for the C sheet mechanism of polymerization. *J Biol Chem* 270: 16864-70.
- Lomas DA, Evans DL, Finch JT, et al. 1992. The mechanism of Z α 1-antitrypsin accumulation in the liver; 357: 605-7.
- Lomas DA, Finch JT, Seyama K, Nukima T, Carrell RW. Alpha 1-antitrypsin Siiyama (Ser53?Phe): further evidence for intracellular loop-sheet polymerization. *J Bio Chem* 1993; 268: 15333-35.
- Lomas LD, Mahadeva R. Alpha 1-antitrypsin polymerization and the serpinopathies: pathology and prospects for therapy. *J Clin Invest* 2002; 110: 1585-90.
- Low DE, Trulock EP, Kaiser LR, Pasque MK, Dresler C, Ettinger N, Cooper JD. 1992. Morbidity, mortality, and early results of single versus bilateral lung transplantation for emphysema. *J Thorac Cardiovasc Surg* 103(6):1119-1126.
- Luisetti M, Seersholm N. 2004, Alpha1-antitrypsin deficiency, 1: epidemiology of alpha 1-antitrypsin deficiency. *Thorax*; 59:164-69.
- Luisetti M. 2000. Introduction: the history of the Alpha One International Registry (AIR). *Respir Med* 94(suppl C):1-2.
- Luisetti M. 2002 The Italian registry for AATD. Epidemiology of rare AATD variants. Alpha 1 Foundation 4th International Scientific Conference: Epidemiological Aspects of Alpha-1-Antitrypsin Deficiency, Charlston SC 19.
- Mahadeva R, Chang W-SW, Dafforn T, et al. 1999. Heteropolymerization of S, I and Z α 1-antitrypsin and liver cirrhosis. *J Clin Invest* 103: 999-1006.
- Mahadeva R, Shapiro SD. 2002. Chronic obstructive pulmonary disease 3: experimental animal models of pulmonary emphysema. *Thorax* 57: 908-14
- Mal H, Andreassian B, Pamela F, Duchatelle JP, Rondeau E, Dubois F, Baldeyrou P, Kitzis M, Sleiman C, Pariente R (1989) Unilateral lung transplantation in end-stage pulmonary emphysema. *Am rev respir dis* 140(3):797-802.

- Malerba M, Radaeli A, Ceriani L, et al. 2003. Airway hyperresponsiveness in a large group of subjects with alpha1-antitrypsin deficiency: a cross-sectional controlled study. *J Intern Med* 253:351–8.
- Marcus NY, Perlmutter DH. 2000. Glucosidase and mannosidase inhibitors mediate increased secretion of mutant alpha 1 antitrypsin Z. *J Biol Chem* 275: 1987-92.
- Martin JP, Sesboue R, Charlionet R, et al. 1976. Genetic variants of serum alpha-1-antitrypsin (Pi types) in Portuguese. *Hum Hered*; 26: 310-4
- Martin NG, Clark P, Ofulue AF, et al. 1987. Does the PI polymorphism alone control alpha-1-antitrypsin expression? *Am J Hum Genet*; 40: 267-77.
- Massi, G. 1996. Pathogenesis and pathology of liver disease associated with alfa-1 antitrypsin deficiency. *Chest* 110:251S-255S.
- Matsunaga E, Shiokama S, Nakamura H, Maruyama T, Tsuda K, Fukumaki Y 1990. Molecular analysis of the gene of the α 1-antitrypsin deficiency variant, Mnichinan. *Am J Hum Gent* 46; 602-612.
- Mayer AS, Newman, Lee S. 2001. Genetic and environmental modulation of chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Physiol*; 128: 3-11.
- Mayer AS, Stoller JK, Bucher BB, et al. Occupational exposure risks in individuals with Pi*Z alpha-1-antitrypsin deficiency. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 553-558.
- McBean J, Sable A, Maude J, Robinson-Bostom L. Alpha 1-antitrypsin deficiency panniculitis. *Cutis* 2003; 71: 205–09.
- McCloskey SC, Patel BD, Hinchliffe SJ. 2001.Siblings of patients with severe chronic obstructive pulmonary disease have a significant risk of airway obstruction. *Am J Respir Crit Care Med* 164:1419-1424.
- McElvaney NG, Stoller JK, Buist AS, et al. 1997. Baseline characteristics of enrollees in the National Heart, Lung and Blood Institute Registry of Alpha-1 Antitrypsin Deficiency: Alpha-1 Antitrypsin Deficiency Registry Study Group. *Chest* 111(2):394-403.
- Miller JD, Berger RL, Malthaner RA, et al. 2005. Lung volume reduction surgery versus medical treatment for patients with advanced emphysema. *Chest* 127:1166-77.
- Miravittles M. 2000. Alpha-1 antitrypsin deficiency: epidemiology and prevalence. *Resp Med* 94(suppl C): S12-S15.
- Montanelli A, Mainardi E, Pini L, Corda L, Grassi V. 2002. Alpha-1-antitrypsin deficiency and nephropathy. *Nephron*; 90: 114–15.
- Morrison HM, Kramps JA, Burnett D, Stockley RA. 1987. Lung lavage fluid from patients with alpha 1-proteinase inhibitor deficiency or chronic obstructive bronchitis: anti-elastase function and cell profile. *Clin Sci (Lond)*; 72: 373-381.
- Muir AL, Cruz M, Martin BA; Thommasen H, Belzberg A, Hogg JC. 1984. Leukocyte kinetics in the human lung: role of the exercise and catecholamines. *J Appl Physiol* 57 (3): 711-719.
- Mulgrew, Alan T., Taggart, Clifford C., McElvaney, N. Gerry. 2007. Alpha-1 antitrypsin deficiency: current concepts. *Lung*; 185: 191-201.

Naunhein KS, Wood DE, Mohesenifar Z, Sternberg AL, Criner GJ, DeCamp MM, Deschamps CC, Martínez FJ, Sciruba FC, Tonascia J, Fishman AP. 2006. Long-term follow-up of patients receiving lung volume reduction surgery versus medical therapy for severe emphysema by National emphysema Trial Research Group. *Ann Thorac Surg* 82:431-43.

Needham M, Stockley RA. 2004. α 1-antitrypsin deficiency: 3. Clinical manifestations and natural history. *Thorax* 59:441-445.

Novoradovsky A, Brantly ML, Waclawiw MA, Chaudhary PP, Ihara H, Qi L, Eissa NT, Barnes PM, Gabriele KM, Ehrmantraut ME, Rogliani P, Moss J. Endothelial nitric oxide synthase as a potential susceptibility gene in the pathogenesis of emphysema in alpha-1 antitrypsin deficiency. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; 20: 441-447.

Nukima T, Ogushi F., et al. 1996a. Alpha-1 antitrypsin gene evolution. In: Crystal, RG (ed). *Alpha-1 antitrypsin deficiency. Biology, pathogenesis, clinical manifestations, therapy*. Marcel Dekker Inc, New York, 33-43.

Nukima T, Takahashi H, Brantly M, Courtney M, Crystal RG. 1987 α 1-antitrypsin null_{granite falls}, a nonexpressing α 1-antitrypsin gene associated with a frameshift to stop mutation in a coding exon. *J Biol Chem* 262; 11999-12004.

O'Brien ML, Buist NR, Murphey WH. 1978. Neonatal screening for alpha 1-antitrypsin deficiency. *J Pediatr* 92:1006-10.

O'Brien C, Guest PJ, Hill SL, et al. 2000. Physiological and radiological characterization of patients diagnosed with chronic obstructive pulmonary disease in primary care. *Thorax* 55:635-42.

Ogushi F, fells GA, Hubbard RC, et al 1987. Z-type alpha 1-antitrypsin is less competent than M1-type alpha-1-antitrypsin as an inhibitor of neutrophil elastase. *J Clin Invest*; 80: 1366-74.

Owen MC, Brennan SO, Lewis JH, Carrel RW 1983. Mutation of antitrypsin to antithrombin: alpha 1. antitrypsin Pittsburg (358 Met leads to Arg), a fatal bleeding disorder. *N Engl J Med*; 309: 694-98.

Parr DG, Stoel BC, Stolk J, et al. 2004. Pattern of emphysema distribution in alpha-1 antitrypsin deficiency influences lung function impairment. *Am J Respir Crit Care* 170: 1172-8.

Parr DG, Stoel BC, Stolk J, Stockley RA. 2004. Pattern of emphysema distribution in alpha 1-antitrypsin deficiency influences lung function impairment. *Am J Respir Crit Care Med* 170: 1172-78.~

Pemberton PA, Kobayashi D, Wilk BJ, Henstrand JM, Shapiro SD, Barr PJ. 2006. Inhaled recombinant alpha-1 antitrypsin ameliorates cigarette smoke-induced emphysema in the mouse. *COPD* 3:101-108.

Perlmutter DH. 1991. The cellular basis for liver injury in alpha 1-antitrypsin deficiency. *Hepatology* 13(1):172-85.

Perlmutter DH. 2002. Liver injury in a 1-antitrypsin deficiency: An aggregated protein induces mitochondrial injury. *J Clin Invest* 110:1579-1583.

Permuter, DH, Cole F.S. et al. 1985. Expression of the alpha-1 proteinase inhibitor gene in human monocytes and macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:795-799.

- Piitulainen E, Eriksson S. 1999. Decline in FEV1 related to smoking status in individuals with severe alpha1-antitrypsin deficiency (PiZZ). *Eur Respir J* 13:247-51.
- Piitulainen E, Sveger T. 1998. Effect of environmental and clinical factors on lung function and respiratory symptoms in adolescents with alpha1-antitrypsin deficiency. *Acta Paediatr* 87:1120-4.
- Piitulainen E, Sveger T. 2002. Respiratory symptoms and lung function in young adults with severe alpha(1)-antitrypsin deficiency (PiZZ). *Thorax* 57:705-8.
- Piitulainen E, Tornling G, Eriksson S. 1997. Effect of age and occupational exposure to airway irritants on lung function in non-smoking individuals with α 1-antitrypsin deficiency (PiZZ). *Thorax* 52:244-248.
- Piitulainen E, Tornling G, Eriksson S. 1998. Environmental correlates of impaired lung function in non-smokers with severe alpha-1-antitrypsin deficiency (PIZZ). *Thorax* 53:393-43.
- Pons RF, Casafont F, Rodriguez dL, San Miguel G, Artinano E, Cagigas J. 1986. Could alpha 1 antitrypsin deficiency have any role in the development of celiac sprue after gastric operations? *J Clin Gastroenterol* 8: 559-61.
- Povey S. 1990. Genetics of α 1-antitrypsin deficiency in relation to neonatal liver disease. *Mol Biol Med* 7:161-2.
- Protempa J, Korzus E, Travis J. 1994. The serpin superfamily of proteinase inhibitors: structure, function and regulation. *J Biol Chem*; 269(23): 15957-15960.
- Qu D, Teckman JH, Omura S, Perlmutter DH. 1996. Degradation of a mutant secretory protein, alpha1-antitrypsin Z, in endoplasmic reticulum requires proteasome activity. *J Bio Chem* 271: 22791-95.
- Rabassa AA, Schwartz MR, Ertan A. 1995. Alpha 1-antitrypsin deficiency and chronic pancreatitis. *Dig Dis Sc* 40: 1997-2001.
- Riva A, Kohane IS. 2002. SNPper: retrieval and analysis of human SNPs. *Bioinformatics* 18: 1681-5.
- Rodriguez F, de la Roza C, Jardi R, Schaper M, Vidal R, Miravittles M. 2005. Glutathione S-transferase P1 and lung function in patients with alpha-1 antitrypsin deficiency and COPD. *Chest* 127: 1537-1543.
- Crystal RG. 1998. Alpha-1 antitrypsin deficiency, emphysema and liver disease: genetic basis and strategies for therapy. *J Clin Invest*; 85:1343-1352.
- Salzet, M., Vieau, D., Stefano, GB. 1999. Serpins: an evolutionarily conserved survival strategy. *Immunol Today* 20:541-544
- Sandford AJ, Chagani T, Weir TD, Connett JE, Anthonisen NR, Pare PD. 2001. Susceptibility genes for rapid decline of lung function in the lung health study. *Am J Respir Crit Care Med* 163: 469-473.
- Sandhaus RA. 1997. Elastase may play a central role in the neutrophil migration through connective tissue. In: Taylor JC, Mittman C, editors. *Pulmonary emphysema and proteolysis*. Orland, FL: Academic Press 227-233.

Schroeder WT, Miller MF, Woo SL, Saunders GF. 1985. Chromosomal localization of the human α 1-antitrypsin gene (PI) to 14q31-32. *Am J Hum Genet.* 37; 868-872.

Seen O, Russi EW, Imboden M, Probst-Hensch NM. 2005. α 1-antitrypsin deficiency and lung disease: risk modification by occupational and environment inhalants. *Eur Respir J*; 26(5): 909-917.

Seersholm N, Kok-Jensen A, Dirksen A. 1994. Survival of patients with severe alpha 1-antitrypsin deficiency with special reference to non-index cases. *Thorax* 49: 695-698.

Seersholm N, Kok-Jensen A, Dirksen A. Decline in FEV1 among patients with severe hereditary alpha 1-antitrypsin deficiency type PiZ. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 1922-5.

Seersholm N, Kok-Jensen A. 1995. Survival in relation to lung function and smoking cessation in patients with severe hereditary alpha-1-antitrypsin deficiency. *Am J Respir Crit Care Med*; 151: 369-373.

Seersholm N, Kok-Jensen A. 1998. Clinical features and prognosis of lifetime non-smokers with severe alpha-1 antitrypsin deficiency. *Thorax* 53: 265-268.

Seixas S, Garcia O, Trovoada MJ, et al. 2001. Patterns of haplotype diversity within the serpin gene cluster at 14q32.1: insights into the natural history of the alpha-1 antitrypsin polymorphism. *Hum Genet* 108:20-30.

Sem autor. 1965. Definition and classification of chronic bronchitis for clinical and epidemiological purposes. A report to the Medical Research Council by their Committee on the etiology of Chronic Bronchitis. *Lancet* 1:775-9.

Sem autor. Rationale and design of the National Emphysema Treatment Trial (NETT) 1999. A prospective randomized trial of lung volume reduction surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg* 118:518-28.

Sergi C, Consalez GG, Faretti G, et al. 1994. Immunohistochemical and genetic characterization of M_{cagliari} alpha 1 antitrypsin molecule. *Lab Invest* 70:130-3.

Serra, Sónia, Banha, Graça. 2008. Défice de alfa-1 antitripsina. A propósito de dois casos clínicos. *Rev Port Pneum* n°2, vol XIV 295-302.

Sesboue R, Charlionet R, Vercaigne D, et al. Genetic variants of serum alpha 1- antitrypsin (Pi types) in Bretons. *Hum Hered* 1978; 28: 280-4.

Seyama K, Nukima T, Takabe K, Takahashi H, Miyake K, Kira S. 1991. Siiyama (serine 53 (TCC) to phenylalanine 53 (TTC)): a new α 1-antitrypsin-deficiency variant with mutation on a predicted conserved residue of the serpin backbone. *J Biol Chem* 226; 12627-12632.

Shaker SB, Stavngaard T, Stolk J, Stoel B, Dirksen A. 2004. Alpha-1 antitrypsin deficiency: 7. Computed tomographic imaging in alpha-1 antitrypsin deficiency. *Thorax* 59:968:991.

Shapiro SD. Proteinases in chronic obstructive pulmonary disease. *Biochem Soc Trans* 2002; 30: 98-102.


Sharp HL. 1982. Alpha-1-antitrypsin: an ignored protein in understanding liver disease. *Semin Liver Dis* 2:314-28.

- Shin MS, Ho KJ. 1993. Bronchiectasis in patients with alpha 1-antitrypsin deficiency. A rare occurrence? *Chest* 104:1384–6.
- Sifers RN, Brashears-Macatee S, Kidd VJ, Muensch H, Woo SL. 1988. A frameshift mutation results in a truncated α 1-antitrypsin that is retained within the rough endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 263: 7330-7335.
- Sifers RN. 2003. Cell biology: protein degradation unlocked. *Science* 299: 1330-3.
- Silverman EK, Miletich JP, Pierce JA, et al. Alpha 1-antitrypsin deficiency: high prevalence in the St Louis area determined by direct population screening. *Am Rev Respir Dis* 1989; 140: 961-66.
- Silverman EK, Miletich JP, Pierce JA, et al. Alpha₁-antitrypsin deficiency. 1989. High prevalence in the St Louis area determined by direct population screening. *Am Rev Respir Dis* 140:961-6.
- Silverman EK, Pierce JA, Province MA, et al. 1989. Variability of pulmonary function in alpha-1-antitrypsin deficiency: clinical correlates. *Ann Intern Med* 111:982–91.
- Silverman EK, Province MA, Campbell EJ, et al. 1992. Family study of alpha-1-antitrypsin deficiency: effects of cigarette smoking, measured genotype, and their interaction on pulmonary function and biochemical traits. *Genet Epidemiol* 9:317-31.
- Silverman EK, Province MA, Rao DC, Pierce JA, Campbell EJ. 1990. A family study of variability of pulmonary function in α 1-antitrypsin deficiency: quantitative phenotypes. *Am Rev Respir Dis*; 142: 1015-1021.
- Silverman, G.A., P.I. Bird, et al. 2001. The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins: evolution, novel functions, mechanism of inhibition and a revised nomenclature. *J Bio Chem* 276: 33293-33296.
- Snider GL, Stone PJ, Lucey EC, et al. 1985. A polypeptide derived from the medicinal leech, prevents human neutrophil elastase-induced emphysema and bronchial secretory cell metaplasia in the hamster. *Am Rev Respir Dis* 132: 1155-1161.
- Spence WC, Morris JE, Pass K, Murphy PD. 1993. Molecular confirmation of alpha 1-antitrypsin genotypes in newborn dried blood specimens. *Biochem Med Metab Biol* 50:233-40.
- Stecenko AA, Brigham KL. Gene therapy progress and prospects: alpha 1- antitrypsin. *Gene Ther* 2003; 10: 95-99.
- Stoller JK, Gildea TR, et al. 2007. Lung volume reduction surgery in patients with emphysema and alpha-1 antitrypsin deficiency. *Ann Thorac Surg* 83: 241-51.
- Stoller JK, Smith P, Yang P, et al. 1994. Physical and social impact of alpha 1- antitrypsin deficiency: results of a survey. *Cleve Clin J Med* 61:461–467.
- Stoller, James K, Aboussouan, Loutfi S. 2005, Alpha-1 antitrypsin deficiency. *Lancet*, vol 365; 2225-36.
- Sun Z, Yang P. 2004. Role of imbalance between neutrophil elastase and 1-antitrypsin in cancer development and progression. *Lancet Oncol* 5: 182–90.
- Sveger T. 1976. Liver disease in alpha 1-antitrypsin deficiency detected by screening of 200,000 infants. *N Engl J Med* 294: 1316-21.

- Sveger T. 1988. The natural history of liver disease in alpha-1 antitrypsin deficient children. *Acta Paediatrica Scand* 77(6):847-851.
- Takahashi H, Crystal RG 1990. α 1-antitrypsin null isola di procida: na α 1-antitrypsin deficiency allele caused by deletion of all α 1-antitrypsin coding exons. *Am J Hum Genet* 47; 403-413.
- Teckman JH, An J-K et al. 2004. Mitochondrial autophagy and injury in the liver in alpha-1-antitrypsin deficiency. *Am J Physiol* 286:G851-G862
- Teckman JH, Perlmutter DH. 1996. The endoplasmic reticulum degradation of mutant α 1-antitrypsin (α 1-AT) Z: a potential pharmacological strategy for prevention of liver injury and emphysema. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 1796-801.
- Tobin MJ, Cook PJ, Hutchison DC. 1983. Alpha-1 antitrypsin deficiency: the clinical and physiological features of pulmonary emphysema in subjects homozygous for Pi type Z- a survey by the British Thoracic Association. *Br J Dis Chest* 77:14-27.
- Tomashefski JF Jr, Crystal RG, et al. 2004. The bronchopulmonary pathology of alpha-1 antitrypsin (AAT) deficiency: findings of the death review committee of the national registry for individuals with severe deficiency of alpha-1 antitrypsin. *Hum Pathol* 35: 1452-61.
- Turino GM, Barker AF, Brantly ML, et al. 1996. Clinical features of individuals with Pi*SZ phenotype of alpha 1-antitrypsin deficiency. *Am J Respir Crit Care Med* 154: 1718-25.
- Tutic M, Bloch KE, Lardinois D, et al. 2004. Long-term results after lung volume reduction surgery in patients with alpha-1 antitrypsin deficiency. *J Thorac Cardiovasc Surg* 128: 408-13.
- US Census Bureau. 2002. 2000 census of population and housing: summary population and housing characteristics, PHC-1-1. Washington, DC. US Census Bureau.
- Vidal, R, Blanco I, Casa Francisco, et al. 2006. Guidelines for the diagnosis and management of alpha-1 antitrypsin deficiency. Recommendations of the Spanish Society of pulmonology and Thoracic Surgery. *Arch Bronconeumol* 42 (12):645-59.
- Wilson JS, Galvin JR. 2000. Normal diffusing capacity in patients with PiZ alpha-1-antitrypsin deficiency, severe airflow obstruction, and significant radiographic emphysema. *118:867-7.*
- Wood AM, Stockley RA. 2006.. The genetics of chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res* 2006; 7:130.
- Wood AM, Stockley RA. 2007. Alpha one antitrypsin deficiency: from gene to treatment. *Respiration* 74; 481-492.
- Wu Y, Swulius MT, Moremen RW, Sifers RN. 2003. Elucidation of the molecular logic by which misfolded alpha 1-antitrypsin is preferentially selected for degradation. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 8229-34.
- Wu Y, Whitman I, Molmenti E, et al. 1994. A lag in intracellular degradation of mutant alpha₁-antitrypsin correlates with the liver disease phenotype in homozygous PiZZ alpha₁-antitrypsin deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 9014-9018.
- Yu MH, Lee KN, Kim J. 1995. The type Z variant of alpha-1 antitrypsin causes a protein folding defect. *Nat Struct Biol* 2:363-7.
- Zorzetto M, Tamburnotti C, et al. 2002. A fast amplification-reverse hybridization assay kit to detect the most frequent deficient variants in the alpha-1-antitrypsin gene. *Respiration* 69: 81-85.

ANEXO

AUTORIZAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA

De: "secadm" <secadm@hsmguarda.min-saude.pt> 
Para: <a15109@fcsaude.ubi.pt>
Data: 04/07/2008 15:25
Assunto: Pedido de autorização.

Exma. Sra.
Vanessa Pires


Em resposta ao solicitado, vimos informar que se encontra autorizada a consultar o processo clínico nº [REDACTED] referente ao [REDACTED], com vista à elaboração da sua Tese de Mestrado subordinada ao tema "Défice de Alfa-1 Antitripsina".

Com os melhores cumprimentos.

O Director Clínico
Dr. Luís Manuel Ferreira

Hospital de Sousa Martins
Av. Rainha D. Amélia
6301-857 Guarda
271 200 200
Fax 271 200 305
secadm@hsmguarda.min-saude.pt

AUTORIZAÇÃO DO PRESIDENTE DO CONSELHO DE ADMINISTRAÇÃO

De: "secadm" <secadm@hsmguarda.min-saude.pt> 
Para: <a15109@fcsaude.ubi.pt>
Data: 02/15/2008 15:40
Assunto: Autorização.

Exma. Sra.
Vanessa Pires

Em resposta ao solicitado, vimos informar que se encontra autorizada a consultar o processo clínico nº [REDACTED] referente ac [REDACTED], com vista à elaboração da tese de mestrado subordinada ao tema "Entisema Pulmonar Hereditário".

Com os melhores cumprimentos.

Hospital de Sousa Martins
Av. Rainha D. Amélia
6301-857 Guarda
271 200 200
Fax: 271 200 305
secadm@hsmguarda.min-saude.pt