

**ROSITA MARCIA JUGEND**

**ALFA-1 - ANTITRIPSINA - UMA VISÃO GERAL DOS  
ASPECTOS FISIOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E GENÉTICOS**

**- 1980 -**

ROSITA MARCIA JUGEND

ALFA-1-ANTITRIPSINA — UMA VISÃO GERAL DOS ASPECTOS FISIOLÓGICOS,  
BIOQUÍMICOS E GENÉTICOS

Tese apresentada à Coordenação do  
Curso de Pós-Graduação em Genética  
Humana da Universidade Federal  
do Paraná, para obtenção do título  
de Mestre em Ciências na área  
de Genética Humana.

Orientador: Profa. Dra. Eleidi A. Chautard-Freire-Maia

CURITIBA

- 1980 -

A meus pais

Ao Marcelo e Dêbora

## PREFÁCIO

Este trabalho teve como objetivo principal apresentar uma visão geral do sistema da alfa-1-antitripsina, quanto aos seus aspectos fisiológicos, bioquímicos e genéticos, com a finalidade de contribuir com um material de referência, visando a fornecer uma informação mais compacta, que possa ser empregada no desenvolvimento de pesquisas nessa área. No Brasil, BEIGUELMAN (1979) foi um dos pioneiros em abordar o problema da deficiência da alfa-1-antitripsina, que apenas tem recebido, em nosso meio, breves citações em alguns manuais de pediatria. Esperamos que essa monografia possa contribuir nesse sentido, uma vez que o estudo desse sistema é de grande importância, tanto do ponto de vista de genética médica, como no que se refere a aspectos de genética de populações.

Desejamos, nessa oportunidade, agradecer às pessoas e instituições, que contribuíram de maneira especial, na realização desse trabalho:

Profa. Dra. Eleidi Alice Chautard-Freire-Maia, pela sugestão do tema, assim como pela orientação e estímulo no decorrer de todo o curso de pós-graduação.

Profs. Lodércio Culpi, Mário Portugal Pederneiras e Sérgio Luiz Primo Parmo, pela amizade, cooperação e sugestões feitas durante a realização desse trabalho.

Bibliotecárias Maria Helena Barbieri Imayuki e Vera Lúcia Garcia Penna, pelo inestimável auxílio na obtenção da bibliografia.

Professores, colegas e amigos do Departamento de Genética e do Curso de Pós-Graduação em Genética Humana, pela cooperação e sugestões, durante todo o curso.

Srta. Irene Sedoski, pelo serviço de datilografia.

Sr. Carlos Alberto Padilha, pela confecção das figuras.

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida durante o período de março de 1976 a março de 1979.

Ao Marcelo, a quem tanto privei durante a realização desse trabalho, pela compreensão, apoio e incentivo.

Rosita Marcia Jugend

Curitiba, setembro de 1980.

## SUMÁRIO

	Página
Prefácio. . . . .	iii
Lista de ilustrações. . . . .	vii
Lista de tabelas. . . . .	viii
I. INTRODUÇÃO. . . . .	1
II. CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DA ALFA- -1-ANTITRIPSINA. . . . .	5
1. Distribuição no organismo. . . . .	5
2. Fisiologia. . . . .	6
3. Características bioquímicas. . . . .	9
III. MÉTODOS QUALITATIVOS E QUANTITATIVOS DE DETERMINA- ÇÃO DA ALFA-1-ANTITRIPSINA. . . . .	15
1. Eletroforese. . . . .	15
1.1. Eletroforese em gel de amido ácido. . . . .	15
1.2. Eletroforese cruzada antígeno-anticorpo . . . . .	17
1.3. Isoeletrofocalização. . . . .	19
1.4. Eletroforese com imunofixação. . . . .	19
1.5. Eletroforese em gel de agarose e poliacrilamida. . . . .	20
2. Inibição da tripsina. . . . .	21
3. Imunodifusão radial. . . . .	24
IV. FATORES QUE ALTERAM OS RESULTADOS DA TIPAGEM DA AL- FA-1-ANTITRIPSINA. . . . .	26
1. Envelhecimento das amostras. . . . .	26
2. Excesso de heparina. . . . .	27
3. Contaminação das amostras. . . . .	27
4. Gravidez. . . . .	27

	Página
5. Infecções, inflamações e lesões tissulares. . . . .	28
6. Período fetal. . . . .	28
7. Sarcoidose pulmonar ativa e administração de estró- geno. . . . .	28
8. Haptoglobina tipo 1-1. . . . .	28
V - VARIANTES DA ALFA-1-ANTITRIPSINA E SUA DISTRIBUIÇÃO POPULACIONAL. . . . .	30
VI - ALFA-1-ANTITRIPSINA E ASSOCIAÇÃO COM DOENÇAS. . . .	47
1. Doenças pulmonares obstrutivas crônicas. . . . .	47
1.1. Patogênese. . . . .	47
1.2. Associação entre a deficiência de A-1-AT e DPOC. .	49
2. Hepatite neonatal e cirrose hepática. . . . .	54
3. Outras doenças. . . . .	59
VII - DISTÚRBIOS NA SEGREGAÇÃO E NA FERTILIZAÇÃO. . . . .	62
1. Alfa-1-antitripsina e aberrações cromossômicas. . . .	62
2. Transmissão preferencial do variante <u>Z</u> . . . . .	65
VIII - RESUMO E CONCLUSÕES. . . . .	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS. . . . .	71

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura	Página
1 Diagrama dos principais padrões observados após eletroforese em gel de amido ácido. Apenas as três principais bandas, condicionadas pelos alelos individuais, foram consideradas, visando à simplificação (extraído de COOK, 1975). . . . .	4

## LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
1 Estimativas da composição da A-1-AT, em número de resíduos de amino-ácidos. . . . .	10
2 Principais alelos do sistema <u>PI</u> com respectivos descobridores. . . . .	31
3 Esquema dos subtipos do alelo <u>M</u> , de acordo com diferentes autores. Na primeira subdivisão são referidos os três subtipos detectados inicialmente e, na segunda, os seis subtipos atuais. Cada grupo representa um fenótipo com as diferentes denominações recebidas. . . . .	33
4 Frequências dos fenótipos do loco <u>PI</u> em diversas amostras européias (em %). . . . .	35
5 Frequências dos fenótipos do loco <u>PI</u> em três amostras americanas (em %). . . . .	36
6 Frequências dos fenótipos do loco <u>PI</u> em três amostras africanas (em %). . . . .	37
7 Frequências dos fenótipos do loco <u>PI</u> em diversas amostras asiáticas (em %). . . . .	38

Tabela	Página
8	Freqüências dos alelos do loco <u>PI</u> em várias amostras europeias (em %). . . . . 39
9	Freqüências dos alelos do loco <u>PI</u> em três amostras americanas (em %). . . . . 40
10	Freqüências dos alelos do loco <u>PI</u> em três amostras africanas (em %). . . . . 41
11	Freqüências dos alelos do loco <u>PI</u> em várias amostras asiáticas (em %). . . . . 42
12	Freqüências dos fenótipos do sistema <u>PI</u> , em algumas amostras, em que foram considerados os subtipos de <u>M</u> (em %). . . . . 44
13	Freqüências dos alelos do sistema <u>PI</u> , em algumas amostras em que foram considerados os subtipos de <u>M</u> (em %). . . . . 45

## I - INTRODUÇÃO

LAURELL & ERIKSSON (1963) foram os primeiros a observar diferenças quantitativas na alfa-1-antitripsina (A-1-AT) do soro. Esses autores descreveram 5 pacientes que apresentavam, aproximadamente, 10% da concentração normal de A-1-AT. Logo a seguir, ERIKSSON (1964) e KUEPPERS e cols. (1964) demonstraram que a deficiência de A-1-AT seguia um padrão de herança mendeliana simples. Os achados de FAGERHOL & BRAEND (1965) permitiram concluir que se tratavam de 3 alelos com relação de codominância. Os estudos realizados, até o presente, indicam que o sistema da alfa-1-antitripsina possui cerca de 20 alelos codominantes, pertencentes a um loco localizado em cromossomo autossômico (COOK, 1975).

FAGERHOL & BRAEND (1965) foram os primeiros a descrever variantes genéticas dessa proteína, usando eletroforese em gel de amido, e introduziram o uso de letras para simbolizar os alelos desse sistema. A princípio, o sistema foi chamado de Pr (pré-albumínico). No sentido de indicar os alelos, as letras foram escolhidas de maneira que a sua posição no alfabeto indicasse a mobilidade relativa do produto. O alelo mais comum foi denominado de M, sendo que aqueles determinantes de pro-

teínas com maior mobilidade seriam referidos por letras anteriores a esta e os responsáveis por produtos mais lentos, por letras subseqüentes. Algumas letras não foram usadas, ficando reservadas para o caso da descoberta de novos alelos, determinantes de proteínas com mobilidades intermediárias. FAGERHOL & LAURELL (1967), trabalhando com eletroforese em gel de amido ácido, seguida de eletroforese cruzada antígeno-anticorpo, verificaram que as proteínas do sistema Pr correspondiam à A-1-AT. Em vista disso, propuseram que o símbolo Pr fosse substituído pelo símbolo Pi (inibidor de proteases), uma vez que essa proteína é o maior inibidor de proteases do soro humano. A tripsina, na realidade, é apenas uma das proteases que podem ser inibidas pela A-1-AT. De acordo com o "Sistema Internacional de Nomenclatura dos Genes Humanos", apresentado na 5ª Conferência de Mapeamento do Genoma Humano (HGM5) por SHOWS e cols. (1979), esse sistema passou a ser denominado de PI. Para indicar os alelos, o símbolo PI é seguido de um asterisco e do símbolo do alelo. Por exemplo, PI\*M, PI\*S, PI\*Z. Uma alternativa, é referir apenas \*M, \*S, \*Z, quando a palavra alelo não está implícita no texto. Alelos silenciosos são referidos por Q0 (quantidade não detectada).

FAGERHOL & LAURELL (1970) mostraram que PI\*M, assim como uma série de outros alelos, produzem 8 bandas, quando o soro é examinado em eletroforese. A designação das bandas é feita com a letra que indica o alelo, seguida de numeração indicativa da posição de migração, a partir do ânodo. Assim, por exemplo, temos com relação à proteína M, as bandas M1, M2 até M8.

Na Fig. 1, temos uma representação dos fenótipos observados após eletroforese em gel de amido ácido, onde alguns variantes são encontrados em combinação com o alelo mais frequente (M). Para simplificação, somente as principais bandas (3, 4 e 6) de cada proteína, são apresentadas.

A maioria dos alelos do sistema PI produz quantidades normais de A-1-AT. No entanto, alguns variantes são responsáveis por baixas concentrações dessa proteína. Segundo COOK (1974), o alelo Z condiciona uma proteína com cerca de 10% da concentração normal. Os alelos S, W e P produzem A-1-AT com cerca de 60% da concentração normal, sendo que o alelo Q0, em homozigose, é responsável pela ausência completa dessa proteína. De acordo com CHAPUIS-CELLIER & ARNAUD (1979), o alelo I é responsável pelo decréscimo de cerca de 20% da concentração da A-1-AT.

Segundo GEDDE-DAHL e cols. (1972, 1975), os locos dos sistemas PI e GM estão ligados. Com relação à atribuição cromossômica desses locos, os trabalhos têm mostrado resultados discordantes, não se conhecendo, até a última conferência de mapeamento (HGM5, 1979), o cromossomo de localização desses genes.

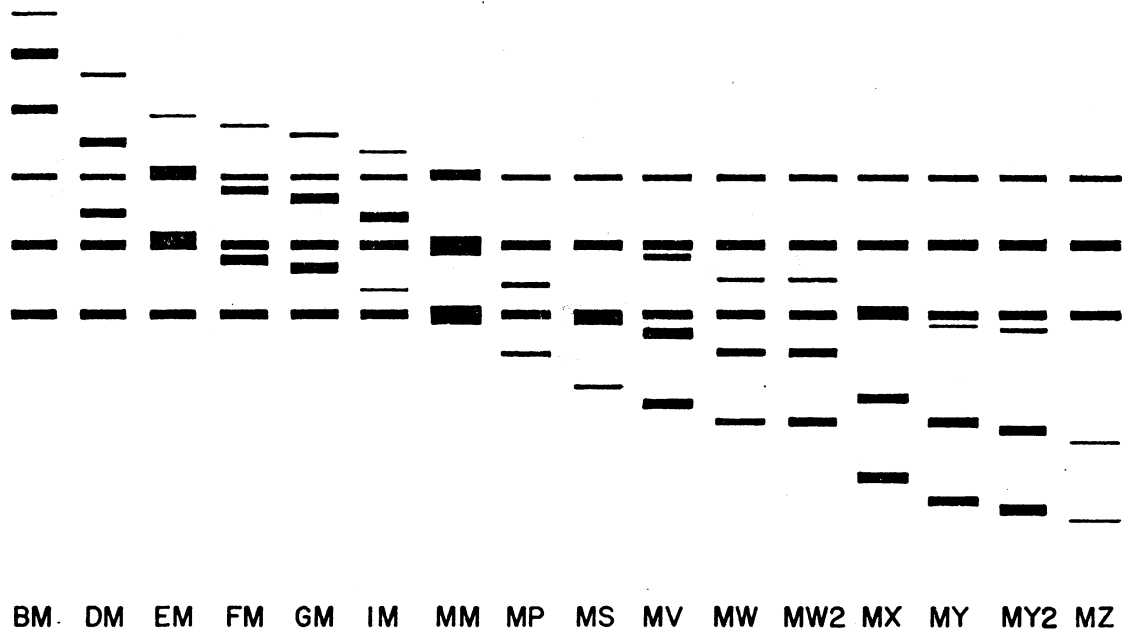


Figura 1. Diagrama dos principais padrões observados após eletroforese em gel de amido ácido. Apenas as três principais bandas, condicionadas pelos alelos individuais, foram consideradas, visando à simplificação (extraído de COOK, 1975).

## II - CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DA ALFA-1-ANTITRIPSINA

Em 1897, CAMUS & GLEY observaram, pela primeira vez, que o soro humano inibia a tripsina e, em 1903, ASCOLI & BEZZOLA, seguidos por BRIEGER & TREBING, em 1908, foram os primeiros a relatar um aumento nesta capacidade de inibição, em algumas doenças (segundo BUNDY & MEHL, 1958). Desde então, a inibição da tripsina, pelo soro e plasma de indivíduos normais e doentes, tem sido objeto de várias pesquisas.

### 1. Distribuição no organismo

JACOBSSON (1955) demonstrou que a substância responsável por cerca de 90% da capacidade do soro humano em inibir a tripsina, estava localizada na fração de  $\alpha_1$ -globulina. SCHULTZE e cols.(1962) identificaram, como o principal inibidor da tripsina, a  $\alpha_1$ -3,5 S-glicoproteína, que foi por eles denominada de alfa-1-antitripsina.

A distribuição da A-1-AT, no organismo humano, é bastante ampla. Sabe-se que o inibidor da tripsina se encontra presente em vários humores do corpo: saliva, soro, lágrima, secreção traqueobrônquica, líquido amniótico, líquido cefalorraquidiano. Além disso, estudos bioquímicos, que utilizaram a pro-

priedade dos fluídos biológicos em inibir a hidrólise de substratos de ésteres sintéticos pela tripsina, mostraram que a A-1-AT estava presente na urina (FAARVANG & LAURITSEN, 1963a), no colostro e no leite materno (HYÁNEK e cols. 1965). Com estudos imunoeletroforéticos, SCHUMACHER e cols. (1965; segundo SCHUMACHER & ZANEVELD, 1974) detectaram a presença da A-1-AT no muco cervical, e, finalmente, FEINSTEIN e cols. (1974), com a utilização de métodos eletroforéticos e imunológicos, evidenciaram a presença da A-1-AT no líquido sinovial.

## 2. Fisiologia

Embora a real função da alfa-1-antitripsina não esteja ainda bem conhecida, sabe-se que é a maior inibidora da tripsina no soro humano, respondendo por 90% da inibição dessa enzima. Os outros inibidores presentes no soro e responsáveis pelos 10% restantes da inibição da tripsina são: a alfa-2-macroglobulina, a alfa-1-antiquimotripsina e o inibidor da inter-alfa-tripsina. Além de inibir a tripsina, a A-1-AT inibe também a quimotripsina e a elastase (HEIMBURGER & HAUPT, 1966; segundo KUEPPERS, 1971). Desempenha função na coagulação sanguínea, inibindo a plasmina e a trombina (RIMON e cols., 1966), age sobre algumas proteinases dos granulócitos (KUEPPERS & BEARN, 1966a) e sobre uma protease de Aspergillus oryzae (LINDVALL e cols., 1969).

Essa ampla especificidade sugere um desempenho fisiológico múltiplo. Um ponto ainda não bem compreendido é o seu pa-

pel na regulação homeostática das proteinases, cuja atividade, quando não controlada, pode provocar malefícios à saúde. Sobre esse aspecto, ERIKSSON (1964) foi o primeiro a verificar associação entre deficiência hereditária de A-1-AT e desenvolvimento de enfisema pulmonar. Nessa linha de pesquisa, foram realizados vários trabalhos com a finalidade de demonstrar que o excesso de proteases no fluído extracelular do pulmão, devido à deficiência de inibidor, leva à destruição de tecido, nos sítios inflamatórios. Numa dessas pesquisas, foram provocadas lesões enfisematosas nos pulmões de hamsters, através da administração intratraqueal de aerosol de papaína (GOLDRING e cols., 1968). Em cães, provocou-se o mesmo resultado, administrando-se elastase leucocitária canina (MARCO e cols., 1971). Com esses trabalhos mostrou-se que a deficiência de inibidores de proteases e o conseqüente excesso de proteases pode levar à destruição de tecido pulmonar.

A A-1-AT também parece desempenhar função no processo de fertilização. SCHUMACHER & PEARL (1968) relataram mudanças acentuadas no nível de A-1-AT no muco cervical, durante o ciclo ovulatório. Esses autores observaram que o nível da A-1-AT é extremamente baixo na ovulação, quando as secreções cervicais são favoráveis à penetração do esperma. Valores de concentração, significativamente mais altos, são encontrados durante os períodos inférteis do ciclo. Observações em mulheres, que tomam anticoncepcionais com hormônios sequenciais, demonstraram que o nível da A-1-AT diminui com a administração de estrogênio e aumenta com a de progesterona. O fato da baixa concentração da

A-1-AT coincidir com a boa penetrabilidade do muco cervical e o fato do nível da A-1-AT estar elevado durante o período infértil do ciclo, quando o muco cervical forma uma barreira impenetrável ao espermatozóide, reforçam a hipótese de MOGHISSI e cols. (1964). Esses autores sugerem que as proteínases seminais participem do processo de penetração do espermatozóide. ZANEVELD e cols. (1971; segundo SCHUMACHER & ZANEVELD, 1974) constataram, em coelho, a existência de uma proteinase acrosomal, a acrosina, que tem papel na penetração do espermatozóide através do muco cervical. A conclusão a que se chega é que as enzimas proteolíticas não seriam inibidas durante o período fértil do ciclo, uma vez que a concentração da A-1-AT é muito baixa.

Estimativas da concentração de A-1-AT no soro normal foram relatadas por diversos autores que utilizaram o método de difusão radial (MANCINI e cols., 1965). De acordo com AUGENER (1965; segundo KUEPPERS, 1967), a concentração da A-1-AT é de cerca de 235 mg/100ml. SCHWICK e cols. (1966) encontraram uma média de 287 mg/100ml e KUEPPERS (1967) observou uma concentração média de 212 mg/100ml. Mais recentemente, HEIMBURGER (1974) considerou a variação normal da concentração da A-1-AT como sendo de 200 a 400 mg por 100 ml de soro.

Vários fatores são citados como relevantes na alteração da concentração normal da A-1-AT. Observou-se que o nível da A-1-AT aumenta com infecções, inflamações, desgaste pós-operatório, corticosteróides e anticoncepcionais (LAURELL e cols., 1968). Além disso, detecta-se nível mais elevado após a administração de vacina contra a febre tifóide (KUEPPERS, 1968) e

durante a gravidez (FAARVANG & LAURITSEN, 1963b; GANROT & BJERRE, 1967). Imediatamente após transplantes renais, na espécie humana, existe um aumento da concentração da A-1-AT, provavelmente devido ao esgotamento pós-operatório. Uma aguda diminuição nesta concentração é notada em alguns pacientes, um ou dois dias antes do aparecimento de oligúria, acompanhada de rejeição do transplante (TYLER, 1964).

### 3. Características bioquímicas

Em 1959, BUNDY & MEHL, usando ultracentrifugação, estimaram o peso molecular dessa proteína como da ordem de 45.000. Diversos autores, utilizando a mesma técnica, encontraram os seguintes valores: 55.000 (SHAMASH & RIMON, 1966), 47.000 (RIMON e cols., 1966), 49.500 (CRAWFORD, 1973), 58.000 (TRAVIS e cols., 1974), 59.900 (KRESS & LASKOWSKI, 1974), 49.500 (MUSIANI & TOMASI, 1976). Assim, podemos observar que as estimativas do peso molecular da alfa-1-antitripsina apresentam uma variação entre 45.000 e 59.900.

A proporção de carboidratos da A-1-AT parece variar entre 12% (FAGERHOL, 1976) e 15,9% (TRAVIS e cols., 1974). Uma estimativa intermediária dessa proporção (13,4%) foi encontrada por MUSIANI & TOMASI (1976).

Na Tabela 1, apresentamos estimativas da composição de aminoácidos, obtidas por diferentes autores. Observamos que a estimativa do total de resíduos detectados varia de 360 (JEPS-SON & LAURELL, 1974) a 413,2 (KRESS & LASKOWSKI, 1974). Os ami-

Tabela 1. Estimativas da composição da A-1-AT, em número de resíduos de aminoácidos.

Aminoácidos	Referências				
	CRAWFORD (1973)	KRESS & LASKOWSKI (1974)	TRAVIS e cols. (1974)	JEPSSON & LAURELL (1974)	MUSIANI & TOMASI (1976)
Lisina	32,0	35,6	41,0	31,0	32,0
Histidina	13,0	11,9	13,0	12,0	13,0
Arginina	7,0	7,8	7,0	6,0	6,0
Ac. Aspártico	44,0	43,9	47,0	38,0	42,0
Treonina	31,0	27,8	26,0	28,0	26,0
Serina	22,0	20,6	13,0	20,0	18,0
Ac. Glutâmico	50,0	52,1	55,0	43,0	51,0
Prolina	16,0	18,8	23,0	18,0	16,0
Glicina	22,0	23,1	23,0	20,0	24,0
Alanina	24,0	24,1	25,0	22,0	23,0
1/2 Cistina*	1,0	1,9	2,0	2,0	1,0
Valina	23,0	26,8	25,0	21,0	24,0
Metionina	8,0	7,9	6,0	8,0	10,0
Isoleucina	18,0	20,8	20,0	16,0	17,0
Leucina	45,0	50,8	48,0	41,0	46,0
Tirosina	7,0	7,0	6,0	6,0	5,0
Fenilalanina	29,0	29,1	27,0	26,0	26,0
Triptofano	2,0	3,2	1,0	2,0	2,0
<b>Total</b>	<b>394,0</b>	<b>413,2</b>	<b>408,0</b>	<b>360,0</b>	<b>382,0</b>

\* Forma oxidada da cisteína.

noácidos mais freqüentes são: ácido glutâmico, leucina e ácido aspártico.

Os resultados dos estudos físico-químicos, realizados por CRAWFORD (1973), foram consistentes com a hipótese da A-1-AT ser formada por uma simples cadeia de glicoproteína. Esse autor considera surpreendente o fato dessa proteína dar origem a uma série de bandas, quando submetida a eletroforese, uma vez que é um monômero. Ele considera esse resultado devido à diferença no número de resíduos de ácido siálico, por molécula. Sabe-se que uma pequena diferença de carga, em moléculas desse tamanho, se torna aparente em eletroforese, em gel de acrilamida com pH 9. Considere-se que microheterogeneidade similar foi encontrada na alfa-1-glicoproteína ácida (SCHMID, 1968; segundo CRAWFORD, 1973), e atribuída a uma isomerização posicional, uma vez que o ácido siálico pode se ligar ao C-3, C-4 ou C-6 do resíduo da galactose adjacente. É interessante salientar que CRAWFORD (1973) conseguiu alterar a posição do padrão de A-1-AT, na isoeletrofocalização, para cerca de 0,5 unidades a mais de pH, após tratamento do soro com neuraminidase. Esse resultado está de acordo com a sugestão de que ocorra modificação pós traducional nas cadeias laterais de aminoácidos, originando a microheterogeneidade.

A origem da variação bioquímica dos principais variantes (S e Z) ainda não está bem estabelecida. Segundo KUEPPERS & BLACK (1974) é razoável fazer uma analogia com os variantes de outras proteínas e sugerir que mutações de ponto sejam responsáveis por esses e por outros variantes da A-1-AT.

Além disso, as diferenças entre os variantes também podem ser acentuadas pela diferente quantidade de carboidratos, que provoca alterações na carga das moléculas. Nesse sentido, COX (1973b) encontrou indicações de que o variante Z possui menos ácido siálico do que a proteína M. Essa autora incubou soro de indivíduos de fenótipos M, S e Z, com neuraminidase. As amostras foram examinadas em vários intervalos de tempo, através de eletroforese em gel de amido ácido, seguida de eletroforese cruzada antígeno-anticorpo. COX observou que cada um dos dois maiores picos da proteína M passa por seis mudanças distintas de mobilidade. Em vista disso, sugeriu que cada pico, a partir do ânodo, representa a remoção de um resíduo de ácido siálico, evidenciando assim a existência de provavelmente seis resíduos de ácido siálico nessa molécula de A-1-AT. Dessa forma, o pico mais catodal, correspondente à banda mais lenta, teria seis resíduos de ácido siálico a menos que a banda mais rápida. Por outro lado, os maiores picos do variante Z passam por quatro mudanças na mobilidade. Por isto, sugere-se que possua dois resíduos de ácido siálico a menos que a proteína M.

A falta de ácido siálico pode explicar um fenômeno que ocorre com a proteína Z. Esse fenômeno se refere à ocorrência de inclusões citoplasmáticas, PAS positivas, no fígado de indivíduos que apresentam o alelo Z (AAGENAES e cols., 1972; GORDON e cols., 1972). Nota-se que a proporção de células que apresentam inclusões difere de pessoa para pessoa e parece aumentar com a idade. Além disso, indivíduos homocigotos apresentam mais células com inclusões do que os heterocigotos para Z. Nessa li-

nha de estudo, SHARP & FREIER (1972; segundo KUEPPERS & BLACK, 1974), através de microscopia eletrônica, encontraram esses grânulos no retículo endoplasmático, e sugeriram que sua presença era devida ao bloqueio de excreção da proteína Z da célula. Essa situação pode ser explicada por uma deficiência relativa de ácido siálico, pois sabe-se da sua importância no transporte de glicoproteínas da célula (BELL & CARREL, 1973). Em reforço a essa sugestão, está a demonstração de PRICER & ASHWELL (1971) de que glicoproteínas, livres de ácido siálico, se ligam preferencialmente às membranas das células do fígado. Assim, tanto a acumulação da A-1-AT do tipo Z nos hepatócitos, bem como a sua baixa concentração fora do fígado, é explicada pela falta de ácido siálico.

O modelo geral que explica a interação entre proteíνας e seus inibidores, proposto por LASKOWSKI e cols. (1971; segundo FRETZ & GAN, 1978a) se baseou, inicialmente, na atividade do inibidor da tripsina da soja, e mais tarde, demonstrou ser aplicável a outros inibidores da tripsina (LASKOWSKI & SEALOCK, 1971; segundo FRETZ & GAN, 1978a). Esse modelo se baseia na presença de uma simples ligação Arginina-X ou Lisina-X dentro do inibidor, a qual sofre hidrólise na presença da tripsina e é necessária para a atividade inibidora. Através de modificações químicas seletivas, das cadeias laterais arginil ou lisil do inibidor, e subsequente análise da atividade inibidora da molécula, pode-se classificar o inibidor como pertencendo ao tipo arginil ou lisil (HAYNES e cols., 1967; LIU e cols., 1968). BUSBY & GAN (1976) mostraram, através de técnicas de

modificações químicas, a importância e necessidade dos resíduos lisil para a capacidade inibidora trípica e quimotríptica da alfa-1-antitripsina. FRETZ & GAN (1978b) demonstraram o mesmo com relação à inibição da elastase pela alfa-1-antitripsina. Dessa forma, a A-1-AT é considerada um inibidor do tipo lisil. Se provocarmos alteração nessa ligação, a proteína perde sua capacidade inibidora.

### III - MÉTODOS QUALITATIVOS E QUANTITATIVOS DE DETERMINAÇÃO DA ALFA-1-ANTITRIPSINA

Com a finalidade de conhecer melhor os diferentes variantes da alfa-1-antitripsina, bem como o seu comportamento, foram desenvolvidos vários métodos que permitiram estudá-los tanto qualitativa como quantitativamente. Os métodos qualitativos demonstraram ser mais precisos na identificação dos variantes, porém os quantitativos se apresentaram como mais rápidos e simples, sendo, portanto, úteis para grandes rastreamentos populacionais.

A seguir, apresentaremos alguns dos principais métodos utilizados para a determinação da A-1-AT, e o tipo de resultados por eles obtidos.

#### 1. Eletroforese

##### 1.1. Eletroforese em gel de amido ácido

Esse método, primeiramente utilizado por FAGERHOL & BRAEND (1965) e por FAGERHOL & LAURELL (1967), foi, posteriormente, aperfeiçoado por FAGERHOL (1968).

Através da eletroforese em gel de amido ácido (pH 4,9 - 4,95), num sistema descontínuo de tampões, os variantes genéticos de A-1-AT aparecem na região denominada como pré-albumínica (FAGERHOL & BRAEND, 1965). Essa proteína, portanto, migra em direção ao ânodo.

FAGERHOL (1969), utilizando amido negro como corante, descreveu o aparecimento de um padrão de três bandas, claramente separadas, e de cinco outras bandas mais fracas, que são podem ser distinguidas com uma ótima separação eletroforética. Cada uma dessas bandas é referida por um algarismo, de 1 a 8, a partir da banda com a maior taxa de migração. Logo, a mais lenta é referida pelo algarismo 8 e as bandas intermediárias, pelos algarismos de 2 a 6. Na Fig. 1, temos a representação esquemática dos principais fenótipos observados após eletroforese em gel de amido ácido.

LIEBERMAN e cols. (1972a) descreveram um padrão similar ao relatado por FAGERHOL (1969), em que todos os fenótipos homozigotos, exceto o Z, apresentavam três bandas maiores, facilmente visíveis no gel de amido, e mais algumas bandas menores, de difícil visualização. As três bandas maiores apresentavam distribuição espacial e concentração similar em diferentes homozigotos, sendo que estes diferiam entre si pela taxa de migração de suas bandas. Os padrões proteicos apresentados pelos heterozigotos mostravam sobreposição de algumas bandas proteicas condicionadas pelos dois alelos de A-1-AT. Os variantes, S, F, I ou P, quando presentes em heterozigotos, junto com o alelo normal M, são detectados, usualmente, pelas bandas extras

específicas que identificam estas variantes, isto é aquelas que não se sobrepõem. As bandas que não se sobrepõem, em cada heterozigoto, apresentam, aproximadamente, a metade da concentração observada no homozigoto. As bandas que se sobrepõem apresentam uma concentração relativamente maior, por serem compostas por proteínas condicionadas pelos dois alelos. O variante Z apresenta um padrão de bandas comparável ao dos outros variantes. Suas bandas, entretanto, apresentam uma concentração tão baixa que não são normalmente visíveis no gel de amido, corado com amido negro. Geralmente, esse variante, em heterozigose, não é reconhecido no gel de amido. Nesse caso, sua presença é sugerida pela baixa concentração de A-1-AT nas maiores bandas.

Como já foi referido no capítulo II, a A-1-AT é um monômero e o excesso de bandas, verificado na eletroforese, pode ser devido à diferença no número de resíduos de ácido siálico (CRAWFORD, 1973).

## 1.2. Eletroforese cruzada antígeno-anticorpo

LAURELL (1965) desenvolveu a técnica de eletroforese cruzada antígeno-anticorpo. KUEPPERS & BEARN (1966b) introduziram uma modificação, substituindo o gel de agarose, usado na primeira etapa da técnica, por gel de amido ácido. Após a separação das proteínas, elas correm em gel de agarose, que contém um anti-soro específico contra a A-1-AT. O precipitado, decorrente da reação imunológica entre as frações de A-1-AT e o soro, forma curvas, com alturas correspondentes à quantidade

relativa de proteína de cada fração.

FAGERHOL & LAURELL (1967), com o uso dessa técnica, evidenciaram, nos homozigotos M, um padrão composto de 6 picos. É interessante salientar que esses autores utilizaram, na primeira etapa, eletroforese em gel de amido ácido, utilizando nas cubas, tampão com pH 9,0, o que não permitiu uma perfeita separação em oito bandas.

FAGERHOL (1969), aprimorando essa técnica, com a utilização de gel de amido ácido e de tampões descontínuos, observou as duas outras zonas (correspondentes às 3 e 5). As zonas, anteriormente detectadas, correspondiam às referidas pelos algarismos 1, 2, 4, 6, 7 e 8. Essas novas zonas apareceram bem próximas e à frente das duas maiores zonas 4 e 6, nos fenótipos M e S. Estes picos extras não eram visíveis nos fenótipos F e Z, cujos picos 4 e 6 apresentaram uma leve assimetria em direção ao ânodo. Nos heterozigotos o produto de um alelo se sobrepõe ao do outro. Assim, duas ou mais zonas podem se sobrepor enquanto outras permanecem como picos distintos. Conseqüentemente, números variáveis de picos de precipitação são obtidos quando os fenótipos de diferentes heterozigotos são submetidos à eletroforese cruzada antígeno-anticorpo. Dessa forma, quando os fenótipos FM, FS, FZ, IM, MS, MV, MW e SZ são examinados, obtem-se padrões que variam de 7 a 11 picos.

Se realizarmos uma eletroforese cruzada antígeno-anticorpo com uma mistura de soros de indivíduos MM e SS, o padrão resultante será indistinguível daquele de um heterozigoto MS (KUEPPERS, 1972). Isto deve-se ao fato da A-1-AT ser um monômero e não poder formar bandas híbridas nos heterozigotos reais.

### 1.3. Isoeletrofocalização

ALLEN e cols. (1974) desenvolveram um método de determinação dos fenótipos de A-1-AT, através da focalização pelo ponto isoelétrico, utilizando gel de poliacrilamida.

As proteínas da A-1-AT possuem pontos isoelétricos de pH entre 4,2 a 4,65. Utilizando Ampholines com pH entre 3,5 a 5,0 ou 3,0 a 6,0, os fenótipos do loco PI, determinados pelos alelos mais comuns (M, Z, S e F), são facilmente identificados e podem ser estudados tanto qualitativa como quantitativamente (ALLEN e cols., 1974). Os padrões obtidos pela isoeletrofocalização são semelhantes aos encontrados com eletroforese em gel de amido ácido. Entretanto, devido à alta resolução da isoeletrofocalização, uma melhor distinção entre os vários alelos pode ser feita. Além disso, esse método permitiu a detecção de seis subtipos de M, não visualizados anteriormente com outras técnicas. Esses subtipos correspondem aos fenótipos M1, M2, M3, M1M2, M1M3, M2M3.

### 1.4. Eletroforese com imunofixação

Esse método, anteriormente usado na determinação de outras proteínas, foi desenvolvido para o exame da A-1-AT por JOHNSON & ALPER (1970). Essa técnica difere da eletroforese cruzada antígeno-anticorpo, por não necessitar de duas corridas eletroforéticas. Nesse caso, as proteínas são separadas em gel de agarose e, em seguida, cobertas por anti-soro específico para a A-1-AT. Essa técnica, entretanto, tem a desvantagem de re-

querer uma maior quantidade de anti-soro do que a eletroforese cruzada antígeno-anticorpo.

As mobilidades relativas dos variantes anodais (C, D, E e F), em relação ao M, quando examinadas após eletroforese com imunofixação (pH 8,6), diferem das obtidas após eletroforese em gel de amido ácido. Essa distinção vem auxiliar na devida caracterização desses variantes. Já as posições dos variantes com menor mobilidade (S, V, X e Y) são similares às observadas na eletroforese em gel de amido ácido.

Entretanto, muitos variantes não podem ser diferenciados após eletroforese com imunofixação alcalina. Podemos reunir em 4 grupos os que apresentam mobilidade semelhante. No grupo 1, encontramos os variantes B, E, I, MLAM, MBAL; no grupo 2, temos os variantes G, L e M; no terceiro grupo, encontramos os variantes N, P e S; e finalmente, no grupo 4, encontramos V, Z e a banda menor de M. Os variantes do 3º grupo, segundo JOHNSON (1976), são distinguíveis pela diferença significativa em concentração ( $N > S >> P$ ).

A vantagem dessa técnica é que ela possibilita visualizar apenas as bandas de A-1-AT, uma vez que as outras proteínas, não fixadas, são lavadas do gel antes da coloração.

#### 1.5. Eletroforese em gel de agarose e poliacrilamida

LAURELL & PERSSON (1973) desenvolveram um método eletroforético em gel de agarose e poliacrilamida, com tampão acetato, em pH 5,15. Nesse sistema, a alfa-1-antitripsina é separa-

da em cinco bandas maiores, permitindo que se estime a sua mobilidade relativa, bem como a concentração de suas diferentes frações.

Embora a eletroforese em gel de agarose seja mais simples do que a eletroforese em gel de amido ácido, esta fornece um padrão mais distinto. Segundo KLASSEN e cols. (1977), a grande vantagem na utilização dessa técnica é que ela permite a detecção do fenótipo MZ, sem a necessidade de se realizar uma eletroforese cruzada antígeno-anticorpo.

## 2. Inibição da tripsina

Esse método se baseia na capacidade do soro em inibir a ação da tripsina sobre uma variedade de substratos artificiais, permitindo a avaliação da atividade funcional da A-1-AT.

ERIKSSON (1965) desenvolveu um método de determinação da capacidade inibidora da A-1-AT, utilizando p-nitroanilide de benzoil arginina, como substrato da tripsina. A ação inibidora do soro é expressa em miligramas de tripsina inibida por mililitro de soro. Outro substrato que pode ser utilizado é o ester etílico de benzoil arginina (LIEBERMAN, 1969).

ERIKSSON (1965), trabalhando com o soro de 100 indivíduos normais, encontrou um valor médio de inibição igual a  $1,07 \pm 0,12$  mg de tripsina, por ml de soro. Ao estudar indivíduos homocigotos deficientes, encontrou um valor médio de inibição igual a  $0,24$  mg de tripsina/ml de soro. Nos heterozigo-

tos, esse autor definiu, como variação da capacidade de inibição da A-1-AT, uma faixa de 0,40 a 0,80 mg de tripsina/ml de soro. LIEBERMAN e cols. (1969) descreveram valores normais de inibição numa faixa de 0,85 a 1,60 mg para os homozigotos normais. Os heterozigotos se encontraram numa faixa de 0,40 a 0,85 mg e os homozigotos deficientes apresentaram capacidade inibidora de menos de 0,35mg. WELCH e cols. (1969), através de estudos familiares, definiram como nível intermediário de A-1-AT um valor médio de  $0,52 \pm 0,12$  mg/ml, sendo que para os homozigotos normais o valor médio encontrado foi de  $1,08 \pm 0,17$  mg/ml.

Assim, podemos observar que o valor de inibição intermediário, corresponde a, mais ou menos, 50% do encontrado nos indivíduos normais e que os homozigotos deficientes apresentam uma capacidade inibidora de cerca de 25% da normal. Note-se que, com alta probabilidade, os grupos de deficientes são possivelmente heterogêneos, uma vez que os alelos mais frequentes desse grupo são o S e o Z. Em vista disso, esses autores podem ter considerado um heterozigoto SZ, como homozigoto deficiente, com conseqüente aumento na capacidade de inibição, uma vez que os homozigotos ZZ apresentam apenas cerca de 10% da concentração de A-1-AT (COOK, 1974).

JAMES e cols. (1966) adaptaram, para o exame da A-1-AT, o teste de gelatina já utilizado na determinação da atividade da tripsina, em fibrose pancreática (SCHWACHMAN, 1949). A adaptação visou à criação de um método, não dispendioso e simples,

que permitisse ser aplicado em rastreamentos populacionais de deficientes (heterozigotos e homozigotos). Esse método se baseia na capacidade da tripsina em digerir a gelatina encontrada na superfície do filme de raios-X, exposto e revelado. Se a tripsina é inativada pela A-1-AT, o filme não é digerido.

JAMES e cols. (1966), visando à determinação dos níveis normais da A-1-AT, empregaram sete soluções padrões de tripsina que continham de 1 a 2,5 mg/ml, com 0,25 mg de diferença entre cada solução. Duas gotas de cada solução são incubadas com duas gotas de soro, durante 10 minutos, e, em seguida, uma gota de cada mistura é colocada sobre o filme. Após incubação durante duas horas, à temperatura ambiente, o filme é lavado em água corrente. Quando não se dá inibição suficiente, dá-se a corrosão, e o resultado é considerado como positivo.

A estimativa da capacidade inibidora do soro (mg de tripsina por ml) foi considerada como o valor intermediário entre o último resultado negativo e o primeiro positivo. A análise do soro de 69 indivíduos normais indicou uma média da capacidade inibidora de  $1,69 \pm 0,30$  mg de tripsina/ml de soro. Em seguida, esses autores prepararam soluções padrões que continham 10% (0,17 mg), 50% (0,85 mg) e 100% (1,7 mg) da concentração de tripsina inibida pelo soro normal, com a finalidade de separar os fenótipos. Esses autores esperavam que o soro normal inibisse todas as três concentrações de tripsina, que os heterozigotos não conseguissem inibir a solução mais concentrada e que os homozigotos deficientes inibissem apenas a menos concentrada.

Esse método, entretanto, pode levar a erros de diagnós-

ticos. Algumas vezes, indivíduos heterozigotos podem apresentar um resultado falso normal.

No Brasil, estão sendo realizados dois trabalhos com essa técnica. FIGUEIREDO & CHAUTARD-FREIRE-MAIA (1980), visando padronizar a técnica de JAMES e cols. (1966), utilizaram concentrações de tripsina de 1 mg/ml até 3,75 mg/ml, com intervalos de 0,25 mg/ml. Essas autoras, testando amostras de soros de 78 indivíduos, encontraram um valor de 2,76 mg/ml de tripsina (DP=0,35), para a capacidade inibidora média. Com a retirada de dois indivíduos, classificados como tendo cerca de 50% da capacidade inibidora média, ou seja heterozigotos, a média dos normais foi de 2,79 mg/ml de tripsina (DP=0,27), sendo esse valor significativamente maior que o relatado por JAMES e cols. (1966). Ainda no Brasil, SILVA (1980, comunicação pessoal), trabalhando com a técnica de JAMES e cols. (1966), com ligeiras modificações, encontrou uma capacidade inibidora média de 1,12 mg de tripsina por ml de soro, numa amostra de caucasóides, sendo esse valor também diferente do encontrado por JAMES e cols. (1966). Nesse caso, entretanto, a média encontrada foi inferior à da população americana. SILVA (1980) observa ainda a necessidade de se padronizar os valores normais de inibição para cada tipo ou lote de tripsina que se pretende utilizar nas dosagens.

### 3. Imunodifusão radial

O método de imunodifusão radial foi introduzido por

MANCINI e cols. (1965), sendo utilizado especificamente para a A-1-AT por AUGENER (1965; segundo KUEPPERS, 1967) e KUEPPERS (1967). Esse método permite avaliar a concentração da A-1-AT, através do exame do precipitado originado da reação antígeno-anticorpo. Os valores de concentração encontrados por diversos autores, já foram citados no capítulo II.

Com modificações na técnica de imunodifusão radial, LIEBERMAN e cols. (1972b) desenvolveram um teste que permite separar homozigotos normais de heterozigotos e deficientes SS e ZZ. O soro normal (fenótipo M) produz apenas um anel de precipitação, enquanto os heterozigotos e homozigotos deficientes apresentam um anel duplo. Esses autores encontraram testes positivos, sem falsos negativos, em 50 MZ, 35 MS, 3 FM e 17 SS. Nos homozigotos ZZ, a baixa concentração é mais um fator a se levar em conta no diagnóstico. LIEBERMAN e cols. (1972b) postularam que o anel mais interno é composto por dímeros, anormalmente formados pelas moléculas variantes de A-1-AT. Esses dímeros não seriam estáveis, e sua reversão à forma normal de monômeros seria responsável pela formação do anel externo, no caso dos homozigotos deficientes. Além disso, homozigotos normais (MM), cujo soro tenha sido estocado por 1 ano, podem formar o anel duplo, em cerca de 10% dos casos. Seria o mesmo caso de formação de dímeros instáveis.

#### IV - FATORES QUE ALTERAM OS RESULTADOS DA TIPAGEM DA ALFA-1- -ANTITRIPSINA

Uma série de fatores pode provocar alterações nas amostras a serem examinadas quanto à tipagem da A-1-AT, levando, em certas circunstâncias, à obtenção de falsos resultados. A seguir, abordaremos os principais fatores, que podem ocasionar essas alterações.

##### 1. Envelhecimento das amostras

A exposição de soros à temperatura ambiente, por 2 ou mais dias, leva a proteína M a apresentar, em eletroforese em gel de amido ácido, um falso padrão FM ou EM.

COOK (1975) chama atenção para o fato de que os padrões FM falsos surgem, principalmente, se as amostras, deixadas à temperatura ambiente, estão em contato com eritrócitos. Os soros com falsos padrões FM podem reverter ao padrão original, desde que se incubem 4 gotas de soro com 1 gota de solução de mercaptoetanol a 5%, em temperatura ambiente, por 20 minutos.

## 2. Excesso de heparina

Quando um pequeno volume de sangue é misturado com uma dose excessiva de heparina, as diferentes bandas da A-1-AT não podem ser detectadas após eletroforese em gel de amido ácido. Apenas uma banda proteica, intensamente corada, aparece à frente da albumina. Segundo COOK (1975), efeito semelhante pode ser produzido pela adição de tripsina à amostra (1 mg de tripsina/ml de soro).

## 3. Contaminação das amostras

COOK (1975) encontrou três amostras que, aparentemente, representavam variantes homozigotos lentos, porém provinham de crianças cujos pais eram de fenótipo M. Um exame mais minucioso demonstrou que as amostras estavam contaminadas. Com amostras novas, de dois desses indivíduos, ficou demonstrado que eram do tipo M. Provavelmente, algum organismo contaminador produziu um efeito semelhante ao da neuraminidase, que ao remover ácido siálico, ocasiona uma redução na mobilidade eletroforética das bandas, como foi demonstrado por COX (1973b, 1975).

## 4. Gravidez

Segundo FAARVANG & LAURITSEN (1963b), a concentração da A-1-AT aumenta durante a gravidez, principalmente no 2º e 3º trimestres. Durante o 3º trimestre, as bandas M7 e M8 tornam-se bastante evidentes (COOK, 1975).

## 5. Infecções, inflamações e lesões tissulares

Durante o aparecimento de inflamações, infecções e lesões tissulares, ocorre um aumento significativo na concentração da A-1-AT (FAGERHOL, 1971). Nesse caso, também se verifica uma maior evidenciação das bandas M7 e M8 (COOK, 1975).

## 6. Período fetal

Amostras de sangue de cordão umbilical contêm A-1-AT fetal e não materna (COOK, 1975). Na proteína fetal, a banda M6 é muito mais intensa que a M4, chegando a produzir uma assimetria tão óbvia em feto de 14 semanas, que torna fácil a detecção do fenótipo MS.

## 7. Sarcoidose pulmonar ativa e administração de estrógeno

Indivíduos de fenótipo M, que se encontram sob as condições acima mencionadas, apresentam um padrão de bandas igual a MS, com aumento das bandas M2, M4 e M7. A distinção entre esse padrão e o verdadeiro MS é possível através do uso de imunoeletroforese cruzada (JOHNSON, 1976).

## 8. Haptoglobina tipo 1-1

Soros de indivíduos de fenótipo 1, do sistema da cadeia alfa de haptoglobina, quando examinados em gel de amido (pH 4,9), podem comprometer o exame do fenótipo da A-1-AT. Segundo COOK (1975) uma série de bandas da haptoglobina pode aparecer

na região correspondente à A-1-AT Z. KLASSEN e cols. (1977) encontraram falsos MF, MI e MG, pelo mesmo motivo. Nesses casos, adicionando-se hemoglobina A ao soro, elimina-se o problema.

V - VARIANTES DA ALFA-1-ANTITRIPSINA E SUA DISTRIBUIÇÃO  
POPULACIONAL

FAGERHOL & BRAEND (1965) foram os primeiros a descrever variantes genéticas nesse sistema, usando eletroforese em gel de amido. A partir de então, uma série de autores, utilizando técnicas diferentes, tais como: eletroforese em gel de amido ácido, combinada ou não, com imuno-eletroforese; eletroforese em agarose; estudos quantitativos e estudos familiares; encontraram evidências da existência de mais de 20 alelos do loco PI. Esses alelos, bem como seus descobridores, estão relacionados na Tabela 2.

A heterogeneidade do fenótipo M foi notada, primeiramente, por JOHNSON (1976) ao utilizar eletroforese em gel de agarose com imunofixação. Esse autor, ao examinar seus dados, considerou que além do fenótipo M, existiriam os subtipos  $M_{\text{Baldwin}}$  (MBAL) e  $M_{\text{Lamb}}$  (MLAM). Com a introdução do uso da técnica de isoeletrofocalização para a identificação dos fenótipos do sistema PI (ALLEN e cols., 1974; LEBAS e cols., 1974; KUEPPERS, 1976), conseguiu-se, de início, detectar 3 subtipos de M (KUEPPERS, 1976; van den BROEK e cols., 1976; FRANTS & ERIKSSON, 1976), e, logo a seguir, foram detectados mais outros 3 (GENZ e cols.,

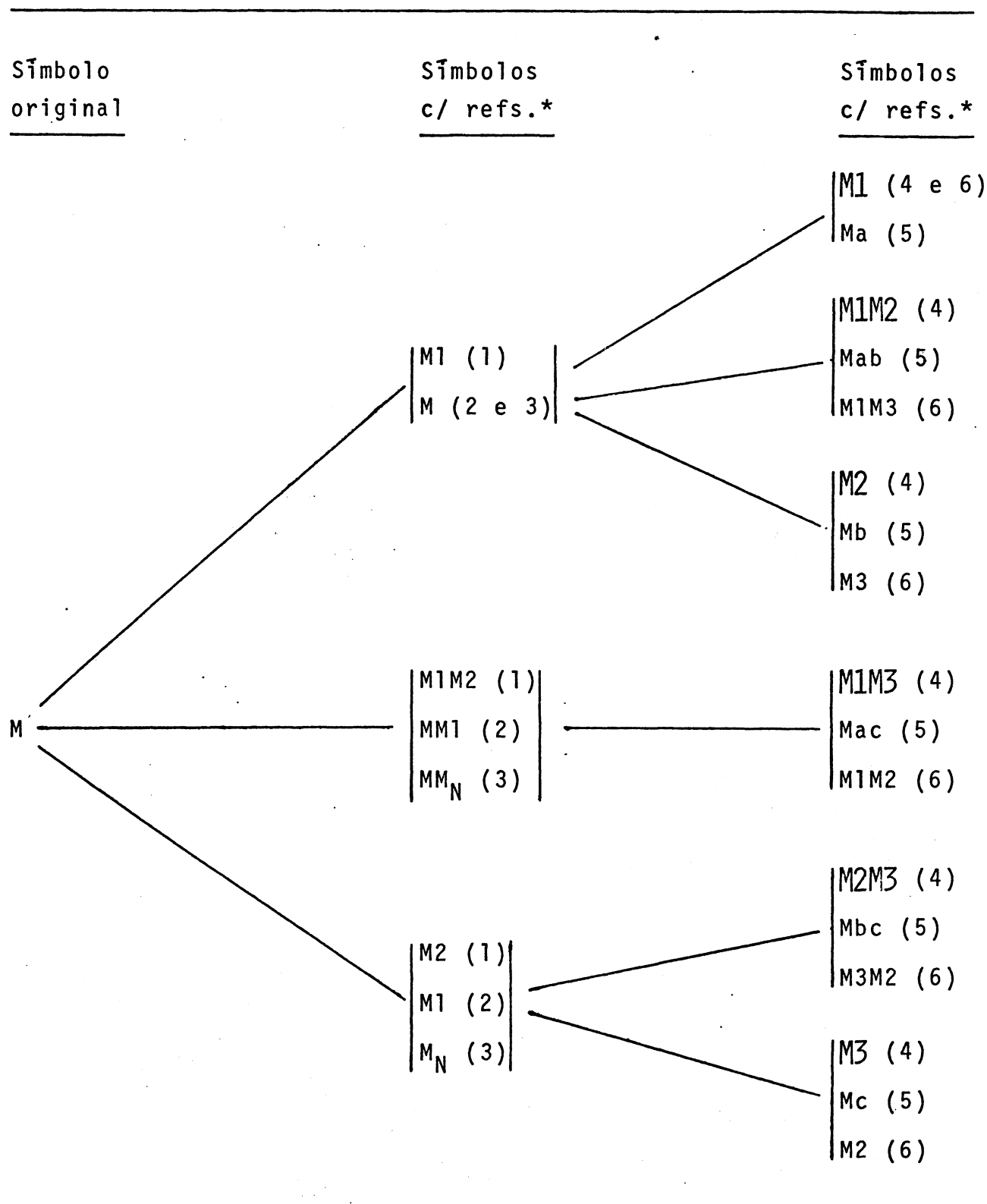
Tabela 2. Principais alelos do sistema PI com respectivos descobridores.

<u>Alelo</u>	<u>Referências</u>
<u>PI*B</u>	MARTIN, VANDEVILLER e ROPARTZ (1973)
<u>PI*C</u>	ROBINET-LEVY (1974)*
<u>PI*D</u>	ROBINET-LEVY & RIEUNIER (1972)
<u>PI*E</u>	FAGERHOL (1971)
<u>PI*E2</u>	FAGERHOL (1975)*
<u>PI*F</u>	FAGERHOL & BRAEND (1965)
<u>PI*G</u>	FAGERHOL (1971)
<u>PI*I</u>	FAGERHOL (1967)
<u>PI*L</u>	VANDEVILLE, MARTIN e ROPARTZ (1974)
<u>PI*M</u>	FAGERHOL & BRAEND (1965)
<u>PI*MBAL</u>	JOHNSON (1976)
<u>PI*MLAM</u>	JOHNSON (1976)
<u>PI*N</u>	COX (1973 <sub>a</sub> )
<u>PI*P</u>	FAGERHOL & HAUGE (1968)*
<u>PI*S</u>	FAGERHOL & BRAEND (1965)
<u>PI*V</u>	FAGERHOL (1967)
<u>PI*W</u>	FAGERHOL & TENFJORD (1968)
<u>PI*W2</u>	GEDDE-DAHL, FAGERHOL, COOK e NOADES (1972)
<u>PI*X</u>	ERIKSSON & LAURELL (1963)
<u>PI*Y</u>	COOK (1975) <sup>†</sup>
<u>PI*Y2</u>	PORTER, MOWAT, COOK, HAYNES, SHILKIN e WILLIAMS (1972)
<u>PI*Z</u>	LAURELL & ERIKSSON (1963)
<u>PI*Q0</u>	TALAMO, LANGLEY, REED e MAKINO (1973)

\* Segundo COOK (1975); † detectado em 1969.

1977; KLASSEN e cols., 1977; FRANTS & ERIKSSON, 1978). Esses 6 fenótipos são condicionados por 3 alelos distintos. Assim, num período de tempo, relativamente curto, vários autores descobriram os mesmos variantes e os denominaram de maneira diferente. Visando à solução desse problema, FRANTS e cols. (1978) propuseram que, na nomenclatura dos três variantes, fossem referidos algarismos arábicos, de acordo com o seu ponto isoelétrico. Desse modo, o alelo responsável pela proteína mais anodal foi denominado de M1, aquele responsável pela de posição intermediária, de M2 e o condicionador do mais catodal, de M3. Na Tabela 3 temos os fenótipos reunidos em grupos, com as diferentes denominações recebidas. Nessa tabela, mostramos como os três primeiros fenótipos detectados foram subdivididos nos seis atuais (M1, M2, M1M2, M1M3, M2M3, M3). Assim, de acordo com a Tabela 3, poderíamos agrupar os fenótipos da seguinte maneira: os subtipos M1, M1M2 e M2 de FRANTS & ERIKSSON (1978), corresponderiam, respectivamente, a Ma, Mab, Mb de GENZ e cols. (1977), a, respectivamente, M1, M1M3 e M3 de KLASSEN e cols. (1977), e, provavelmente, são subdivisões dos tipos previamente denominados de M1 por FRANTS & ERIKSSON (1976) e de M, por KUEPPERS (1976) e por van den BROEK e cols. (1976). O fenótipo M1M3 (FRANTS & ERIKSSON, 1978) corresponderia a Mac (GENZ e cols., 1977), a M1M2 (KLASEN e cols., 1977), a M1M2 (FRANTS & ERIKSSON, 1976), a MM1 (KUEPPERS, 1976) e a MM<sub>N</sub> (van den BROEK e cols., 1976). Os subtipos M2M3 e M3 corresponderiam, respectivamente, a Mbc e Mc (GENZ e cols., 1977) e a M3M2 e M2 (KLASEN e cols., 1977). Seriam, ainda, respectivamente, subdivisões

Tabela 3. Esquema dos subtipos do alelo M, de acordo com diferentes autores. Na primeira subdivisão são referidos os três subtipos detectados inicialmente e, na segunda, os seis subtipos atuais. Cada grupo representa um fenótipo com as diferentes denominações recebidas.



\* 1. FRANTS & ERIKSSON, 1976.  
 2. KUEPPERS, 1976.  
 3. van den BROEK e cols., 1976.

4. FRANTS & ERIKSSON, 1978.  
 5. GENZ e cols., 1977.  
 6. KLASSEN e cols., 1977.

de  $M_2$  (FRANTS & ERIKSSON, 1976), de  $M_1$  (KUEPPERS, 1976) e de  $M_N$  (van den BROEK e cols., 1976). Quanto aos subtipos referidos por JOHNSON (1976), ainda não está clara a sua correspondência com os demais (GENZ e cols., 1977).

Uma série de trabalhos já foi realizada, com o objetivo de estimar as frequências gênicas e fenotípicas, em populações de diferentes composições raciais e pertencentes à regiões geográficas distintas. Alguns desses dados foram distribuídos em várias tabelas. Nas Tabelas 4, 5, 6 e 7 temos as frequências fenotípicas e nas Tabelas 8, 9, 10 e 11 encontramos as frequências gênicas, respectivamente, de países da Europa, América, África e Ásia.

O alelo mais freqüente em todas as populações é o  $\underline{M}$  ( $\underline{M} = \underline{M}_1 + \underline{M}_2 + \underline{M}_3$ ). As estimativas de sua frequência variam de 86% (Portugal) até 100% (Ásia). Se não considerarmos a amostra da Ásia, de FAGERHOL & TENFJORD (1968), em vista de seu tamanho reduzido, observamos que a frequência máxima é de cerca de 99,57%, entre os Lapões da Finlândia.

O segundo alelo mais freqüente é o  $\underline{S}$ . Com relação a ele, é interessante ressaltar sua alta frequência nas populações da península Ibérica. Em Portugal, a frequência chega a 11,52% (excluindo-se a amostra de FAGERHOL & TENFJORD, 1968), e, na Espanha, a 11,50%. Essas frequências diferem, até mesmo, das encontradas em outros países mediterrâneos, como Grécia (2,8%) e Itália (2,9%). Podemos verificar, ainda, que a frequência do alelo  $\underline{S}$  decresce da península Ibérica em direção ao norte da Europa. Por outro lado, a frequência do alelo  $\underline{F}$  decresce da Norue-

Tabela 4. Frequências dos fenótipos do loco PI em diversas amostras européias (em %).

Países	Amostras	Referências	Técnicas <sup>φ</sup>	N	Fenótipos																			
					MM	MS	MZ	MF	MI	MV	MW	MP	SS	SZ	SF	SI	ZZ	FF	FZ	ML	MX	EM	MG	ZQO
Portugal*	Marinheiros	FAGERHOL & TENFJORD (1968)	EG	39	71,80	28,20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Portugal*	-	MARTIN e cols. (1976)	EG e EC	330	76,66	16,67	3,03	-	-	-	-	-	-	2,73	0,61	-	0,30	-	-	-	-	-	-	-
Espanha*	Marinheiros	FAGERHOL & TENFJORD (1968)	EG	378	75,40	18,78	1,85	0,53	0,26	0,53	0,53	-	1,59	0,53	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Espanha*	-	GOEDDE e cols. (1973)	EG	576	76,22	22,74	1,04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
França	Doadores	ARNAUD e cols. (1977)	IEF	1.653	82,39	11,19	2,60	0,12	0,66	0,48	-	0,18	1,39	0,24	-	0,06	-	0,30	-	0,06	0,12	0,12	0,06	-
Itália	Recém-nascidos	PIANTELLI e cols. (1978)	IEF	500	83,00	12,60	2,20	0,80	0,40	0,20	-	-	0,20	0,40	-	-	0,20	-	-	-	-	-	-	-
Itália	-	KLASEN e cols. (1978)	IEF	202	90,59	4,95	1,98	1,49	0,49	-	-	-	0,49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grécia	-	KELLERMANN & WALTER (1970)	EG e EC	400	92,50	0,50	1,75	2,50	1,25	0,25	0,25	0,25	-	-	-	-	0,75	-	-	-	-	-	-	-
Grécia*	-	FETARKIS e cols. (1974)	EG e EC	504	92,86	5,16	0,20	0,59	-	0,39	-	-	0,20	-	0,20	-	0,20	0,20	-	-	-	-	-	-
Alemanha	-	KELLERMANN & WALTER (1970)	EG e EC	516	78,68	3,29	0,58	14,34	0,19	-	-	-	-	-	0,97	-	0,58	1,35	-	-	-	-	-	-
Alemanha	-	GOEDDE e cols. (1970)	EG e EC	262	93,51	4,58	1,91	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hungria	-	KELLERMANN & WALTER (1970)	EG e EC	172	82,55	1,74	0,58	9,88	0,58	0,58	-	-	0,58	-	0,58	-	1,16	1,74	-	-	-	-	-	-
Irlanda do Norte	-	BLUNDELL e cols. (1975)	EG e EC	1.000	87,80	7,30	3,50	0,30	0,60	-	-	-	-	0,40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,10
Reino Unido**	-	COOK (1975)	EG e EC	4.565	88,54	8,02	1,56	0,66	-	0,09	-	-	-	0,35	0,22	0,02	-	0,04	-	0,02	-	0,02	-	-
Islândia*	Aland e Kökar	FAGERHOL e cols. (1969)	EG e EC	450	99,11	0,89	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Islândia	-	KELLERMANN & WALTER (1970)	EG e EC	94	75,53	2,13	-	20,21	-	-	-	-	-	1,06	-	-	-	1,06	-	-	-	-	-	-
Noruega	Doadores	FAGERHOL & BRAEND (1965)	EG	390	95,90	2,31	-	1,02	-	-	-	-	0,51	-	0,26	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Noruega*	Doadores e gestantes	FAGERHOL (1967)	EG	2.830	89,75	4,10	2,86	2,54	0,21	0,07	-	-	0,14	0,14	0,04	0,04	0,07	0,04	-	-	-	-	-	-
Noruega*	Lapões	FAGERHOL e cols. (1969)	EG e EC	302	98,34	-	1,66	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Noruega*	Casais	FAGERHOL & GEDDE-DAHL (1969)	EG e EC	154	85,06	5,84	4,55	3,25	0,65	-	-	-	-	-	-	-	0,65	-	-	-	-	-	-	-
Finlândia*	Lapões	FAGERHOL e cols. (1969)	EG e EC	468	99,15	0,64	0,21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Finlândia*	-	FAGERHOL e cols. (1969)	EG e EC	223	99,10	-	0,90	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Europa* <sup>θ</sup>	Marinheiros	FAGERHOL & TENFJORD (1968)	EG	186	93,01	5,38	1,07	-	0,54	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

φ EG = eletroforese em gel de amido ácido; EC = eletroforese cruzada antígeno-anticorpo; IEF = isoeletrofocalização.

\* Frequências calculadas a partir dos dados fornecidos pelos autores.

+ Não são incluídas 5 variantes raras não especificadas e 16 amostras alteradas.

θ Exceto Espanha, Portugal e Noruega.

Tabela 5. Frequências dos fenótipos do loco PI em três amostras americanas (em %).

Países	Amostras	Referências	Técnicas <sup>+</sup>	N	Fenótipos										
					MM	MS	MZ	MF	MI	MV	SS	SZ	SF	FF	MX
Estados Unidos	Branco e negros	PIERCE e cols. (1975)	EG e EC	2.285	90,24	6,43	2,19	0,44	0,22	0,22	0,13	0,13	-	-	-
Estados Unidos	Branco	HARADA & OMOTO (1970)	EG e EC	261	91,20	3,10	-	4,50	-	-	-	-	0,40	0,40	0,40
América Latina*	Marinheiros	FAGERHOL & TENFJORD(1968)	EG	26	88,46	11,54	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ EG = eletroforese em gel de amido ácido; EC = eletroforese cruzada antígeno-anticorpo.

\* Frequências calculadas a partir dos dados fornecidos pelos autores.

Tabela 6. Frequências dos fenótipos do loco PI em três amostras africanas (em %).

Países	Amostras	Referências	Técnicas <sup>+</sup>	N	Fenótipos									
					MM	MS	MZ	MF	MI	MV	SZ	ZZ	FF	ML
Moçambique	Negros	KELLERMANN & WALTER(1970)	EG e EC	274	97,08	0,30	-	1,80	-	-	-	-	0,70	-
Zaire*	Bantu	VANDEVILLE e cols. (1974)	EG e EC	132	93,94	-	-	-	-	0,76	-	-	-	5,30
Somália	Recém-nascidos	MASSI & VECCHIO (1977)	IEF e EC	347	94,81	2,59	0,28	0,57	0,28	-	0,28	0,86	0,28	-

+ EG = eletroforese em gel de amido ácido; EC = eletroforese cruzada antígeno-anticorpo; IEF = isoeletrofocalização.

\* Frequências calculadas a partir dos dados fornecidos pelos autores.

Tabela 7. Frequências dos fenótipos do loco PI em diversas amostras asiáticas (em %).

Países	Amostras	Referências	Técnicas <sup>+</sup>	N	Fenótipos										
					MM	MS	MZ	MF	MI	SS	SF	ZZ	FF	MX	
Ásia	Marinheiros	FAGERHOL & TENFJORD (1968)	EG	68	100,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Coréia	Mulheres	KELLERMANN & WALTER (1970)	EG e EC	90	98,89	-	-	-	-	-	-	1,10	-	-	
Malásia	Doadores	LIE-INJO e cols. (1978)	EG e EC	908	95,90	2,50	-	-	-	0,20	-	-	-	1,30	
China	Doadores	LIE-INJO e cols. (1978)	EG e EC	371	96,20	3,80	-	-	-	-	-	-	-	-	
Índia	Doadores	LIE-INJO e cols. (1978)	EG e EC	231	95,20	4,80	-	-	-	-	-	-	-	-	
Índia	Brahmanes	KELLERMANN & WALTER (1970)	EG e EC	430	99,06	-	0,69	-	-	-	-	0,23	-	-	
Irã	-	KELLERMANN & WALTER (1970)	EG e EC	271	80,44	2,58	2,21	10,33	0,73	0,36	1,11	1,11	1,11	-	
Paquistão	-	KELLERMANN & WALTER (1970)	EG e EC	53	92,45	-	1,89	3,77	-	-	-	-	1,89	-	
Japão	Ainu	HARADA & OMOTO (1970)	EG e EC	238	95,80	0,40	-	3,80	-	-	-	-	-	-	
Japão	-	HARADA & OMOTO (1970)	EG e EC	965	96,80	0,50	-	2,50	-	-	-	-	0,10	0,10	

+ EG = eletroforese em gel de amido ácido; EC = eletroforese cruzada antígeno-anticorpo.

Tabela 8. Frequências dos alelos do loco PI em várias amostras europeias (em %).

Países	Referências	N	<u>M</u>	<u>S</u>	<u>Z</u>	<u>F</u>	<u>I</u>	<u>V</u>	<u>P</u>	<u>W</u>	<u>E</u>	<u>X</u>	<u>G</u>	<u>L</u>
Portugal	FAGERHOL & TENFJORD (1968)	39	85,90	14,10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Portugal	MARTIN e cols. (1976)	330	86,51	11,52	1,82	-	0,15	-	-	-	-	-	-	-
Espanha	FAGERHOL & TENFJORD (1968)	378	86,64	11,24	1,19	0,26	0,13	0,26	-	0,26	-	-	-	-
Espanha*	GOEDDE e cols. (1973)	576	88,11	11,37	0,52	-	-	-	-	-	-	-	-	-
França	ARNAUD e cols. (1977)	1.653	90,19	7,13	1,42	0,36	0,36	0,24	0,09	-	0,06	0,06	0,003	0,003
Itália	PIANTELLI e cols. (1978)	500	91,10	6,70	1,50	0,40	0,20	0,10	-	-	-	-	-	-
Itália	KLASEN e cols. (1978)	202	95,05	2,97	0,99	0,74	0,25	-	-	-	-	-	-	-
Grécia	KELLERMANN & WALTER (1970)	400	95,87	0,25	1,62	1,25	0,62	0,12	0,12	0,12	-	-	-	-
Grécia*	FETARKIS e cols. (1974)	504	96,02	2,88	0,30	0,60	-	0,20	-	-	-	-	-	-
Alemanha	KELLERMANN & WALTER (1970)	516	87,89	2,13	0,87	9,01	0,10	-	-	-	-	-	-	-
Alemanha	GOEDDE e cols. (1970)	262	96,75	2,29	0,95	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hungria	KELLERMANN & WALTER (1970)	172	89,24	1,74	1,45	6,98	0,29	0,29	-	-	-	-	-	-
Irlanda do Norte	BLUNDELL e cols. (1975)	1.000	93,65	3,85	2,00	0,15	0,30	-	-	-	-	-	-	-
Reino Unido*	COOK e cols. (1975)	4.544	94,15	4,50	0,95	0,35	-	0,04	-	-	-	0,01	-	-
Islândia*	FAGERHOL e cols. (1969)	450	99,56	0,44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Islândia	KELLERMANN & WALTER (1970)	94	87,23	1,06	-	11,70	-	-	-	-	-	-	-	-
Noruega	FAGERHOL (1967)	2.830	94,63	2,30	1,57	1,33	0,12	0,004	-	-	-	-	-	-
Finlândia (lapões)*	FAGERHOL e cols. (1969)	468	99,57	0,32	0,11	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Finlândia	FAGERHOL e cols. (1969)	223	99,55	-	0,45	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Europa (exceto Portugal, Espanha e Noruega)	FAGERHOL & TENFJORD (1968)	186	96,50	2,69	-	-	0,27	-	-	-	-	-	-	-

\* Frequências calculadas com base nos dados fornecidos pelos autores.

Tabela 9. Frequências dos alelos do loco PI em três amostras americanas (em %).

Países	Referências	N	<u>M</u>	<u>S</u>	<u>Z</u>	<u>F</u>	<u>I</u>	<u>V</u>	<u>X</u>
Estados Unidos	PIERCE e cols. (1975)	2.285	94,98	3,41	1,16	0,22	0,11	0,11	-
Estados Unidos	HARADA & OMOTO (1970)	261	95,20	1,70	-	2,9	-	-	0,20
América Latina	FAGERHOL & TENFJORD (1968)	26	94,23	5,77	-	-	-	-	-

Tabela 10. Frequências dos alelos do loco PI em três amostras africanas (em %).

<u>Países</u>	<u>Referências</u>	<u>N</u>	<u>M</u>	<u>S</u>	<u>Z</u>	<u>F</u>	<u>I</u>	<u>L</u>	<u>V</u>
Moçambique	KELLERMANN & WALTER (1970)	274	98,18	0,18	-	1,64	-	-	-
Zaire	VANDEVILLE e cols. (1974)	132	96,97	-	-	-	-	2,65	0,38
Somália	MASSI & VECCHIO (1977)	347	96,68	1,44	0,72	0,43	0,14	-	-

Tabela 11. Frequências dos alelos do loco PI em várias amostras asiáticas (em %).

<u>Países</u>	<u>Referências</u>	<u>N</u>	<u>M</u>	<u>S</u>	<u>Z</u>	<u>E</u>	<u>I</u>	<u>X</u>
Ásia	FAGERHOL & TENFJORD (1968)	68	100,00	-	-	-	-	-
Coréia	KELLERMANN & WALTER (1970)	90	98,89	-	1,11	-	-	-
Malásia	LIE-INJO e cols. (1978)	908	97,90	1,50	-	-	-	0,70
China	LIE-INJO e cols. (1978)	371	98,10	1,90	-	-	-	-
Índia	LIE-INJO e cols. (1978)	231	97,60	2,40	-	-	-	-
Índia	KELLERMANN & WALTER (1970)	430	99,42	-	0,58	-	-	-
Irã	KELLERMANN & WALTER (1970)	271	88,38	2,21	2,21	6,82	0,37	-
Paquistão	KELLERMANN & WALTER (1970)	53	95,28	-	0,94	3,77	-	-
Japão (Ainu)	HARADA & OMOTO (1970)	230	97,90	0,20	-	1,90	-	-
Japão	HARADA & OMOTO (1970)	965	98,30	0,30	-	1,40	-	0,25

ga (1,33%) em direção à península Ibérica (de 0,26 a 0%). Os dados obtidos por KELLERMANN & WALTER (1970) apresentam uma alta frequência do alelo F, alterando esse gradiente. Uma explicação para isso, é dada por FAGERHOL (1972) que sugere serem os indivíduos classificados como FF e FM, na realidade de genótipo MM. Os falsos resultados seriam originados da contaminação do soro ou de problemas de estocagem. Essa afirmação é reforçada pelos resultados do trabalho de GOEDDE e cols. (1970), onde não foi encontrado nenhum indivíduo FM, entre 262 alemães, em contraste com os 74 FM, entre 516 alemães, descritos por KELLERMANN & WALTER (1970).

O alelo Z, cuja importância clínica será discutida no capítulo VI, varia de 0 (em várias amostras) até um máximo de 2,21% no Irã. Na Europa, a frequência mais alta foi verificada na Irlanda do Norte (2%) e, na África, foi registrada na Somália (0,72%). Nos EUA, a frequência de cerca de 1,16% relatada por PIERCE e cols. (1975), em vista do grande tamanho da amostra, deve ser mais representativa do que a apresentada por HARADA & OMOTO (1970).

Poucos trabalhos foram realizados sobre frequências gênicas e fenotípicas dos subtipos de M. Os resultados de alguns trabalhos, que consideraram os 6 fenótipos, foram reunidos nas Tabelas 12 e 13. A Tabela 12 refere-se às frequências fenotípicas e a Tabela 13, às frequências gênicas.

Podemos observar que o alelo M1 é o mais freqüente em todas as populações estudadas e que seu mais alto valor foi encontrado na amostra africana (93%). Nessa amostra, podemos

Tabela 12. Frequências dos fenótipos do sistema PI, em algumas amostras, em que foram considerados os subtipos de M (em %).

País	Amostras	Referências	Técnicas <sup>φ</sup>	N	Fenótipos																			
					M1	M2	M3	M1M2	M1M3	M2M3	M1S	M2S	M3S	M1Z	M3Z	M1I	M3I	M1P	M1L	M1V	SS	M2Z	SS	
Áustria*	-	GENZ e cols. (1977)	IEF	538	58,20	0,60	2,00	7,40	20,60	3,50	2,60	0,40	0,70	2,00	0,40	0,40	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,40	-	-
Áustria <sup>+</sup>	Marburg	CLEVE e cols. (1979)	IEF	146	43,20	1,40	1,40	15,80	25,30	2,70	4,80	0,70	-	2,70	-	-	-	0,70	0,70	-	0,70	-	-	
Áustria <sup>+</sup>	Munique	CLEVE e cols. (1979)	IEF	264	56,80	0,40	0,80	12,50	22,70	2,30	3,80	-	0,40	-	0,40	-	-	-	-	-	-	-	-	
Índia	-	FRANTS & ERIKSSON (1978)	IEF	136	62,50	2,20	-	16,90	13,20	2,90	-	-	-	2,20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Índia	Parturientes e membros do laboratório	FRANTS & ERIKSSON (1978)	IEF	131	58,00	0,80	3,10	6,90	16,80	1,50	6,90	-	0,80	3,10	0,80	-	-	-	-	-	-	-	0,80	0,80
Índia	Pescadores de Mali	FRANTS & ERIKSSON (1978)	IEF	102	87,30	-	-	6,90	4,90	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,00	-

F = isoeletofofocalização.

autores denominaram M1 como Ma, M2 como Mb e M3 como Mc.

autores denominaram M2 como M3 e M3 como M2.

Tabela 13. Freqüências dos alelos do sistema PI, em algumas amostras em que foram considerados os subtipos de M (em %).

Países	Referências	N	<u>M1</u>	<u>M2</u>	<u>M3</u>	<u>S</u>	<u>Z</u>	<u>PI*</u>
Alemanha	GENZ e cols. (1977)	538	75,00	6,23	14,77	2,23	1,21	0,56
Alemanha (Marburg)	CLEVE e cols. (1979)	146	68,15	10,96	15,41	3,42	1,37	0,68
Alemanha (Munique)	CLEVE e cols. (1979)	264	76,33	7,77	13,64	2,08	0,19	-
Finlândia	FRANTS & ERIKSSON (1978)	136	79,00	12,00	8,00	-	1,00	-
Holanda	FRANTS & ERIKSSON (1978)	131	75,00	5,00	13,00	4,00	3,00	-
África	FRANTS & ERIKSSON (1978)	102	93,00	4,00	2,00	-	1,00	-

\* Alelos raros.

verificar que o alelo M3 é relativamente raro, e que o M2 apresenta uma frequência menor que nas populações caucasóides, até agora estudadas.

Para uma melhor avaliação das frequências dos subtipos de M, há a necessidade da realização de mais trabalhos, principalmente, entre as populações não caucasóides.

## VI - ALFA-1-ANTITRIPSINA E ASSOCIAÇÃO COM DOENÇAS

Após os primeiros estudos realizados por LAURELL & ERIKSSON (1963), que indicaram a existência de uma associação entre a deficiência de A-1-AT e enfisema pulmonar, muitos trabalhos começaram a ser realizados visando a um melhor delineamento desta relação, bem como a descobrir a maneira pela qual a deficiência de A-1-AT provocava o aparecimento desta doença. Subseqüentemente, outras doenças também se mostraram associadas à deficiência de A-1-AT, entre as quais podemos citar: hepatite neonatal, cirrose hepática, artrite reumatóide, mieloma e linfoma.

Nesse capítulo, abordaremos essas diversas doenças relacionando-as com a deficiência de A-1-AT.

### 1. Doenças Pulmonares Obstrutivas Crônicas

#### 1.1. Patogênese

ERIKSSON (1965) e KUEPPERS & BEARN (1966a) levantaram a hipótese de que as proteases dos macrófagos e granulócitos, quando insuficientemente inativadas na deficiência de A-1-AT, podem ser responsáveis por danos nos tecidos. Em reforço a es-

sa hipótese, podemos citar os experimentos de MARCO e cols. (1971), que produziram, em cães, um padrão de enfisema semelhante ao do homem, após instilações intra-traqueais de homogenizados de leucócitos. Anteriormente, KUEPPERS & BEARN (1966a) mostraram que a A-1-AT pode inibir proteases dos leucócitos. OHLSSON (1971) demonstrou a formação de um complexo entre a A-1-AT e elastases e colagenases dos granulócitos. Além disso, observações feitas por GALDSTON e cols. (1972; segundo KUEPPERS & BLACK, 1974) vieram reforçar as conclusões desses trabalhos. Esses autores relataram que pacientes com enfisema, em que a deficiência de A-1-AT era acrescida de baixa atividade de leucoproteases específicas, apresentavam um prognóstico clínico mais favorável do que os pacientes com alta atividade de leucoproteases.

O aparecimento das lesões pulmonares pode ser explicado como decorrente da filtração dos granulócitos pelos capilares pulmonares. Esse processo de filtração é considerado como contínuo e normal (HEINEMAN & FISHMAN, 1969). No entanto, WILSON e cols. (1971) encontraram evidências microscópicas de que granulócitos filtrados podem causar lesões nos capilares da membrana pulmonar, provavelmente devido à ação de suas proteases. Segundo WELCH e cols. (1969), esse processo leva a um desenvolvimento acelerado das doenças pulmonares obstrutivas crônicas (DPOC), quando ocorre deficiência de A-1-AT. De acordo com KUEPPERS & BLACK (1974), a perfusão e o conseqüente aumento na filtração de granulócitos é maior nos lobos inferiores do pulmão, onde ocorre maior extensão de destruição de tecido.

De acordo ainda com KUEPPERS & BLACK (1974), o desequilíbrio entre proteases e seus inibidores também pode ocorrer quando a concentração de proteases está aumentada, a tal ponto, que mesmo concentrações normais dos inibidores não são suficientes para evitar a digestão do tecido pulmonar.

## 1.2. Associação entre a deficiência de A-1-AT e DPOC

As primeiras observações, que indicavam associação entre o homozigoto ZZ e DPOC, especialmente com o enfisema pulmonar, foram feitas por LAURELL & ERIKSSON (1963). A partir de então, as manifestações patológicas associadas à deficiência de A-1-AT foram estudadas com relação ao alelo Z. ERIKSSON (1965) descreveu essa associação em um grande número de pacientes, mostrando que a maioria desses indivíduos apresentava os primeiros sintomas da doença quando ainda jovens. O aparecimento dos sintomas ocorria antes dos 40 anos, em 60% dos casos, e abaixo dos 50 anos, em 90% dos pacientes. Nesse mesmo trabalho, ERIKSSON (1965), estudando um grupo de 33 pacientes (17 homens e 16 mulheres) com grave deficiência de A-1-AT, encontrou evidências bem precisas de DPOC em 23 pacientes (15 homens e 8 mulheres). Uma série de trabalhos subseqüentes, na Europa e nos EUA, confirmou a associação do fenótipo ZZ com DPOC. Além disso, foram descritos casos de crianças com enfisema pulmonar associada à deficiência de A-1-AT (TALAMO e cols., 1971; GLASGOW e cols., 1973; HOUŠTEK e cols., 1973).

Com relação à precocidade no aparecimento de DPOC nos

indivíduos deficientes de A-1-AT, os resultados são conflitantes. Apenas alguns trabalhos encontraram evidências de uma manifestação precoce. No estudo de ERIKSSON (1965) todos os homens e 2/3 das mulheres com mais de 40 anos de idade apresentavam evidências de DPOC. Já GANROT e cols. (1967), realizando um trabalho com 50 indivíduos deficientes de A-1-AT, encontraram 5 pacientes com mais de 50 anos de idade que não apresentavam nenhum sinal de DPOC. FAGERHOL & LAURELL (1970) relataram 26 pacientes com fenótipo Z, que não apresentavam manifestação de enfisema, sendo que 12 deles tinham idade acima de 50 anos.

Estudos de muitos grupos de pacientes com DPOC mostraram que a proporção de deficientes de A-1-AT, nesses grupos, é maior do que na população em geral. A frequência dos indivíduos ZZ, entre pacientes com DPOC, variou desde um mínimo de 1 a 2% na Escandinávia (ERIKSSON, 1965; FAGERHOL & HAUGE, 1969; VARPELA & SARIS, 1971) e na França (VIDAL e cols., 1970), até um máximo de 25%, na Califórnia (LIEBERMAN, 1969).

De acordo com FAGERHOL (1972), uma vez que certos indivíduos ZZ podem alcançar a idade de 70 anos, ou mais, sem apresentarem sinais clínicos, deve-se admitir que outros fatores (genéticos e/ou ambientais), somando-se ao baixo nível de A-1-AT, devem ser necessários para o aparecimento de sinais clínicos de enfisema. O cigarro é geralmente considerado como um fator predisponente importante, no desenvolvimento da bronquite crônica e do enfisema. Com a finalidade de obter informações sobre o efeito do fumo, em pessoas com fenótipo Z, KUEPERS & BLACK (1974) reuniram dados da literatura sobre 84 casos

de fumantes e 30, de não fumantes, visando a uma série de comparações. No grupo dos fumantes, a proporção de homens para mulheres foi de 2,5:1, em contraste com a dos não fumantes de 1:1. Segundo KUEPPERS & BLACK (1974), as diferenças nas proporções sexuais poderiam ser explicadas pelos seguintes fatores: 1) maior incidência de fumantes entre os homens, 2) maior susceptibilidade masculina para o desenvolvimento de enfisema, devida a outros fatores, 3) maior probabilidade de diagnosticar enfisema no homem, devida a uma maior preocupação dos médicos, neste sentido. Se o primeiro fator fosse correto, o número esperado de mulheres deveria ser maior do que o de homens, entre os homozigotos não fumantes. Isto não foi encontrado. Em reforço à segunda causa, KUEPPERS & BLACK (1974) ainda apresentam os seguintes dados: entre 497 pacientes com DPOC averiguados durante um certo período, sem outro tipo de seleção, 126 eram mulheres e 371 eram homens; entre as mulheres, 11 (8,7%) possuíam o fenótipo Z, enquanto entre os homens, apenas 10 (2,7%), apresentavam este fenótipo. Esses dados levam à conclusão de que outros fatores, como o fumo, além da simples deficiência de A-1-AT, originam o enfisema, no homem. Ainda no estudo de KUEPPERS & BLACK (1974), foi verificado que o aparecimento de dispnéia ocorria, em média, aos 35 anos nos fumantes. Nos não fumantes, ocorria cerca de uma década depois. Sintomas de bronquite crônica foram encontrados em 62% dos pacientes fumantes e em, apenas, 27% dos não fumantes. Esses e outros dados, obtidos com testes de funcionamento pulmonar, radiografias, etc., levaram KUEPPERS & BLACK (1974) a sugerir que o fumo é um verdadeiro

perigo para pessoas com deficiência de A-1-AT. Sintomas de alterações pulmonares, anormalidades no funcionamento pulmonar e morte por falhas respiratórias ocorrem muito mais cedo em fumantes do que em não fumantes.

Os estudos sobre a associação entre DPOC e fenótipos heterozigotos para o alelo Z mostram resultados controvertidos. Alguns autores encontraram maior prevalência de heterozigotos nas amostras de DPOC por eles estudadas, enquanto para outros o aumento não foi significativo. LIEBERMAN e cols. (1969) encontraram num total de 116 pacientes com DPOC, 21 heterozigotos (18%), enquanto que apenas 13 heterozigotos (4,7%) foram detectados em 277 controles sadios. KUEPPERS e cols. (1969) encontraram, num grupo de 98 pacientes, uma frequência de 25,5% de heterozigotos (25 indivíduos), sendo que no grupo controle, constituído por 188 doadores de sangue, essa frequência foi de 11,7% (22 indivíduos). Por outro lado, WELCH e cols. (1969), estudando um grupo de 146 pacientes com doenças pulmonares, encontraram 17 indivíduos com níveis intermediários de A-1-AT, enquanto que, em 51 controles apareceram 3 indivíduos com valores intermediários. Nesse caso, a frequência de indivíduos intermediários, não é diferente nos dois grupos. Podemos citar, ainda, como tendo encontrado maior prevalência de heterozigotos, os seguintes autores: MITTMAN e cols. (1973), MITTMAN e cols. (1974), KUEPPERS & DONHARDT (1974), BARNETT e cols. (1975), COX e cols. (1976), LARSON e cols. (1976). Entre aqueles que não encontraram um aumento significativo de heterozigotos, temos: SHIGEOKA e cols. (1976), COLE e cols. (1976),

GELB e cols. (1977), KOZAREVIC e cols. (1978), GERBLICH e cols. (1978).

Como se pode observar, existe uma grande controvérsia quanto aos riscos dos indivíduos, com concentrações intermediárias de A-1-AT, em desenvolver DPOC. Os resultados de vários estudos dos níveis de A-1-AT, em pacientes com DPOC, foram contraditórios. Uma das razões é a heterogeneidade das amostras de indivíduos com concentrações intermediárias. Nessas amostras, estão incluídos indivíduos de fenótipos MS, SZ, MZ e até alguns do tipo M, os quais possuem susceptibilidade diferentes para desenvolverem DPOC. Aparentemente, o tipo de A-1-AT, e não apenas a sua concentração, é também importante na predisposição para DPOC. Os indivíduos com genótipo MM e que, eventualmente, apresentam uma pequena redução na concentração de A-1-AT, provavelmente possuem capacidade de aumentar sua concentração durante infecções, quando uma quantidade maior de A-1-AT é necessária para proteger os pulmões de proteólise. Segundo KUEPPERS (1968) e LIEBERMAN & MITTMAN (1973), o gene Z não consegue, aparentemente, responder aos estímulos de aumento de produção de A-1-AT. Assim, os trabalhos que estudaram apenas a concentração de A-1-AT, sem a devida determinação fenotípica, são falhos no que concerne a concluir sobre predisposição para DPOC.

Os trabalhos, em que os fenótipos de A-1-AT são determinados qualitativamente, também não foram suficientes para eliminar essa controvérsia. Segundo COX e cols. (1976), as estimativas de risco relativo, quanto ao desenvolvimento de DPOC, em indivíduos MZ, variam em diferentes estudos. Esses autores re-

latam que para FAGERHOL & HAUGE (1969), esse risco é igual ao dos controles. Em alguns estudos é considerado ligeiramente aumentado (KUEPPERS e cols., 1969; TALAMO e cols., 1972) e, em outros, chega a ser um risco bem definido (MITTMAN e cols., 1973; MITTMAN e cols., 1974; KUEPPERS & DONHARDT, 1974; BARNETT e cols., 1975). As diferenças encontradas, entre os vários trabalhos, parecem ser devidas a vários fatores. Em primeiro lugar, citam-se problemas de amostragem, tais como: amostras muito pequenas, diferenças nos critérios de seleção dos grupos de pacientes e distorções na seleção dos controles. Em segundo lugar, diferenças nos fatores ambientais (poluição do ar, clima, fumo) podem contribuir para que se encontrem resultados diferentes. Finalmente, encontramos a variabilidade na composição genética individual, no que se refere à determinação das proteases leucocitárias e que pode alterar a incidência de DPOC, em indivíduos com o fenótipo MZ (GALDSTON e cols., 1973).

É importante que se cite, ainda, os trabalhos de VIDAL e cols. (1970) e de MITTMAN & LIEBERMAN (1972), que encontraram os tipos SS, MS, e FZ associados com DPOC, bem como o trabalho de FETARKIS e cols. (1977) que encontraram indicações de níveis séricos de A-1-AT significativamente menores, em indivíduos com tuberculose pulmonar.

## 2. Hepatite Neonatal e Cirrose Hepática

As anomalias hepáticas, associadas com a deficiência de A-1-AT, se apresentam quase sempre como um processo evolutivo.

Segundo KUEPPERS & BLACK (1974), a doença começa durante os primeiros anos de vida, como hepatite, com hepatoesplenomegalia e elevação nos níveis de bilirrubina, fosfatase alcalina e transaminases do soro. Durante os 6 meses seguintes, o teor de bilirrubina volta ao normal e as concentrações séricas de fosfatase alcalina, transaminases, colesterol e triglicerídeos são moderadamente elevadas. Nesse estágio, apresentam-se características histológicas de colestase e fibrose periportal. Gradualmente, a partir desse ponto, ocorre a cirrose do fígado.

O primeiro trabalho, referente à associação de uma deficiência de A-1-AT com patologia hepática, foi realizado por SHARP e cols. (1969). Esses autores encontraram crianças com o fenótipo Z, que apresentavam hepatite ou cirrose hepática e demonstraram, através de um estudo familiar, que um padrão de herança do tipo autossômico recessivo era responsável pela deficiência de A-1-AT, nessas famílias. GANS e cols. (1969) descreveram crianças deficientes de A-1-AT, com quadro clínico de icterícia neonatal, em evolução para cirrose. Essas crianças apresentavam, nos primeiros dias de vida, icterícia do tipo obstrutivo que se prolongava por semanas e desaparecia abruptamente. Após alguns anos, o quadro clínico e laboratorial de cirrose se estabelecia.

JOHNSON & ALPER (1970) descreveram quatro crianças com diagnóstico de hepatite neonatal e deficiência de A-1-AT. Duas dessas crianças evoluíram sem sintomas, até cerca de dois anos, desenvolvendo, mais tarde, cirrose hepática. AAGENAES e cols. (1972) descreveram cinco recém-nascidos com colestase neonatal,

de etiologia desconhecida, que revelaram deficiência acentuada de A-1-AT. PORTER e cols. (1972) relataram cinco casos de hepatite neonatal com deficiência de A-1-AT, que apresentaram regressão do quadro colestático, por volta dos 6 meses. Entretanto, uma biópsia hepática mostrou alterações compatíveis com cirrose.

GLASGOW e cols. (1973) relataram casos de associação de cirrose familiar infantil, enfisema pan-acinar e deficiência de A-1-AT. Os indivíduos estudados eram três irmãos com fenótipo Z. Um deles era normal e os outros dois desenvolveram icterícia do tipo colestático, com início nos primeiros dias de vida e término em torno do 7º mês. Ambos evoluíram para cirrose, em uma fase posterior, sendo que um dos pacientes apresentou, aos 6 anos, um quadro de enfisema pan-acinar, tendo falecido aos 11 anos, após hemorragia intraperitoneal. O outro evoluiu para um quadro de cirrose e alterações pulmonares leves.

Uma série de trabalhos, que relatam casos de cirrose hepática, em adultos deficientes de A-1-AT, já foi publicada. Entre 50 homozigotos ZZ descritos por GANROT e cols. (1967), dois morreram de cirrose hepática e um morreu de carcinoma no fígado. Podemos citar ainda os trabalhos de GHERARDI (1971), ISHAK e cols. (1972), COHEN e cols. (1973), que registram a associação da deficiência de A-1-AT com cirrose hepática, em adultos. Fibrose periportal também foi mencionada em pacientes desse tipo, por MILLER & KUSCHNER (1969), DeLELLIS e cols., (1972) e por GORDON e cols. (1972). BERG & ERIKSSON (1972) revendo autópsias de 13 homozigotos ZZ com DPOC, encontraram

cirrose hepática, em cinco casos e fibrose periportal, em outros 3. Três, entre os oito pacientes, que apresentavam modificações patológicas no fígado, apresentavam hepatomas.

No trabalho de COHEN e cols. (1973), em que se mostra associação da cirrose hepática com deficiência de A-1-AT em adultos, aparece um caso com cirrose hepática e enfisema pulmonar.

SHARP (1971; segundo LIEBERMAN e cols., 1972c) estudando o fígado cirrótico de crianças com deficiências de A-1-AT, evidenciaram, por microscopia eletrônica, a presença de material amorfo, no retículo endoplasmático dos hepatócitos, principalmente, na região periportal. Esse material mostrava-se PAS positivo, após digestão pela diastase, sendo antigenicamente relacionado com A-1-AT. LIEBERMAN e cols. (1972c) estudando indivíduos portadores de enfisema familiar com deficiência de A-1-AT, sem patologia hepática, demonstraram, no citoplasma dos hepatócitos, a presença de glóbulos circundados por uma membrana, medindo de 1 a 20 micra. Esses corpúsculos demonstraram ser eosinofílicos, quando corados pela hematoxilina-eosina, e fortemente PAS positivos, após digestão pela diastase. Testes histoquímicos revelaram que sua composição era glicoproteica. A aplicação de soro anti-A-1-AT humana, conjugado com fluoresceína, revelou, no tecido hepático, estruturas positivamente coradas e correspondendo em forma, tamanho e localização, aos glóbulos descritos através do uso de microscopia eletrônica. Assim, os baixos níveis de A-1-AT no soro e seu excesso no fígado, levou LIEBERMAN e cols. (1972c) a concluir como devidos

a uma falha no mecanismo de transporte de A-1-AT, uma vez que a molécula variante é incapaz de atravessar as membranas celulares. Baseando-se nesses dados, AAGENAES e cols. (1972) sugeriram que o excesso de A-1-AT, dentro dos hepatócitos, é por si só de efeito hepatotóxico. Entretanto, é preciso salientar que LIEBERMAN e cols. (1972c) encontraram inclusões globulares também nos hepatócitos de indivíduos sem qualquer doença no fígado (enfisematosos e normais). No trabalho realizado por DELLELLIS e cols. (1972), esses autores concluíram que a doença hepática parece se originar apenas após uma severa exposição a agentes hepatotóxicos. É discutido o papel do antígeno Austrália como fator hepatotóxico. PORTER e cols. (1972) encontraram uma alta incidência de casos de deficientes de A-1-AT com hepatite neonatal, que apresentavam antígeno Austrália, que é transmitido para o feto nas famílias com cirrose. Já os dados de AAGENAES e cols. (1972) e WARD & UNDERWOOD (1974) foram consistentes quanto à ausência de Antígeno Austrália nos pacientes por eles estudados, que apresentavam doenças hepáticas associadas com deficiência de A-1-AT.

Um maior número de estudos será necessário para que se esclareçam os fatores desencadeantes das doenças hepáticas, nos indivíduos com fenótipo Z. Os trabalhos até agora realizados, não esclarecem definitivamente essa questão. Além das inclusões citoplasmáticas de A-1-AT no fígado, outros fatores predisponentes de hepatopatias devem ser necessários. Essa conclusão é óbvia, em base do fato dessas inclusões estarem presentes, em heterozigotos e homozigotos para a deficiência de A-1-AT, inde-

pendentemente da doença hepática. Fica em aberto, a questão da importância do antígeno Austrália, de outros elementos tóxicos para os hepatócitos e de modificadores genéticos, como fatores desencadeantes.

### 3. Outras doenças

Com relação à associação da deficiência de A-1-AT com artrite reumatóide, foram realizados alguns trabalhos, tendo seus autores encontrado resultados contraditórios.

Em 1976, COX & HUBER encontraram um aumento na prevalência dos fenótipos MZ (5,5%) e SZ (3,6%), em 55 adultos, britânicos com artrite reumatóide quando comparados com 512 doadores de sangue sadios. As frequências desses fenótipos encontradas na amostra controle foi, respectivamente, de 2,0% e 0%. SJÖBLÖM & WOLHEIM (1977) encontraram uma frequência de 5% de indivíduos MZ e 2,5% de MS, em 320 suecos com artrite reumatóide, sendo que estas frequências não diferiam significativamente daquelas correspondentes nas amostras controles. Para a comparação da frequência de indivíduos MZ, estes autores consideraram uma amostra de 1.100 homens, com 50 anos de idade, moradores da cidade de Malmö, onde a frequência desse fenótipo era de 3,8%. Como a frequência de indivíduos MS não havia sido determinada na população de Malmö, os autores utilizaram, como controle, a amostra de FAGERHOL (1968), onde se encontrou uma frequência de 4,1% de indivíduos MS. BRACKERTZ & KUEPPERS (1977) encontraram 5% de indivíduos MS e nenhum MZ entre 95 pacientes suíços,

tendo concluído que essas frequências não diferiam significativamente daquelas da população controle. Em contraste, BUISSERET e cols. (1977) encontraram um aumento significativo na frequência do fenótipo MZ (12,8%) entre 94 pacientes britânicos, em comparação com a amostra controle de 200 indivíduos, que apresentou uma frequência de indivíduos MZ igual a 1%. ARNAUD e cols. (1979), estudando 69 adultos britânicos, encontraram um aumento significativo na frequência de indivíduos MZ (8,7%) e ZZ (1,4%), em relação ao grupo controle. Esse grupo constituído por 926 doadores de sangue apresentou uma frequência de indivíduos MZ igual a 4,1% e de indivíduos ZZ igual a 0,11%.

Segundo COX & HUBER (1976), a associação entre indivíduos com deficiência de A-1-AT e artrite reumatóide seria devida a um aumento pronunciado na destruição de tecido durante o processo inflamatório crônico. Todos os adultos estudados por essas autoras apresentavam deformações nas juntas, indicando enfermidade grave. A elastase e outras enzimas proteolíticas dos leucócitos, liberadas no líquido sinovial, atacam as cartilagens das juntas (JANOFF & BLONDIN, 1970). Quantidades reduzidas de A-1-AT, que é o maior inibidor de elastase, podem intensificar a destruição das cartilagens. Dessa forma, a deficiência de A-1-AT poderia estar associada com a maior gravidade da doença.

ANANTHAKRISHNAN e cols. (1979), estudando 30 pacientes com mieloma múltiplo e 3 com linfoma, encontraram um aumento na frequência de indivíduos MZ, quando comparada com a amostra

controle. ANANTHAKRISHNAN e cols. (1979), considerando que as enzimas proteolíticas aceleram a reprodução celular, sugerem que indivíduos com uma concentração muito baixa de inibidor de proteases, devem apresentar um aumento na proliferação das células, levando a originar tumores. De acordo com essa sugestão, seria de se esperar um aumento na frequência de homozigotos ZZ, entre os pacientes com câncer. Esses autores consideram que a probabilidade de se constatar esse fenômeno reduz-se, entretanto, em vista dos homozigotos ZZ morrerem por hepatite neonatal e DPOC, antes de desenvolverem câncer.

## VII - DISTÚRBIOS NA SEGREGAÇÃO E NA FERTILIZAÇÃO

Nesse capítulo, serão considerados os variantes da alfa-1-antitripsina quanto ao seu relacionamento com aberrações cromossômicas e quanto à sua transmissão diferencial.

### 1. Alfa-1-antitripsina e aberrações cromossômicas

AARSKOG & FAGERHOL (1970) examinaram os fenótipos do sistema PI, em 32 famílias norueguesas, em que haviam sido encontradas aberrações cromossômicas. Foram observados fenótipos diferentes do mais comum (M), no paciente e/ou nos pais desses, em 5 das 7 famílias com mosaicos para aberrações cromossômicas sexuais. A distribuição desses fenótipos demonstrou ser significativamente diferente daquela da população norueguesa sadia. Mais tarde, KUEPPERS e cols. (1975) também realizaram um estudo com 21 pacientes com mosaicos de aberrações cromossômicas sexuais. Dos 21 pacientes, 16 apresentavam o fenótipo usual M, 3 eram MS, 1 era MF e outro, MZ. Entre as 18 mães examinadas, 14 apresentavam o fenótipo M, 2 eram MS e 2, MF. No caso dos pais, 11 foram examinados quanto à A-1-AT, sendo 8 de fenótipo M, 1 MF e 2, MZ. A proporção de heterozigotos,

no grupo dos pais, foi significativamente maior que a encontrada nos grupos controles. FINNEMAN e cols. (1976) encontraram, em 19 indivíduos com mosaicos de aberrações cromossômicas sexuais, 3 com fenótipos heterozigotos para A-1-AT. Esses mesmos autores, ao reunirem seus dados com os dos dois outros trabalhos, acima mencionados, encontraram uma frequência de heterozigotos, significativamente maior que a esperada, entre os indivíduos com mosaicos de aberrações cromossômicas sexuais.

Além disso, esses autores estudaram os fenótipos da A-1-AT, em pacientes que apresentavam trissomia do cromossomo 21. Os pacientes foram divididos em dois grupos, tendo-se em vista a influência da idade materna na incidência da síndrome de Down. O primeiro grupo (29 pacientes) incluía casos com mães de menos de 30 anos de idade, por ocasião do parto, e o segundo (31 pacientes), com mais de 35 anos. Foram encontrados 2 heterozigotos no primeiro grupo e 14, no segundo. A frequência de heterozigotos, nos dois grupos, foi significativamente maior que na população em geral. Entretanto, verificou-se que esses grupos eram significativamente diferentes entre si. Quando considerados isoladamente, apenas o segundo grupo apresentava um aumento significativo, na frequência de heterozigotos. Dessa forma, o trabalho sugere que exista uma associação entre a trissomia do cromossomo 21 e os alelos variantes da alfa-1-antitripsina, em indivíduos que nasceram de mães com mais de 35 anos.

Quanto à relação da associação entre os variantes de A-1-AT e a síndrome de Down, são necessários novos estudos que

possam explicar o modo pelo qual a idade materna e a diminuição da A-1-AT interagem como fatores etiológicos.

Quanto aos mosaicos de aberrações cromossômicas sexuais, procuraremos dar a explicação aventada por AARSKOG & FAGERHOL (1970). Sabe-se que os mosaicos, geralmente, aparecem a partir de erros nas primeiras divisões mitóticas, após a fertilização. São, assim, explicados como resultantes da não disjunção. No caso dos mosaicos de aberrações cromossômicas sexuais, a origem pode se dar mais especificamente, por atraso na anáfase. O atraso na anáfase é considerado, uma vez que os cromossomos sexuais tendem a estar entre os últimos que atingem os polos, durante os movimentos anafásicos. Ocasionalmente, um cromossomo se atrasa, de tal modo, que a placa celular se fecha entre os dois polos, antes que ele consiga chegar ao seu destino. Como resultado, esse cromossomo pode ser incluído na célula filha errada, ou ser perdido. O aparecimento dos mosaicos 45,X/46,XX e 45,X/46,XY, é melhor explicado pelo atraso na anáfase, com a conseqüente perda de um X ou do Y, respectivamente, durante uma das primeiras divisões mitóticas de um zigoto normal. HAGSTRÖM & LÖNNING (1963) sugerem que as enzimas proteolíticas devem estar relacionadas com o atraso na anáfase. Esses autores mostraram que o ritmo de divisão celular, após a fertilização, é consideravelmente acelerado pela tripsina. Dessa forma, os indivíduos deficientes, com excesso de tripsina não inibida, poderiam apresentar a perda de um cromossomo sexual, devido à rápida formação da membrana entre as células, como conseqüência da maior velocidade na divisão. Por outro lado, a origem de um

mosaico 46,XX/46,XY é explicada pela fertilização dispérmica. A associação entre estes mosaicos e a deficiência de A-1-AT encontra sustentação em estudos experimentais de HAGSTRÖM (1961) e de LÖNNING (1967) que, trabalhando com ovos de ouriços do mar, mostraram a interferência da tripsina e da A-1-AT em vários dos mecanismos que evitam a fertilização por mais de um espermatozóide. Ovos, pré-tratados com altas concentrações de tripsina, mostram, posteriormente, inibição na formação da membrana de fertilização, com tendência à fertilização polispérmica. Podemos fazer uma analogia entre esse fenômeno e o que ocorre nos indivíduos deficientes de A-1-AT. Nesse caso, o excesso de tripsina não inibida poderia levar à fertilização dispérmica e, conseqüentemente, dar origem a mosaicos de aberrações cromossômicas sexuais.

## 2. Transmissão preferencial do variante Z.

CHAPUIS-CELLIER & ARNAUD (1979) estudaram a transmissão do alelo Z, em 68 crianças de 23 famílias, filhas de casais MxMZ. A análise dos fenótipos do sistema PI indicou um número maior de fenótipos MZ, nas crianças estudadas, independentemente do sexo do progenitor heterozigoto. Esse aumento, entretanto, não foi estatisticamente significativo. Em contraste, quando as famílias foram separadas, de acordo com o sexo do progenitor heterozigoto, um aumento significativo, a nível de  $P < 0,01$  foi encontrado apenas naquelas em que o pai possuía o alelo Z. Essas observações levaram esses autores a sugerir uma vantagem

seletiva para os espermatozoides portadores do alelo Z, com relação aos que carregam o M.

No caso dessa sugestão ser verdadeira, surgem novas questões. De que maneira ocorre essa vantagem seletiva ? Quais os fatores que estariam atuando para favorecer o espermatozóide portador do alelo Z ? Em que fase do processo reprodutivo se daria essa vantagem seletiva ? São questões que permanecem ainda sem resposta.

### VIII - RESUMO E CONCLUSÕES

Durante a realização desse trabalho, onde diversos aspectos do sistema da alfa-1-antitripsina foram focalizados, alguns aspectos se apresentaram como de maior importância. Em seguida, procuraremos fazer um resumo, tentando chamar a atenção para os principais pontos abordados:

1. Diferenças quantitativas na A-1-AT do soro foram primeiramente observadas por LAURELL & ERIKSSON (1963). Sendo que essa deficiência segue um padrão de herança mendeliana simples (ERIKSSON, 1964; KUEPPERS e cols., 1964). Em 1965, FAGERHOL & BRAEND concluíram que os 3 alelos por eles evidenciados apresentavam uma relação de codominância. Atualmente, os trabalhos realizados indicam que o sistema da A-1-AT possui cerca de 20 alelos codominantes, pertencentes a um loco localizado em cromossomo autossômico.

2. A maioria dos alelos do sistema PI produz quantidades normais de A-1-AT, no entanto, os alelos Z, S, W, P e I são responsáveis por concentrações menores dessa proteína. O alelo Q0, em homozigose, é responsável pela ausência completa dessa proteína.

3. A ampla distribuição da A-1-AT, bem como sua ampla especificidade, leva à sugestão de um desempenho fisiológico múltiplo. De fato, essa proteína parece exercer papel na coagulação sanguínea, na regulação homeostática das proteinases e no processo de fertilização.

4. A variação da concentração normal da A-1-AT é considerada como sendo de 200 a 400 mg/100ml de soro. Observou-se que o nível da A-1-AT aumenta com infecções, inflamações, desgaste pós-operatório, corticosteróides, anticoncepcionais, vacina contra febre tifóide e durante a gravidez.

5. As estimativas do peso molecular da A-1-AT apresentam uma variação entre 45.000 e 59.900. A proporção de carboidratos dessa proteína parece variar de 12% a 15,9%. As estimativas do total de resíduos de aminoácidos variaram de 360 a 413,2.

6. Estudos físico-químicos demonstraram ser a A-1-AT formada por uma simples cadeia de glicoproteína, sendo surpreendente o fato dessa proteína dar origem a uma série de bandas, quando submetida a eletroforese. Admite-se que esse resultado é devido à diferença no número de resíduos de ácido siálico, por molécula. A origem da variação bioquímica dos variantes ainda não está bem estabelecida. No entanto existem indicações de que o variante Z possui menos ácido siálico do que a proteína M. Essa falta de ácido siálico pode também explicar a acumulação da A-1-AT do tipo Z nos hepatócitos.

7. Vários métodos são utilizados na determinação quantitativa e qualitativa da A-1-AT. Entre os métodos

quantitativos podemos citar os de inibição da tripsina e de imunodifusão radial. Quanto aos métodos qualitativos, temos: eletroforese em gel de amido ácido, eletroforese cruzada antígeno-anticorpo, isoeletrofocalização, eletroforese com imuno-fixação, eletroforese em gel de agarose e poliacrilamida.

Atualmente, os métodos mais empregados no estudo da A-1-AT são a eletroforese em gel de amido ácido seguida de eletroforese cruzada antígeno-anticorpo e a isoeletrofocalização.

8. Uma série de fatores pode provocar alterações nas amostras a serem tipadas, levando à obtenção de falsos resultados. Esses fatores são os seguintes: envelhecimento das amostras, excesso de heparina, contaminação das amostras, gravidez, infecções, inflamações, lesões tissulares, período fetal, sarcoidose pulmonar ativa, administração de estrôgeno e haptoglobina tipo 1-1.

9. O "alelo" mais freqüente em todas as populações estudadas é o M, sendo que as estimativas de sua freqüência variam de 86% a 100%. O segundo alelo mais freqüente é o S, sendo que a sua freqüência chega a um máximo de 11,52%, em Portugal. O alelo Z, que apresenta grande importância clínica, também é razoavelmente freqüente, sendo a sua mais alta freqüência encontrada no Irã (2,21%). Os trabalhos que possibilitam diferenciar os subtipos de M, (M1, M2, M3), demonstram que o alelo M1 é o mais freqüente (variando de 68,15% a 93%).

10. O alto grau de polimorfismo do loco PI torna o seu estudo muito importante no delineamento da composição genética das populações humanas, podendo permitir uma

melhor informação em trabalhos sobre distâncias genéticas.

11. A associação, determinada ou sugerida, entre a deficiência de A-1-AT e algumas doenças (pulmonares obstrutivas crônicas, hepatite neonatal, cirrose hepática, artrite reumatóide, mieloma e linfoma) demonstra o valor de trabalhos que visam a estimar riscos em diferentes populações. Algumas medidas de precaução podem ser tomadas, se bem que não quanto a todas as doenças acima mencionadas, mas, pelo menos, com relação àquelas em que se conhecem os fatores predisponentes. No caso das doenças pulmonares obstrutivas crônicas, os indivíduos homozigotos ou heterozigotos para o alelo Z melhoram o seu prognóstico evitando o fumo, lugares com intensa poluição do ar, bem como produtos industriais voláteis.

12. A relação entre certos fenótipos de A-1-AT e a ocorrência de aberrações cromossômicas, bem como a transmissão diferencial do alelo Z, parecem-nos aspectos importantes e merecedores de um maior número de estudos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AAGENAES, Ø., MATLARY, A., ELGJO, K., MUNTHE, E. e FAGERHOL, M., 1972. Neonatal cholestasis in alpha-1-antitrypsin deficient children. Acta Paediat. Scand., 61:632-642.
- AARSKOG, D. & FAGERHOL, M.K., 1970. Protease inhibitor (Pi) phenotypes in chromosome aberrations. J. Med. Genet., 7: 367-370.
- ALLEN, R.C., HARLEY, R.A. e TALAMO, R.C., 1974. A new method for determination of alpha-1-antitrypsin phenotypes using isoelectric focusing on polyacrylamide gel slabs. Am. J. Clin. Pathol., 62:732-739.
- ANANTHAKRISHNAN, R., BIEGLER, B. e DENNIS, P.M., 1979. Alpha<sub>1</sub>-antitrypsin phenotypes in paraproteinaemias. Lancet, i: 561-562.
- ARNAUD, P., CHAPUIS-CELLIER, C., VITTOZ, P. e CREYSSEL, R., 1977. Alpha-1-antitrypsin phenotypes in Lyon, France. Hum. Genet., 39:63-68.
- ARNAUD, P., GALBRAITH, R.M., FAULK, W.P., BLACK, C. e HUGHES, G.V., 1979. Alpha<sub>1</sub>-antitrypsin in adult rheumatoid arthritis. Lancet, i:1236-1237.
- BARNETT, T.B., GOTTOVI, D. e JOHNSON, M., 1975. Protease inhibitors in chronic obstructive pulmonary disease. Am. Rev. Respir. Dis., 111:587-593.
- BEIGUELMAN, B., 1979. Genética Médica, farmacogenética e sistemas sanguíneos eritrocitários em genética e na prática médica. vol. 3. São Paulo. São Paulo Livraria Editora Ltda.
- BELL, O.F. & CARREL, R.W., 1973. Basis of the defect in  $\alpha$ -1-antitrypsin deficiency. Nature, 243:410-411.

- BERG, N.O. & ERIKSSON, S., 1972. Liver disease in adults with alpha-1-antitrypsin deficiency. N. Engl. J. Med., 287: 1264-1267.
- BLUNDELL, G., FRAZER, A., COLE, R.B. e NEVIN, N.C., 1975. Alpha<sub>1</sub> antitrypsin phenotypes in Northern Ireland. Ann. Hum. Genet., 38:289-294.
- BRACKERTZ, D. & KUEPPERS, F., 1977. Alpha-1 antitrypsin phenotypes in rheumatoid arthritis. Lancet, ii:935-936.
- BUISSERET, P.D., PEMBREY, M.E. e LESSOF, M.H., 1977.  $\alpha_1$ -antitrypsin phenotypes in rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. Lancet, ii:1358-1359.
- BUNDY, H.F. & MEHL, J.W., 1958. Trypsin inhibitors of human serum: I. Standardization mechanism of reaction and normal values. J. Clin. Invest., 37:947-955.
- BUNDY, H.F. & MEHL, J.W., 1959. Trypsin inhibitors of human serum: II. Isolation of the alpha<sub>1</sub>-inhibitor and its partial characterization. J. Biol. Chem., 234:1124-1128.
- BUSBY, T.F. & GAN, J.C., 1976. Chemical modifications of lysil and arginyl residues of human plasma  $\alpha_1$ -antitrypsin. Arch. Biochem. Biophys., 177:552-560.
- CHAPUIS-CELLIER, C. & ARNAUD, P., 1979. Preferential transmission of the Z deficient allele of  $\alpha_1$ -antitrypsin. Science, 205:407-408.
- CLEVE, H., PATUTSCHNICK, W., STRECKER, K. e NEVO, S., 1979. Inheritance of PiM subtypes. A study of 151 families with a total of 242 children and of 141 mother-child pairs. Hum. Hered., 29:351-354.
- COHEN, K.L., RUBIN, P.E., ECHEVERRIA, R.A., SHARP, H.L. e TEAGUN, P.O., 1973. Alpha-1-antitrypsin deficiency, emphysema, and cirrhosis in an adult. Ann. Intern. Med., 78:227-232.
- COLE, R.B., NEVIN, N.C., BLUNDELL, G., MERRETT, J.D., McDONALD, J.R. e JOHNSTON, W.P., 1976. Relation of alpha-1-antitrypsin phenotype to the performance of pulmonary function tests and the prevalence of respiratory illness in a working population. Thorax, 31:149-157.

- COOK, P.J.L., 1974. Genetic aspects of the Pi system. Postgrad. Med. J., 50:362-364.
- COOK, P.J.L., 1975. The genetics of  $\alpha_1$ -antitrypsin: a family study in England and Scotland. Ann. Hum. Genet., 38:275-287.
- COX, D.W., 1973a.  $\alpha_1$ -antitrypsin: the silent allele. Lancet, ii:1213.
- COX, D.W., 1973b. Defect in alpha-1-antitrypsin deficiency. Lancet, ii:844-845.
- COX, D.W., 1975. The effect of neuraminidase on genetic variants of alpha-1-antitrypsin. Am. J. Hum. Genet., 27:165-177.
- COX, D.W., HOEPPNER, V.H. e LEVISON, H., 1976. Protease inhibitor in patients with chronic obstructive pulmonary disease: the alpha-1-antitrypsin heterozigote controversy. Am. Rev. Respir. Dis., 113:601-606.
- COX, D.W. & HUBER, O., 1976. Rheumatoid arthritis and alpha-1-antitrypsin. Lancet, i:1216-1217.
- CRAWFORD, I.P., 1973. Purification and properties of normal human alpha-1-antitrypsin. Arch. Biochem. Biophys., 156:212-222.
- DeLELLIS, R.A., BALOGH, K., MERK, F.B. e CHIRIFE, A.M., 1972. Distinctive hepatic cell globules in adult alpha-1-antitrypsin deficiency: a histochemical, immunohistochemical and ultra-structural study. Arch. Pathol., 94:308-316.
- ERIKSSON, S., 1964. Pulmonary emphysema and alpha-1-antitrypsin deficiency. Acta Med. Scand., 175:197-205.
- ERIKSSON, S., 1965. Studies on  $\alpha_1$ -antitrypsin deficiency. Acta Med. Scand. Suppl., 177:175.
- ERIKSSON, S. & LAURELL, C.B., 1963. A new abnormal serum globulin  $\alpha_1$ -antitrypsin. Acta Chem. Scand., 17(supl. 1):150-153.
- FAARVANG, H.J. & LAURITSEN, O.S., 1963a. Relationship between serum concentration and urinary output of trypsin inhibitor after cortisone administration. Scand. J. Clin. Lab. Invest., 15:483-490.

- FAARVANG, H.J. & LAURITSEN, O.S., 1963b. Increase of trypsin inhibitor in serum during pregnancy. Nature, 199:290-291.
- FAGERHOL, M.K., 1967. Serum Pi types in Norwegians. Acta Pathol. Microbiol. Scand., 70:421-428.
- FAGERHOL, M.K., 1968. The Pi system. Genetic variants of serum  $\alpha_1$ -antitrypsin. Ser. Haematol., 1:153-161.
- FAGERHOL, M.K., 1969. Quantitative studies in the inherited variants of serum alpha-1-antitrypsin. Scand. J. Clin. Lab. Invest., 23:97-103.
- FAGERHOL, M.K., 1971. Le système des Pi. Sa génétique et ses rapports avec les maladies. Poumon Coeur, 27:45-51.
- FAGERHOL, M.K., 1972. The serum alpha-1-antitrypsin polymorphism. In: International Congress of Human Genetics, 4. Paris, 1971 Proceedings. Amsterdam, Excerpta Medica, p. 277-285.
- FAGERHOL, M.K., 1976. The genetics of alpha-1-antitrypsin and its implications. In: Aspects of Genetics in Paediatrics. Ed. BALDROP, D. London. Fellowship of Postgraduate Medicine, p. 73-79.
- FAGERHOL, M.K. & BRAEND, M., 1965. Serum prealbumin: Polymorphism in man. Science, 149:986-987.
- FAGERHOL, M.K., ERIKSSON, A.W. & MONN, E., 1969. Serum Pi types in some Lappish and Finnish populations. Hum. Hered., 19:360-364.
- FAGERHOL, M.K. & GEDDE-DAHL Jr., T., 1969. Genetics of the Pi serum types. Family studies of the inherited variants of serum alpha-1-antitrypsin. Hum. Hered., 19:345-359.
- FAGERHOL, M.K. & HAUGE, H.E., 1969. Serum Pi types in patients with pulmonary diseases. Acta Allergol., 24:107-114.
- FAGERHOL, M.K. & LAURELL, C.B., 1967. The polymorphism of "prealbumins" and  $\alpha_1$ -antitrypsin in human sera. Clin. Chim. Acta, 16:199-203.
- FAGERHOL, M.K. & LAURELL, C.B., 1970. The Pi system inherited variants of serum  $\alpha_1$ -antitrypsin. Prog. Med. Genet., 7:96-111.

- FAGERHOL, M.K. & TENFJORD, O.W., 1968. Serum Pi types in some European, American, Asian and African populations. Acta Pathol. Microbiol. Scand., 72:601-608.
- FEINSTEIN, G., SHTACHER, G. e MAAYAN, R., 1974. Protease inhibitors in human synovial fluids of patients with joint diseases. In: Bayer Symposium, 5. Cologne, 1973. Berlin, Springer, p. 109-110.
- FETARKIS, A., ARCHIMANDRITIS, A., TSOURAPAS, A., DOURATSOS, D. e ANGELOPOULOS, B., 1977. Serum levels and  $\alpha_1$ -antitrypsin phenotypes in active pulmonary tuberculosis. Acta Genet. Med. Gemellol., 26:97-99.
- FETARKIS, A., TSOURAPAS, A., DOURATSOS, D. e ANGELOPOULOS, B., 1974. Pi phenotypes in Greeks. Hum. Hered., 24:313-316.
- FIGUEIREDO, E.L. & CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A., 1980. Frequência de deficientes da alfa-1-antitripsina em amostra de Curitiba. Ciën. e Cult., 32(supl.):742.
- FINNEMAN, R.M., KIDD, K.K., JOHNSON, A.M. e BREG, W.R., 1976. Increased frequency of heterozygotes for alfa-1-antitrypsin variants in individuals with either sex chromosome mosaicism or trisomy 21. Nature, 260:320-321.
- FRANTS, R.R. & ERIKSSON, A.W., 1976.  $\alpha_1$ -antitrypsin: common subtypes of Pi M. Hum. Hered., 26:435-440.
- FRANTS, R.R. & ERIKSSON, A.W., 1978. Reliable classification of six Pi M subtypes by separator isoelectric focusing. Hum. Hered., 28:201-209.
- FRANTS, R.R., NOORDHOEK, G.T. e ERIKSSON, A.W., 1978. Separator isoelectric focusing for identification of alpha-1-antitrypsin (Pi M) subtypes. Scand. J. Clin. Lab. Invest., 38:457-462.
- FRETZ, J.C. & GAN, J.C., 1978a. Circular dichroism of chemically modified human plasma  $\alpha_1$ -antitrypsin. Interaction with porcine elastase. Biochim. Biophys. Acta, 537:226-237.
- FRETZ, J.C. & GAN, J.C., 1978b. The interaction of chemically modified human plasma  $\alpha_1$ -antitrypsin with porcine pancreatic elastase. Arch. Biochem. Biophys., 188:226-227.
- GALDSTON, M., JANOFF, A. e DAVIS, A.L., 1973. Familial variation of leukocyte lysosomal protease and serum alpha-1-antitrypsin as determinants in chronic obstructive pulmonary disease. Am. Rev. Respir. Dis., 107:718-727.

- GANROT, P.O. & BJERRE, B., 1967. Alpha<sub>1</sub>-antitrypsin and alpha<sub>2</sub>-macroglobulin concentration in serum during pregnancy. Acta Obstet. Gynec. Scand., 46:126-137.
- GANROT, P.O., LAURELL, C.B. e ERIKSSON, S., 1967. Obstructive lung disease and trypsin inhibitors in alpha<sub>1</sub>-antitrypsin deficiency. Scand. J. Clin. Lab. Invest., 19:205-208.
- GANS, H., SHARP, H.L. e TAN, B.H., 1969. Antiprotease deficiency and familial infantile liver cirrhosis. Surg. Gynecol. Obstet., 129:289-299.
- GEDDE-DAHL Jr., T., FAGERHOL, M.K., COOK, P.J.L. e NOADES, J., 1972. Autosomal linkage between the Gm and Pi loci in man. Ann. Hum. Genet., 35:393-399.
- GEDDE-DAHL Jr., T., COOK, P.J.L., FAGERHOL, M.K. e PIERCE, J.A., 1975. Improved estimate of the Gm-Pi linkage. Ann. Hum. Genet., 39:43-50.
- GELB, A.F., KLEIN, E. e LIEBERMAN, J., 1977. Pulmonary function in nonsmoking subjects with alpha-1-antitrypsin deficiency (MZ phenotype). Am. J. Med., 62:93-98.
- GENZ, T., MARTIN, J. P. e CLEVE, H., 1977. Classification of alpha<sub>1</sub>-antitrypsin (Pi) phenotypes by isoelectrofocusing. Distinction of six subtypes of the Pi M phenotype. Hum. Genet., 38:325-332.
- GERBLICH, A.A., KLEINERMAN, J., RYNBRANDT, D.J., CHESTER, E.H. e IHRIG, J., 1978. Pi Z phenotypes in a pulmonary clinic. Am. J. Clin. Pathol., 69:509-513.
- GHERARDI, G.J., 1971. Alpha-1-antitrypsin deficiency and its effect on the liver. Hum. Pathol., 2:173-175.
- GLASGOW, J.F.T., LYNCH, M.J., HERCZ, A., LEVISON, H. e SASS-KORTSAK, A., 1973. Alpha-1-antitrypsin deficiency in association with both cirrhosis and chronic obstructive lung disease in two sibs. Am. J. Med., 54:181-194.
- GOEDDE, H.W., BENKMANN, H.G., CHRIST, I., SINGH, S. e HIRTH, L., 1970. Gene frequencies of red cell adenosine deaminase, adenylate kinase, phosphoglucomutase, acid phosphatase and serum alpha<sub>1</sub>-antitrypsin (Pi) in a German population. Humangenetik, 10:235-243.

- GOEDDE, H.W., HIRTH, L., BENKMANN, H.G., PELLICER, A., PELLICER, T., STHAN, M. e SINGH, S., 1973. Population genetic studies of serum protein polymorphisms in four Spanish populations. Hum. Hered., 23:135-146.
- GOLDRING, I.P., GRENBURG, L. e RATNER, I.M., 1968. On the production of emphysema in Syrian hamsters by aerosol inhalation of papain. Arch. Environ. Health, 16:59-60.
- GORDON, H.W., DIXON, J., ROGERS, J.C., MITTMAN, C. e LIEBERMAN, J., 1972. Alpha-1-antitrypsin (A<sub>1</sub>AT) accumulation in livers of emphysematous patients with alpha-1-antitrypsin deficiency. Hum. Pathol., 3:361-370.
- HAGSTRÖM, B.E., 1961. Experiments on hybridization of sea urchins. Ark. Zool., 12:127-135.
- HAGSTRÖM, B.E. & LÖNNING, S., 1963. The effect of trypsin on the early development of the sea urchin egg. Ark. Zool., 15:397-380.
- HARADA, S. & OMOTO, K., 1970. Electrophoretic variation of human serum  $\alpha_1$ -antitrypsin in Japan. J. Anthrop. Soc. Nippon, 78:22-30.
- HAYNES, R., OSUGA, D.T. e FEENEY, R.E., 1967. Modification of amino groups in inhibitors of proteolytic enzymes. Biochemistry, 6:541-547.
- HEIMBURGER, N., 1974. Biochemistry of proteinase inhibitors from human plasma: a review of recente development. In: Bayer Symposium, 5. Cologne, 1973. Berlin, Springer. p. 14-22.
- HEINEMAN, H.O. & FISHMAN, A.P., 1969. Non-respiratory functions of mammalian lung. Physiol. Rev., 49:1-47.
- HOUŠTEK, J., COPOVÁ, M., ZAPLETAL, A., TOMÁŠOVÁ, H. e SAMÁNEK, M., 1973. Alpha-1-antitrypsin deficiency in a child with chronic lung disease. Chest, 64:773-776.
- HYÁNEK, J., NOSKOVÁ, R. e CAFOURKOVÁ, Z., 1965. Die Trypsin-Inhibitoraktivität der Muttermilch in der ersten Woche nach der Entbindung. Ann. Paediat., 204:125-137.

- ISHAK, K.G., JENIS, E.H., MARSHALL, M.L., BOLTON, B.H. e BATTISTONE, J.C., 1972. Cirrhosis of the liver associated with  $\alpha_1$ -antitrypsin deficiency. Arch. Pathol., 94:445-455.
- JACOBSSON, K., 1955. Studies on the trypsin and plasmin inhibitors in human blood serum. Scand. J. Clin. Lab. Invest., 7(supl.14):55-102.
- JAMES, K., COLLINS, M.L. e FUDENBERG, H.H., 1966. A semi-quantitative procedure for estimating serum antitrypsin levels. J. Lab. Clin. Med., 67:528-532.
- JANOFF, A. & BLONDIN, J., 1970. Depletion of cartilage matrix by a neutral protease fraction of human leukocyte lysosomes. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 135:301-306.
- JEPPSON, J.O. & LAURELL, C.B., 1974. Isolation and fragmentation of  $\alpha_1$ -antitrypsin. In: Bayer Symposium, 5. Cologne, 1973. Berlin, Springer. p. 47-52.
- JOHNSON, A.M., 1976. Genetic typing of  $\alpha_1$ -antitrypsin by immunofixation electrophoresis. Identification of subtypes of Pi M. J. Lab. Clin. Med., 87:152-163.
- JOHNSON, A.M. & ALPER, C.A., 1970. Deficiency of  $\alpha_1$ -antitrypsin in childhood liver disease. Pediatrics, 46:921-925.
- KELLERMANN, G. & WALTER, H., 1970. Investigation on the population genetics of the alpha-1-antitrypsin polymorphism. Humangenetik, 10:145-150.
- KLASEN, E.C., D'ANDREA, F. e BERNINI, L.F., 1978. Phenotype and gene distribution of alpha-1-antitrypsin in a north Italian population. Hum. Hered., 28:474-478.
- KLASEN, E.C., FRANKEN, C., VOLKERS, W.S. e BERNINI, L.F., 1977. Population genetics of  $\alpha_1$ -antitrypsin in the Netherlands. Description of a new electrophoretic variant. Hum. Genet., 37:303-313.
- KOZAREVIC, D., LABAN, M., BUDIMIR, M., VOJVODIC, N., ROBERTS, A., GORDON, T. e MCGEE, D., 1978. Intermediate alpha-1-antitrypsin deficiency and chronic obstructive pulmonary disease in Yugoslavia. Am. Rev. Resp. Dis., 117:1039-1043.

- KRESS, L.F. & LASKOWSKI, M., 1974. Purification, properties and composition of  $\alpha_1$ -trypsin inhibitor from human plasma. In: Bayer Symposium, 5. Cologne, 1973. Berlin, Springer. p. 23-30.
- KUEPPERS, F., 1967. Immunologic assay of alpha-1-antitrypsin in deficient subjects and their families. Humangenetik, 5:54-58.
- KUEPPERS, F., 1968. Genetically determined differences in the response of alpha-1-antitrypsin levels in human serum to typhoid vaccine. Humangenetik, 6:207-214.
- KUEPPERS, F., 1971. Alpha $_1$ -antitrypsin: physiology, genetics and pathology. Humangenetik, 11:177-189.
- KUEPPERS, F., 1972. Alpha-1-antitrypsin levels and electrophoretic patterns of several deficient phenotypes. Humangenetik, 15:1-6.
- KUEPPERS, F., 1976.  $\alpha_1$ -antitrypsin M $_1$ : a new common genetically determined variant. Am. J. Hum. Genet., 28: 370-377.
- KUEPPERS, F. & BEARN, A.G., 1966a. A possible experimental approach to the association of hereditary  $\alpha_1$ -antitrypsin deficiency and pulmonary emphysema. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 121:1207-1209.
- KUEPPERS, F. & BEARN, A.G., 1966b. Inherited variations of human serum  $\alpha_1$ -antitrypsin. Science, 154:407.
- KUEPPERS, F. & BLACK, L.F., 1974.  $\alpha_1$ -antitrypsin and its deficiency. Am. Rev. Resp. Dis., 110:176-194.
- KUEPPERS, F., BRISCOE, W.A. e BEARN, A.G., 1964. Hereditary deficiency of alpha $_1$ -antitrypsin. Science, 146:1678-1679.
- KUEPPERS, F. & DONHARDT, A., 1974. Obstructive lung disease in heterozygotes for alpha-1-antitrypsin deficiency. Ann. Intern. Med., 80:209-212.
- KUEPPERS, F., FALLAT, R.J. e LARSON, R.K., 1969. Obstructive lung disease and alpha-1-antitrypsin deficiency gene heterozygosity. Science, 165:899.
- KUEPPERS, F., O'BRIEN, P., PASSARGE, E. e RUDIGER, H.W., 1975. Alpha-1-antitrypsin phenotypes in sex chromosome mosaicism. J. Med. Genet., 12:263-264.

- LARSON, C., EDIRKSEN, H., SUDSTROM; G. e ERIKSSON, S., 1976. Lung function in asymptomatic individuals with moderately (Pi SZ) and severely (Pi Z) reduced levels of alpha-1-antitrypsin. Scand. J. Respir. Dis., 57:267-280.
- LAURELL, C.B., 1965. Antigen-antibody crossed electrophoresis. Anal. Biochem., 10:358-361.
- LAURELL, C.B. & ERIKSSON, S., 1963. The electrophoretic  $\alpha_1$ -globulin pattern of serum in  $\alpha_1$ -antitrypsin deficiency. Scand. J. Clin. Lab. Invest., 15:132-140.
- LAURELL, C.B., KULLANDER, S. THORELL, J., 1968. Effect of administration of a combined estrogen-progestin contraceptive on the level of individual plasma proteins. Scand. J. Clin. Lab. Invest., 21:337-343.
- LAURELL, C.B. & PERSSON, U., 1973. Analysis of plasma  $\alpha_1$ -antitrypsin variants and their microheterogeneity. Biochem. Biophys. Acta, 310:500-507.
- LEBAS, J., HAYEM; A. e MARTIN, J.P., 1974. Études des variants génétiques de l' $\alpha_1$ -antitrypsine en immuno-électrofocalisation bidimensionnelle. C.R.Hebd. Seances Acad. Sci., 278:2359-2360.
- LIEBERMAN, J., 1969. Heterozygous and homozygous alpha-1-antitrypsin deficiency in patients with pulmonary emphysema. N. Engl. J. Med., 281:279-284.
- LIEBERMAN, J., GAIDULIS, L., GAROUTTE, B. e MITTMAN, C., 1972a. Identification and characteristics of the common alpha-1-antitrypsin phenotypes. Chest, 62:557-564.
- LIEBERMAN, J., GAIDULIS, L., GAROUTTE, B. e MITTMAN, C., 1972b. A new method of screening for genetic carriers of abnormal alpha-1-antitrypsin variants. Clin. Res., 20:196.
- LIEBERMAN, J. & MITTMAN, C., 1973. Dynamic response of  $\alpha_1$ -antitrypsin variants to diethylstilbestrol. Am. J. Hum. Genet., 25:610-617.
- LIEBERMAN, J., MITTMAN, C. e GORDON, H.W., 1972c. Alpha-1-antitrypsin in livers of patients with emphysema. Science, 175:63-65.
- LIEBERMAN; J., MITTMAN, C. e SCHNEIDER, A.S., 1969. Screening for homozygous and heterozygous alpha-1-antitrypsin deficiency. Protein electrophoresis on cellulose acetate membranes. J. Am. Med. Assoc., 210:2055-2060.

- LIE-INJO, L.E., GANESAN, J., HERRERA, A. e LOPEZ, C.G., 1978.  $\alpha_1$ -antitrypsin variants in different racial groups in Malasya. Hum. Hered., 28:37-40.
- LINDVALL, S., MAGNUSSON, O. e ORTH, K., 1969. On the inhibition of a fibrinolytic enzyme from Aspergillus oryzae by serum. Acta Chem. Scand., 23:2165-2174.
- LIU, W.H., FEINSTEIN, G., OSUGA, D.T., HAYNES, R. e FEENEY, R. E., 1968. Modification of arginines in trypsin inhibitors by 1,2-cyclohexanedione. Biochemistry, 7:2886-2892.
- LÖNNING, S., 1967. Electron microscopic studies of the block to polyspermy: the influence of trypsin, soybean trypsin inhibitor and chloralhydrate. Sarsia, 30:107-116.
- MANCINI, G., CARBONARA, A.O. e HEREMANS, J.F., 1965. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. Immunochemistry, 2:235-254.
- MARCO, V., MASS, B., MERANZE, D.R., WEINBAUN, G. e KIMBEL, P., 1971. Induction of experimental emphysema in dogs using leukocyte homogenates. Am. Rev. Resp. Dis., 104:595-598.
- MARTIN, J.P., SESBOIE, R., CHARLIONET, R., ROPARTZ, C. e PEREIRA, M.T., 1976. Genetic variants of serum  $\alpha_1$ -antitrypsin (Pi types) in Portuguese. Hum. Hered., 26:310-314.
- MARTIN, J.P., VANDEVILLE, D. e ROPARTZ, C., 1973. Pi B a new allele of  $\alpha_1$ -antitrypsin genetic variants. Biomedicine, 19:395-398.
- MASSI, G. & VECCHIO, F.M., 1977. Alpha-1-antitrypsin phenotypes in a group of newborn infants in Somalia. Hum. Genet., 38:265-269.
- MILLER, F. & KUSCHNER, M., 1969. Alpha $_1$ -antitrypsin deficiency, emphysema, necrotizing angiitis and glomerulonephritis. Am. J. Med., 46:615-623.
- MITTMAN, C., BARBELA, T. e LIEBERMAN, J., 1973. Antitrypsin deficiency and abnormal protease inhibitor phenotypes. Arch. Environ. Health, 27:201-206.
- MITTMAN, C. & LIEBERMAN, J., 1972. Protease inhibitor phenotypes in patients with chronic lung disease (abstract). Clin. Res., 20:242.

- MITTMAN, C., LIEBERMAN, J. e RUMSFELD, J., 1974. Prevalence of abnormal protease inhibitors phenotypes in patients with chronic obstructive lung disease. Am. Rev. Resp. Dis., 109:295-296.
- MOGHISSI, K.S., DABICH, D., LEVINE, J. e NEUHAUS, O.W., 1964. Mechanism of sperm migration. Fertil. Steril., 15:15-20.
- MUSIANI, P. & TOMASI, T.B., 1976. Isolation, chemical and physical properties of alpha-1-antitrypsin. Biochemistry, 15:798-804.
- OHLSSON, K., 1971. Neutral leucocyte proteases and elastase inhibited by plasma alpha-1-antitrypsin. Scand. J. Clin. Lab. Invest., 28:251-254.
- PIANTELLI, M., AUCONI, P. e MUSIANI, P., 1978. Alpha-1-antitrypsin phenotypes in newborns from Central and Southern Italy. Hum. Hered., 28:468-473.
- PIERCE, J.A., ERADIO, B. e DEW, T.A., 1975. Antitrypsin phenotypes in St. Louis. J. Am. Med. Assoc., 231:609-612.
- PORTER, C.A., MOWAT, A.P., COOK, P.J.L., HAYNES, D.W.G., SHILKIN, K.B. e WILLIAMS, R., 1972.  $\alpha_1$ -antitrypsin deficiency and neonatal hepatitis. Br. Med. J., 3:435-439.
- PRICER Jr., W.E. & ASHWELL, G., 1971. The binding of desialylated glycoproteins by plasma membranes of rat liver. J. Biol. Chem., 246:4825-4833.
- RIMON, A., SHAMASH, Y. e SHAPIRO, B., 1966. The plasmin inhibitor of human plasma. J. Biol. Chem., 241:5102-5107.
- ROBINET-LEVY, M. & RIEUNIER, M., 1972. Techniques d'identification des groupes Pi. Rev. Fr. Transf., 15:61-72.
- SCHULTZE, H.E., HEIDE, K. e HAUPT, H., 1962.  $\alpha_1$ -Antitrypsin aus Human-serum. Klin. Wochenschr., 40:427-429.
- SCHUMACHER, G.F.B. & PEARL, M.J., 1968. Alpha $_1$ -antitrypsin in cervical mucus. Fertil. Steril., 19:91-99.
- SCHUMACHER, G.F.B. & ZANEVELD, L.J.D., 1974. Proteinase inhibitors in human cervical mucus and their in vitro interactions with human acrosin. In: Bayer Symposium, 5. Cologne, 1973. Berlin, Springer. p. 178-186.

- SCHWACHMAN, H., PATTERSON, D.R. e LAGUNA, J., 1949. Studies in pancreatic fibrosis. A simple diagnostic gelatin film test for stool trypsin. Pediatrics, 4:222-230.
- SCHWICK, H.G., HEIMBURGER, N. e HAUPT, H., 1966. Antiproteinasen des Humanserums. Z. Gesamte Inn Med. Grenzgeb., 21: 193-198.
- SHAMASH, Y. & RIMON, A., 1966. The plasmin inhibitors of human plasma. III. Purification and partial characterization. Biochem. Biophys. Acta, 121:35-41.
- SHARP, H.L., BRIDGES, R.A., KRIVIT, W. e FREIER, E.F., 1969. Cirrhosis associated with alpha-1-antitrypsin deficiency: a previously unrecognized inherited disorder. J. Lab. Clin. Med., 73:934-939.
- SHIGEOKA, J.W., HALL, W.J., HYDE, R.W., SCHWARTZ, R.H., MUDHOLKAR, G.S., SPEERS, D.M. e LIN, C.C., 1976. The prevalence of alpha-1-antitrypsin heterozygotes (Pi MZ) in patients with obstructive pulmonary disease. Am. Rev. Resp. Dis., 114:1077-1084.
- SHOWS, T.B., ALPER, C.A., BOOTSMA, D., DORF, M., HUISMAN, T., KIT, S., KLINGER, H.P., KOZAK, C., LALLEY, P.A., LINDSLEY, D., McALPINE, P.J., McDOUGALL, J.K., MEERA KHAN, P., MEISLER, M., MORTON, N.E., OPITZ, J.M., PARTRIDGE, C.W., PAYNE, R., RODERICK, T.H., RUBINSTEIN, P., RUDDLE, F.H., SHAW, M., SPRANGER, J.W. e WEISS, K., 1979. International System for Human Gene Nomenclature. Human Gene Mapping 5. Edinburgh Conference (1979): Fifth International Workshop on Human Gene Mapping. Cytogenet. Cell Genet., 25:96-116.
- SJÖBLOM, K.G. & WOLLHEIM, F.A., 1977. Alpha-1-antitrypsin phenotypes and rheumatic diseases. Lancet, ii:41-42.
- TALAMO, R.C., LANGLEY, C.E., LEVINE, B.W. e KAZEMI, H., 1972. Genetic vs. quantitative analysis of serum alpha-1-antitrypsin. N. Engl. J. Med., 287:1067-1069.
- TALAMO, R.C., LANGLEY, C.E., REED, C.E. e MAKINO, S., 1973. Alpha-1-antitrypsin deficiency: a variant with no detectable alpha-1-antitrypsin. Science, 181:70-71.

- TALAMO, R.C., LEVISON, H., LYNCH, M.J., HERCZ, A., HYSLOP Jr., N.E. e BAIN, H.W., 1971. Symptomatic pulmonary emphysema in childhood associated with hereditary alpha-1-antitrypsin and elastase inhibitor deficiency. J. Pediatr., 79:20-26.
- TRAVIS, D., JOHNSON, D. e PANNEL, R., 1974. Properties of human alpha-1-antitrypsin. In: Bayer Symposium, 5. Cologne, 1973. Berlin, Springer. p. 31-39.
- TYLER, H.M., 1964. Trypsin inhibition levels and homograft rejection. Clin. Sci., 26:315-321.
- Van den BROEK, W.G.M., HOFFMANN, J.J.M.L. e DYKMAN, J.H., 1976. A new high frequency variant of  $\alpha_1$ -antitrypsin. Hum. Genet., 34:17-22.
- VANDEVILLE, D., MARTIN, J.P. e ROPARTZ, C., 1974.  $\alpha_1$ -antitrypsin polymorphism of a Bantu population: description of a new allele Pi L. Humangenetik, 21:33-38.
- VARPELA, E. & SARIS, N.E., 1971. Hereditary alpha $_1$ -antitrypsin deficiency. Ann. Clin. Res., 3:46-53.
- VIDAL, J., CAZAL, P., ROBINET-LEVY, M. e MICHEL, F.B., 1970. Deficits en alpha $_1$ -antitrypsine, groupes Pi et bronchopneumopathies chroniques. Presse Med., 78:783-786.
- WARD, A.M. & UNDERWOOD, J.C.E., 1974. Alpha-1-antitrypsin deficiency and liver disease in childhood. Genetic, immunochemical, histological and ultrastructural diagnosis. J. Clin. Pathol., 27:467-472.
- WELCH, M.H., REINECKE, M.E., HAMMARSTEN, J.F. e GUENTER, C.A., 1969. Antitrypsin deficiency in pulmonary disease: the significance of intermediate levels. Ann. Inter. Med., 71:533-542.
- WILSON, H.W., RATLIFF, N.B., MIKAT, E., HACKEL, D.B., YOUNG, W.G. e GRAHAM, T.C., 1971. Leukocyte changes in the pulmonary circulation: a mechanism of acute pulmonary injury by various stimuli. Chest, 59(supl.):36S-39S.