

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**Contributo para o estudo dos determinantes
genéticos na suscetibilidade e resposta à
terapêutica na asma**

José Miguel Beirão de Albuquerque

DISSERTAÇÃO

MESTRADO EM BIOLOGIA MOLECULAR E GENÉTICA

2012

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**Contributo para o estudo dos determinantes
genéticos na suscetibilidade e resposta à
terapêutica na asma**

Dissertação orientada por:

Doutor Manuel Bicho, Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa

Doutora Ângela Inácio, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

José Miguel Beirão de Albuquerque

MESTRADO EM BIOLOGIA MOLECULAR E GENÉTICA

2012

AGRADECIMENTOS

É com enorme orgulho que concluo esta etapa na minha vida, que tem como auge esta Tese, a qual só foi possível concretizar com o apoio de diversas pessoas a quem expresso a minha gratidão.

Agradeço em primeiro lugar ao Laboratório de Genética e ao serviço de ImunoAlergologia do Hospital de Santa Maria, na pessoa da Doutora Margarida Cortez, por me terem possibilitado desenvolver este trabalho e pelo apoio dado pelos seus colaboradores, nomeadamente as Doutoras Joana Ferreira, Irina Alho, Andreia Matos, Técnica Conceição Afonso, Ângela Gil e os meus colegas.

Agradeço igualmente à Professora Doutora Ângela Inácio e ao Professor Doutor Manuel Bicho pela sua prestigiante orientação e pelos seus conselhos que muito me honraram e que certamente me tornarão um melhor cientista.

Queria também expressar um agradecimento muito especial à minha família, principalmente à minha mãe e ao meu pai por todo apoio, esforço e dedicação na minha educação; ao meu irmão por todos estes anos de convivência e à minha avó que pela sua experiência de vida e pelos seus deliciosos doces me motivaram a concluir este trabalho.

Agradeço à Joni, pelo empenho e companhia; à família Nunes e à família Abrantes.

Por fim, mas não menos importante, agradeço a todos os meus amigos e colegas que pela sua camaradagem, partilha de ideias e convivências ao longo destes anos também ajudaram na realização deste trabalho.

A todos vós um grande bem-haja!

RESUMO

A asma é uma doença inflamatória crónica das vias respiratórias caracterizada por uma obstrução brônquica reversível e que desencadeia episódios recorrentes de sibilância, dispneia, aperto torácico e tosse. A patogénese da asma associa-se a mecanismos moleculares e celulares da inflamação característicos de uma resposta de linfócitos auxiliares do tipo Th2.

Esta é uma doença que afeta cerca de 300 milhões de pessoas em todo o mundo de todas as idades e etnias. Em Portugal estima-se que a asma afete 10% da população.

A asma é uma doença heterogénea, com uma forte relação entre fatores ambientais e fatores genéticos.

Os estudos genéticos são importantes pois permitem associar polimorfismos genéticos ao desenvolvimento da doença e à variabilidade interpessoal na resposta à terapêutica. Estima-se que cerca de 80% da variabilidade na resposta a terapêutica tem uma base genética.

Neste âmbito estudou-se o polimorfismo de repetição de 27 pb no intrão 4 do gene da sintase do óxido nítrico endotelial (eNOS), uma enzima envolvida na formação do óxido nítrico, e os polimorfismos de uma única base no codão 16 e 27 do gene do recetor β_2 -adrenérgico (ADR β_2) que está envolvido no relaxamento do músculo liso das vias aéreas e é o alvo de alguns dos medicamentos usados no tratamento da doença.

Existem diferenças significativas na distribuição genotípica da eNOS entre asmáticos e o grupo controlo ($p=0,016$) e um dos genótipos (aa) representa-se como um fator de proteção para a doença (OR=0,095; IC=0,012 a 0,727). Não foi encontrada nenhuma associação entre os polimorfismos da eNOS e do ADR β_2 e a resposta à terapêutica.

Os resultados sugerem que existe uma associação entre o polimorfismo de repetição do gene eNOS e a suscetibilidade para asma, embora este resultado esteja condicionado pela escolha do grupo controlo, e que os polimorfismos estudados não têm influência no controlo da doença.

Palavras-chave:

Asma, polimorfismos, eNOS, ADR β_2 , farmacogenética

ABSTRACT

Asthma is a chronic inflammatory disease of the airways, characterized by a reversible bronchial constriction and that triggers recurring episodes of wheezing, dyspnea, thoracic constriction and cough. The pathogenesis of asthma is associated to molecular and cellular mechanisms of inflammation typical of a Th2 cell response.

It's a disease that affects around 300 million people worldwide, of all ages and ethnicities. In Portugal it is estimated to affect 10% of the population.

Asthma is a heterogeneous disease, with a strong relation between environmental and genetic factors.

Genetic studies are important to associate polymorphisms with the development of the disease and deficiencies in the response to therapeutics. It is estimated that about 80% of the variability in response to therapeutics has a genetic basis.

In this context, the repetition polymorphism of intron 4 of the nitric oxide synthase gene (eNOS), an enzyme involved in the production of nitric oxide, and the single nucleotide polymorphisms of codons 16 and 27 of the β_2 -adrenergic receptor gene ($ADR\beta_2$), involved in the relaxation of the airways' smooth muscle and target of some of the medications used in the treatment of the disease, were studied.

There are significant differences in the genotypic distribution of eNOS between asthmatics and control ($p=0,016$), and the aa genotype represents a protective factor for the disease ($OR=0,095$ $CI=0,012-0,727$). No association was found between eNOS or $ADR\beta_2$ polymorphisms and response to therapeutics.

The results suggest that there is an association between repetition polymorphism of the eNOS gene and asthma susceptibility, but this result is biased by the choice of control group, and that the polymorphisms studied don't influence the response to therapeutics.

Keywords

Asthma, polymorphisms, eNOS, $ADR\beta_2$, pharmacogenetics

LISTA DE ABREVIATURAS

ACQ - Asthma Control Questionnaire

ADR β_2 - Receptor β -2 adrenérgico

AMP - Adenosina monofosfato

Arg - Arginina

BH₄ - Tetrahidrobiopterina

CD4+ - Grupamento de diferenciação 4

cGMP - Guanosina monofosfato cíclico

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DPOC - Doença pulmonar obstrutiva crónica

ECRHS - European Community Respiratory Health Survey

EDRF - Endothelium-derived relaxing factor

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

eNOS/NOS3 - Sintase do óxido nítrico endotelial

EPO - Peroxidase eosinófila

FAD - Dinucleótido de flavina e adenina

Fc ϵ RI - Recetor IgE de alta afinidade

FEV₁ - Forced expiratory volume in 1 second (volume expiratório forçado no 1º segundo)

FMN - Mononucleótido de flavina

GINA - Global Initiative for Asthma

Gln - Glutamina

Glu - Glutamato

Gly - Glicina

GM-CSF - Fator estimulador de colónias de granulócitos e macrófagos

GTP - Guanosina trifosfato

H₂O₂ - Peróxido de hidrogénio

IFN- γ - Interferão γ

IgE - Imunoglobulina E

IgM - Imunoglobulina M

IL-1 - Interleucina 1

IL-10 - Interleucina 10

IL-12 - Interleucina 12

IL-13 - Interleucina 13

IL-4 - Interleucina 4

IL-5 - Interleucina 5

IL-6 - Interleucina 6

IL-8 - Interleucina 8

INANC - Inibitory nonadrenergic noncolinergic nerves

iNOS/NOS2 - Sintase do óxido nítrico induzível

ISAAC - International Study of Asthma and Allergies in Childhood

L-arg - L-arginina

ml- Mililitro

MPO - Mieloperoxidase

mRNA - Ácido ribonucleico mensageiro

NADPH - Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

ng - Nanogramas

NK - "Natural killer"

nNOS/NOS1- Sintase do óxido nítrico neuronal

NO - Óxido nítrico

NO_2^- - Nitrito

NO_3^- - Nitrato

NOS - Sintase do óxido nítrico

$\text{O}_2^{\cdot -}$ - Superóxido

ONOO^- - Peroxinitrito

OR - Odds Ratio (razão de excedências)

PASW - Predictive Analytics SoftWare

pb - Pares de bases

PCR - Polimerase chain reaction (Reação em cadeia da polimerase)

PEF - Peak expiratory flow (Débito Expiratório Máximo Instantâneo)

RANTES - Regulated on Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted

RFLP - Restriction Fragment Length Polymorfism

RSNO - S-nitrosotióis

RS-NO - S-nitrosotiol

TAE - Tris-acetato-EDTA

TGF- β - Fator de transformação do crescimento β

Th1 - T helper type 1 (Linfócito T auxiliar 1)

Th2 - T helper type 2 (Linfócito T auxiliar 2)

TNF- α - Fator de necrose tumoral α

μ l - Microlitro

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	i
RESUMO	iii
ABSTRACT	v
LISTA DE ABREVIATURAS	vii
ÍNDICE GERAL	xi
ÍNDICE DE TABELAS	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS	xv
INTRODUÇÃO	1
• DEFINIÇÃO	1
• EPIDEMIOLOGIA	1
• ETIOLOGIA	2
• FISIOPATOLOGIA	3
• TRATAMENTO	4
• CUSTOS	5
• FARMACOGENÉTICA	6
• ÓXIDO NÍTRICO (NO)	7
O óxido nítrico desempenha um papel diversificado no sistema respiratório	7
Síntese de NO e mecanismo de ação	7
Broncodilatação	8
Efeitos vasculares.....	8
Imunidade:.....	9
Stress nitrativo:	9
• SINTASE DO ÓXIDO NÍTRICO ENDOTELIAL (eNOS)	10
• β₂- AGONISTAS	11
• RECETOR β₂ ADRENÉRGICO (ADRβ₂)	11
• OBJETIVOS	12
MATERIAL E MÉTODOS	13
• POPULAÇÃO DE ESTUDO	13
• DETERMINAÇÃO DA RESPOSTA À TERAPÊUTICA	13
• POLIMORFISMOS EM ESTUDO	13
• EXTRAÇÃO DE DNA GENÓMICO	14
• QUANTIFICAÇÃO DO DNA	14

• AMPLIFICAÇÃO DO DNA	14
• GENOTIPAGEM DOS INDIVÍDUOS	14
• ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	15
RESULTADOS	17
• CARACTERÍSTICAS DAS POPULAÇÕES ESTUDADAS	17
• eNOS.....	17
• ADR β_2	18
Posição-16.....	18
Posição-27.....	19
Haplótipos (posição 16 com 27)	19
• RESPOSTA À TERAPÊUTICA.....	20
DISCUSSÃO.....	23
CONCLUSÕES.....	29
BIBLIOGRAFIA	31
ANEXOS.....	37
• ANEXO A.....	37
• ANEXO B	38

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Sintases do óxido nítrico.....	8
Tabela 2 - Metodologia e componentes usados no PCR.....	14
Tabela 3 - Metodologia usada e fragmentos de restrição possíveis de obter no estudo dos polimorfismos do gene $ADR\beta_2$ através da técnica de RFLP.....	15
Tabela 4 - Distribuição do sexo e idade pelas populações amostradas.....	16
Tabela 5 - Frequência genotípica do polimorfismo do gene eNOS.....	17
Tabela 6- Frequência genotípica do polimorfismo Arg16Gly do gene $ADR\beta_2$	17
Tabela 7 - Frequência alélica do polimorfismo Arg16Gly do gene $ADR\beta_2$	18
Tabela 8 - Frequência genotípica do polimorfismo Gln27Glu do gene $ADR\beta_2$	18
Tabela 9 - Frequência alélica do polimorfismo Gln27Glu do gene $ADR\beta_2$	18
Tabela 10 - Associação entre genótipos dos polimorfismos na posição 16 e 27 do $ADR\beta_2$	19
Tabela 11 - Fatores estudados que podem influenciar a resposta à terapêutica.....	20

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Mecanismos responsáveis pela patologia da asma.....	3
Figura 2- Vias e consequências moleculares do NO.....	10
Figura 3- Imagem esquemática do gene que codifica a sintase do óxido nítrico endotelial e os vários polimorfismos detetados.....	10
Figura 4- Alguns polimorfismos do gene $ADR\beta_2$	11

INTRODUÇÃO

O sistema respiratório é essencial ao normal funcionamento do organismo humano pelo que qualquer perturbação nas suas vias pode trazer consequências graves à vida. Uma das patologias associadas ao sistema respiratório é a asma, uma doença já há muito documentada, referida pela primeira vez por Hipócrates na Grécia Antiga (Dupuy *et al.* 1992). A asma é atualmente um problema na sociedade e necessita de soluções que resultem numa melhor qualidade de vida dos doentes.

ASMA

- **DEFINIÇÃO**

Fenótipo de Asma difícil de definir

A Asma é um sério problema de saúde pública tendo uma elevada morbilidade a nível mundial.

É uma doença complexa, sem uma patogénese clara, sendo a sua definição bastante descritiva. Segundo o relatório GINA (Global Initiative for Asthma) a asma é caracterizada como: *“uma doença inflamatória crónica das vias respiratórias na qual células e elementos celulares desempenham uma função. A inflamação crónica está associada com a hiper-reatividade das vias aéreas que leva a episódios recorrentes de pieira, falta de ar, opressão torácica e tosse, particularmente à noite ou de manhã cedo. Estes episódios estão geralmente associados a uma obstrução generalizada, mas variável, do fluxo de ar dentro do pulmão, frequentemente reversível, quer espontaneamente ou com tratamento”* (GINA 2010).

- **EPIDEMIOLOGIA**

Uma das doenças crónicas mais comuns no globo

A asma afeta cerca de 300 milhões de pessoas no mundo de todas as idades e etnias (WHO 2007) e causa aproximadamente 18000 mortes anualmente embora tenha havido um decréscimo nas taxas de mortalidade a partir dos anos 80.

Com o aumento da população urbanizada no mundo prevê-se um acréscimo significativo de asmáticos nas próximas décadas, estimando-se um aumento de 100 milhões de pessoas com asma em 2025 (Masoli *et al.* 2004).

Em Portugal, o conhecimento dos números da asma teve um grande progresso com o contributo de dois estudos internacionais

No *European Community Respiratory Health Survey* (ECRHS), efetuado em 1994 com indivíduos entre os 20 e os 44 anos, determinou-se uma prevalência global de 4,5% (Gaspar *et al.* 2006). Portugal encontra-se numa posição intermédia, sendo que a prevalência mais baixa foi encontrada na Estónia (2%) e a mais elevada na Austrália (11,9%) (Burney *et al.* 1996).

O projeto *International Study of Asthma and Allergies in Childhood* (ISAAC) debruça-se sobre crianças entre os 6-7 anos e entre os 13-14 anos. No ano 2001/2002, a prevalência determinada foi de 12,9% para os 6-7 anos e 12% para os 13-14 anos (Asher *et al.* 2006).

Mais recentemente, em 2010, no inquérito nacional contra a asma, estimou-se que esta doença afeta cerca de 10% da população portuguesa independentemente do grupo etário o que equivale a aproximadamente 1 milhão de pessoas. Destes, cerca de 500 mil encontram-se a fazer tratamento anti-asmático (Bugalho de Almeida 2010).

- **ETIOLOGIA**

A asma é uma doença heterogénea, com uma forte relação entre fatores genéticos e fatores ambientais

Vários fatores de risco estão associados à doença: fatores do ambiente como o contacto com alérgenos, infeções (particularmente vírus), poluentes atmosféricos (ozono), dieta (Waltraud *et al.* 2006); e fatores endógenos como atopia e predisposição genética.

É já há algum tempo reconhecido que a asma tem uma importante natureza hereditária. A complexidade genética da asma deve-se à existência simultânea de vários genes envolvidos na sua patogénese (herança poligénica), nas possíveis combinações de alelos de diferentes genes (heterogeneidade genética) e à sua associação com genes que influenciam múltiplas características (pleiotropia) como por exemplo as relacionadas com a asma e o eczema (Los *et al.* 2001).

Esta interligação entre os vários fatores etiológicos diferencia a asma, como doença de hereditariedade complexa das outras doenças mendelianas, as quais são causadas por um único gene mutado e torna a sua componente genética mais ilusória e difícil de rastrear (Vercelli 2008).

- **FISIOPATOLOGIA**

A patogénese da asma está ligada a mecanismos moleculares e celulares de inflamação

A característica chave na fisiopatologia da asma é a inflamação, que envolve várias células do sistema imunitário e múltiplos mediadores químicos e que está fortemente associada com a hiper-reatividade das vias respiratórias. São o grau de inflamação, o broncoespasmo e a intensidade dos fenómenos de remodelação que ocorrem nas vias afetadas que determinam a gravidade da doença (Todo-Bom & Pinto 2006).

Biópsias e líquidos de lavagem bronco-alveolar de doentes testemunham a presença de um número elevado de células T ativadas, eosinófilos, mastócitos e uma grande quantidade de Interleucina 4 (IL-4) e IL-5, compatível com uma resposta imunitária “orquestrada” por células *T-helper type 2* (Th2), em detrimento de uma resposta por Th1 (Tournoy *et al.* 2002). Em indivíduos com predisposição para a asma, os alérgenos são captados por células dendríticas e apresentadas a células T, nomeadamente células Th2, que promovem a produção de anticorpos (imunoglobulinas E) pelos linfócitos B. Este fenómeno ocorre sob a influência de substâncias libertadas pelas células Th2. Estas células libertam ligando CD40 e citocinas, principalmente IL-4 e IL-13, que provocam uma mudança no isotipo da cadeia pesada dos anticorpos produzidos pelos linfócitos B levando à produção de IgE (imunoglobulina E) em vez de IgM (Gould & Sutton 2008). Estes, específicos para os alérgenos irão então ligar-se a recetores IgE de alta afinidade (FcεRI) presentes nos mastócitos e basófilos (Figura 1).

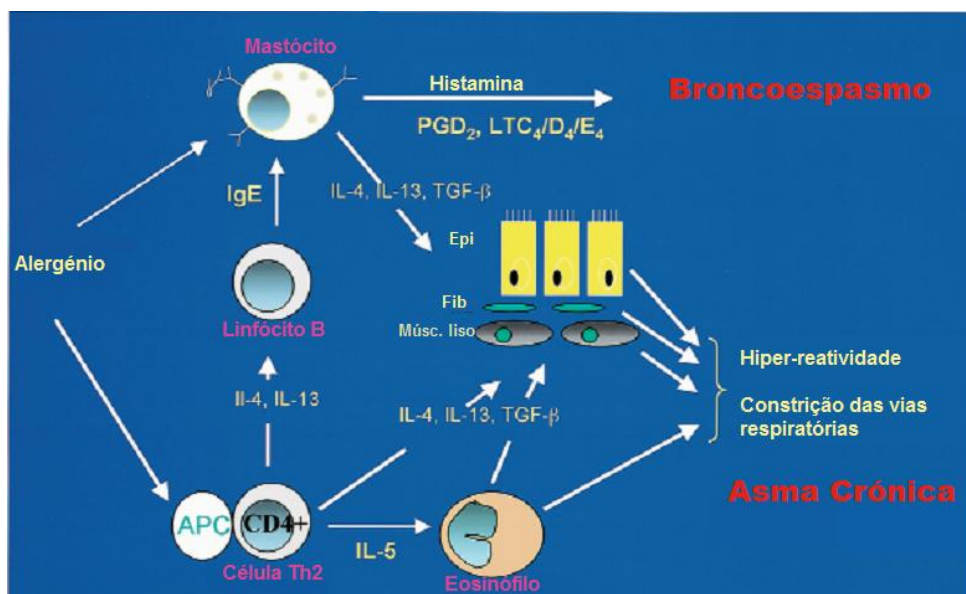


Figura 1- Mecanismos responsáveis pela patologia da asma (adaptado de Larché *et al.* 2003)

A resposta primária dá-se aquando da subsequente exposição destes anticorpos aos alérgenos, que induz a desgranulação destas células e a libertação de moléculas pró-inflamatórias e espécies reativas de oxigénio (Cookson 2004) suscetíveis de causar contração do músculo liso brônquico e inflamação da mucosa respiratória, ou seja, provocar broncoespasmo e edema respiratório (Todo-Bom & Pinto 2006).

A resposta tardia ocorre 6 a 9h após o contacto com o alérgeno e caracteriza-se pelo recrutamento e ativação de eosinófilos, células T CD4+, basófilos, neutrófilos e macrófagos. O recrutamento destas células para o local onde ocorreu o contacto com o alérgeno é o resultado das interações entre as células inflamatórias e as células endoteliais microvasculares através da produção de mediadores pró-inflamatórios, citocinas e quimiocinas, e a expressão de moléculas de adesão nas superfícies destas células (Bousquet *et al.* 2000).

Os eosinófilos que infiltram a mucosa brônquica desempenham um papel importante pois fixam também IgE na sua membrana e libertam vários mediadores em resposta ao contacto com o alérgeno (Todo-Bom & Pinto 2006). A sua mobilização está dependente de citocinas como a IL-5 e GM-CSF (fator estimulador de colónias de granulócitos e macrófagos) assim como de quimiocinas como RANTES (*Regulated on Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted*) e eotaxinas que atuam aumentando o recrutamento, a maturação terminal e a expressão das suas moléculas de adesão (Bousquet *et al.* 2000).

Além das células imunitárias, o epitélio brônquico também é importante na imunopatogenia da asma. Por um lado, as células colunares são lesadas permitindo a penetração do alérgeno e o seu contacto com células dendríticas, por outro, participam nas reações inflamatórias ao libertarem eicosanóides, peptidases, proteínas de matriz, citocinas e óxido nítrico (NO) e ao funcionarem como células apresentadoras de antígenos (Todo-Bom & Pinto 2006).

A resposta tardia, fortemente condicionada pela ação das células inflamatórias e respetivos mediadores, está associada a congestão, produção de muco e hiperreatividade brônquica. As alterações ocorridas a nível da microcirculação brônquica, com rutura da parede vascular e transudação plasmática, acentuam o edema e o estreitamento das vias aéreas (Todo-Bom & Pinto 2006).

- **TRATAMENTO**

Prevenção e controlo a longo prazo dos sintomas da asma são a chave para reduzir a frequência e a severidade da doença

A asma é uma doença de longo prazo que não pode ser curada. Contudo, pode ser controlada recorrendo a uma terapêutica que permita melhorar a qualidade de vida do

doente. A medicação usada reflete o conceito científico de asma, uma doença crónica, com episódios recorrentes de obstrução do fluxo de ar, produção de muco e tosse e cuja gravidade pode variar ao longo do tempo (National Heart Lung and Blood Institute 2007).

Os medicamentos para o tratamento da asma podem ser classificados como “controladores” e “aliviadores”. Os medicamentos de controlo têm uma ação preventiva a longo prazo mantendo os sintomas da asma sob controlo clínico através das suas propriedades anti-inflamatórias. Incluem glucocorticoesteróides, modificadores de leucotrienos, b2-agonistas de longa ação, teofilinas de libertação prolongada, cromonas e anticorpo monoclonal contra IgE. Atualmente, os glucocorticoesteróides inalados são a medicação de controlo mais eficaz (GINA 2010).

Os medicamentos de alívio têm uma ação rápida proporcionando a reversão imediata da broncoconstrição e abrandamento dos sintomas. Aqui estão incluídos os b2-agonistas de curta ação, os anti-colinérgicos e teofilinas de curta duração (GINA 2010).

Estes dois grupos de medicamentos podem ser usados em combinação em casos de doentes com asma persistente.

- **CUSTOS**

A asma tem um peso significativo nos recursos financeiros da saúde em cada país

Em geral, as consequências económicas da asma são elevadas, sobrecarregando os indivíduos afetados, as suas famílias, o sistema nacional de saúde e a sociedade como um todo.

Quando se fala da asma em termos económicos tem que se ter em conta os custos diretos como o tratamento hospitalar e custo dos medicamentos, e os custos indiretos que representam os dias de trabalho perdidos, a perda de produtividade e a morte prematura (GINA 2010).

Um estudo sobre o custo da asma em vários países desenvolvidos revela que o peso médio anual da asma varia entre os 326 dólares e os 1,315 dólares por doente (National Heart Lung and Blood Institute 1996)

Na Europa, o custo total da asma é de 17,7 biliões de euros por ano sendo que o tratamento ambulatorio é o que despense o maior custo (3,8 biliões de euros), seguido das despesas com os medicamentos (3,6 biliões de euros). O custo do tratamento hospitalar (*inpatient care*) ronda os 0,5 biliões de euros (European Respiratory Society 2003).

Em Portugal, entre os anos 2002 a 2007 determinou-se que o custo médio anual dos internamentos por asma foi cerca de 3,8 milhões de euros. A partir deste dado estimou-se que o custo total da patologia da asma seria de 137.254.329,90 euros por ano (Bugalho de Almeida 2008).

Estes dados são importantes pois embora sob o ponto de vista do doente e da sociedade o custo do controlo da doença pareça elevado, o custo de não tratar a doença corretamente é ainda mais elevado (GINA 2010). Um estudo realizado em sete países da união europeia revela que cerca de 50% dos custos totais da asma se devem a tratamento não controlado, independente da severidade da doença (A. E. Williams *et al.* 2006).

- **FARMACOGENÉTICA**

A farmacogenética pode ser um meio útil de otimizar o tratamento da asma

Foi desenvolvida uma panóplia de tratamentos farmacológicos para a asma, sendo que estes tratamentos têm uma eficácia moderada devido, em parte, à variabilidade individual na respostas aos medicamentos.

A variabilidade na resposta ao tratamento da asma pode ser devida à severidade e tipo de doença, adesão ao tratamento, interação com outros medicamentos, exposição ambiental, idade e fatores genéticos. Estima-se que cerca de 80% dessa variabilidade tem uma base genética (Jeffrey M Drazen *et al.* 2000).

É aqui que entra a farmacogenética, que estuda o papel dos determinantes genéticos na resposta variável aos tratamentos (L. J. Palmer *et al.* 2002). Existem três mecanismos farmacogenéticos que podem ter implicações para o tratamento de uma doença: 1) variações genéticas associadas com alterações na absorção, distribuição ou metabolismo do medicamento tomado (farmacocinética); 2) variações genéticas que resultam numa ação não intencional do medicamento fora da sua indicação terapêutica através de efeitos adversos (idiossincrasia); 3) variações genéticas no alvo ou num componente das vias de ação do medicamento levando a alterações na eficácia deste (farmacodinâmica). Todos os dados atualmente disponíveis na farmacogenética da asma pertencem a este último ponto (Hizawa 2011), é o caso do recetor β -2 adrenérgico ($ADR\beta_2$), um alvo importante dos b2 agonistas no tratamento da asma e da DPOC (doença pulmonar obstrutiva crónica). Alguns polimorfismos no gene deste recetor resultam em trocas na sequência de aminoácidos levando a alterações das suas propriedades, representando um fator de risco para repostas adversas à terapêutica baseada em b2 agonistas (Hizawa 2011). Ao longo dos últimos anos tem havido muita controvérsia acerca do papel dos b2 agonistas no tratamento da asma.

Sintase do óxido nítrico endotelial (eNOS)

- **ÓXIDO NÍTRICO (NO)**

O óxido nítrico desempenha um papel diversificado no sistema respiratório

O Óxido Nítrico é um gás e um radical livre tendo como fórmula química NO. É detetado no ar exalado de vários animais incluindo o homem sendo que em algumas doenças inflamatórias, como no caso da asma, a quantidade de NO está aumentada (Karitonov & Yates 1994).

O NO, que possui um tempo de meia-vida curto (1-5s), tem um elétron desemparelhado, fazendo com que reaja com outras moléculas como o oxigênio, radicais de superóxido ou mesmo o ferro dentro das proteínas com o grupo prostético Heme. É um mensageiro ubíquo que regula várias funções biológicas incluindo o sistema respiratório (Ricciardolo 2003).

Síntese de NO e mecanismo de ação

O óxido nítrico é formado através da oxidação de 5 elétrões do azoto guanidino terminal do aminoácido L-arginina (L-arg) originando L-citrulina como produto final. A reação é catalisada pela família de enzimas denominada Sintase do Óxido Nítrico (NOS) e requer a ajuda de vários co-fatores incluindo flavonas (FAD, FMN), tetrahydrobiopterina (BH₄) e NADPH (Ghosh & Erzurum 2011).

Existem pelo menos 3 isoformas da NOS (Tabela 1), que diferem relativamente à célula de origem, nos co-fatores necessários e na função fisiológica. Duas delas são enzimas constitutivas que existem nas células endoteliais (eNOS/NOS3) e nas células neurais (nNOS/NOS1). As NOS constitutivas, são reguladas pelo cálcio e pela calmodulina e são responsáveis pela libertação basal de NO (Ghosh & Erzurum 2011).

A forma induzível da NOS (iNOS/NOS2) pode ser encontrada nos macrófagos, células do músculo liso, hepatócitos, fibroblastos e neutrófilos. A transcrição da iNOS é ativada pela exposição a endotoxinas bacterianas ou por citocinas, é regulada transcricionalmente e a sua ativação é independente dos níveis de cálcio intracelular devido à sua ligação de alta afinidade com a calmodulina. A sua atividade é mais lenta que a eNOS mas é capaz de produzir maiores quantidades de NO por mole de enzima por unidade de tempo (Welch *et al.* 1995).

Tabela 1- Sintases do óxido nítrico (adaptado de Ghosh & Erzurum 2011)

Isoforma	Localização cromossômica	Expressão	Atividade
nNOS/NOS1	12q24	Constitutiva	Ca ²⁺ dependente
iNOS/NOS2	17cen-q12	Induzível	Ca ²⁺ independente
eNOS/NOS3	7q35-36	Constitutiva	Ca ²⁺ dependente

A ação direta do NO ocorre a concentrações baixas pela ligação a um número de moléculas alvo como proteínas que contêm metal. Esta interação leva à ativação ou inibição destas. (Maniscalco *et al.* 2007). O processo mais conhecido é a reação do NO com o grupo heme da guanilato ciclase (Ignarro *et al.* 1987). A subsequente ativação desta enzima é responsável pela conversão da guanosina trifosfato (GTP) em guanosina monofosfato cíclico (cGMP) que por sua vez ativa proteínas cinase (ex: proteína cinase G) que desempenham variadíssimas funções (Khurana & Meyer 2003).

Além disso, o NO consegue inibir outras metaloproteínas como a citocromo P-450, a citocromo oxidase e a catalase e modular reações oxidativas pela sua interação direta com radicais livres de alta energia como por exemplo inibindo a peroxidação lipídica e reduzindo a geração de lípidos pró-inflamatórios (Maniscalco *et al.* 2007).

Broncodilatação

Um dos efeitos do NO é a broncodilatação (Dupuy *et al.* 1992). Numa experiência realizada em 1993 verificou-se que NO inalado a uma concentração de 80 ppm exerceu um efeito broncodilatador em doentes com asma mas não em doentes DPOC (Högman *et al.* 1993). Existem evidências que o NO funciona como neurotransmissor dos nervos INANC (inhibitory nonadrenergic noncolinergic nerves) através da ativação da guanilato ciclase solúvel do músculo liso das vias respiratórias levando ao seu relaxamento (Barnes & Belvisi 1993).

Uma via alternativa ao NO com grande relevância biológica envolve a reação com tióis, originando S-nitrosotiol (RS-NO). Este composto possui um tempo de meia-vida superior ao radical NO, é mais estável e tem um efeito broncodilatador elevado, capaz de influenciar o tônus respiratório (Gaston *et al.* 1993).

Efeitos vasculares

Furchgott e Zawadzki em 1980 descobriram que as células endoteliais libertavam EDRF (endothelium-derived relaxing factor), um potente fator de relaxamento que modelava as

respostas de vasodilatação dependentes do endotélio. Mais tarde vir-se-ia a confirmar que o EDRF e o NO eram a mesma substância (Ignarro *et al.* 1987). Hoje sabe-se que o endotélio dos vasos sanguíneos liberta óxido nítrico, o que leva o músculo liso a relaxar, provocando vasodilatação e aumento do fluxo sanguíneo (Stankevicius *et al.* 2003).

Além de funcionar como vasodilatador, foi demonstrado que o NO bloqueia a agregação de plaquetas, reduz a adesão das plaquetas às células endoteliais (Radomski *et al.* 1987) e está associado à modulação da permeabilidade vascular (Kubes & Granger 1992). Conhecer o papel do óxido nítrico endógeno na microcirculação das vias respiratórias é por isso importante na asma.

Imunidade:

O óxido nítrico desempenha também várias funções na imunidade; como agente tóxico para organismos infecciosos, como indutor da apoptose ou como imunoregulador (Coleman 2001). O NO afeta a produção de várias citocinas, nomeadamente IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IFN- γ , TNF- α e TGF- β por várias células do sistema imunitário (macrófagos, Linfócitos T, células NK e células endoteliais) (Bogdan *et al.* 2000). O NO poderá ser mesmo um mecanismo que causa a amplificação da inflamação asmática através da inibição da produção de IFN- γ e, logo, das células Th1, resultando no aumento de células Th2, uma característica chave na asma (Barnes & Liew 1993).

Stress nitrativo:

Ao ser produzido em grandes quantidades, nomeadamente através da iNOS, o óxido nítrico pode tornar-se tóxico para o organismo criando um stress nitrativo (Figura2). Pode ser oxidado a nitrito (NO_2^-) que, por sua vez, pode ser oxidado originando nitrato (NO_3^-), formar S-nitrosotióis (RSNO) juntamente com tióis ou, na presença de peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e haletos, através do sistema mieloperoxidase (MPO)/peroxidase eosinófila (EPO), promover a halogenação e/ou nitração de proteínas (Ghosh & Erzurum 2011).

Na presença de Superóxido (O_2^-), o NO reage com este produzindo peroxinitrito (ONOO^-) que pode decair para NO_3^- ou causar nitração de compostos fenólicos (Ghosh & Erzurum 2011). O peroxinitrito é um agente oxidante de vida curta e um potente indutor de morte celular (Szabó *et al.* 2007).

Outra reação importante do NO é a sua ligação à hemoglobina existente nos glóbulos vermelhos originando metahemoglobina

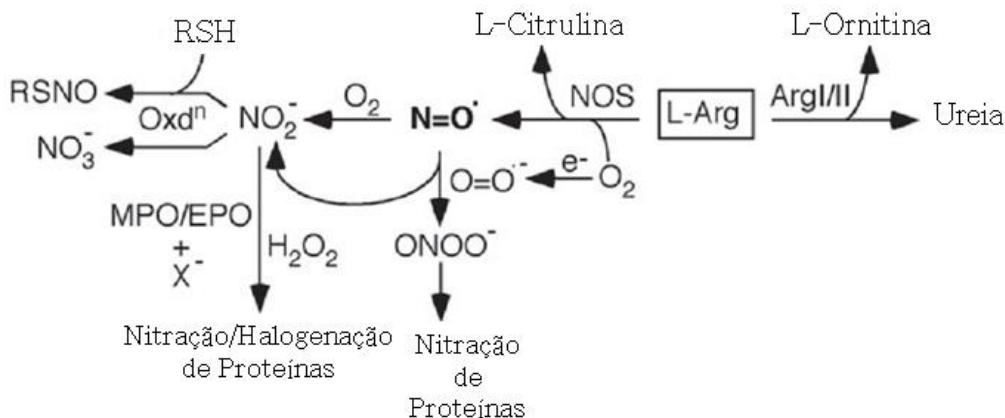


Figura 2- Vias e consequências moleculares do NO (adaptado de Ghosh & Erzurum 2011)

• SINTASE DO ÓXIDO NÍTRICO ENDOTELIAL (eNOS)

A sintase do Óxido Nítrico endotelial é expressa no endotélio vascular, no epitélio das vias aéreas e noutro tipo de células (cardiomiócitos, plaquetas) (Cabral *et al.* 2001) onde gera NO, que desempenha importantes funções nas vias respiratórias, referidas anteriormente, sendo por isso um bom caso de estudo na asma.

Nos humanos, o gene que codifica a eNOS localiza-se no cromossoma 7q35-36, compreende 26 exões abrangendo 21 Kb e produz uma proteína com cerca de 1203 aminoácidos (Marsden *et al.* 1992).

Desde a sua caracterização em 1990 inúmeras variações alélicas do gene têm sido identificadas (Figura 3) e avaliadas quanto à sua associação a várias doenças (Wattanapitayakul *et al.* 2001).

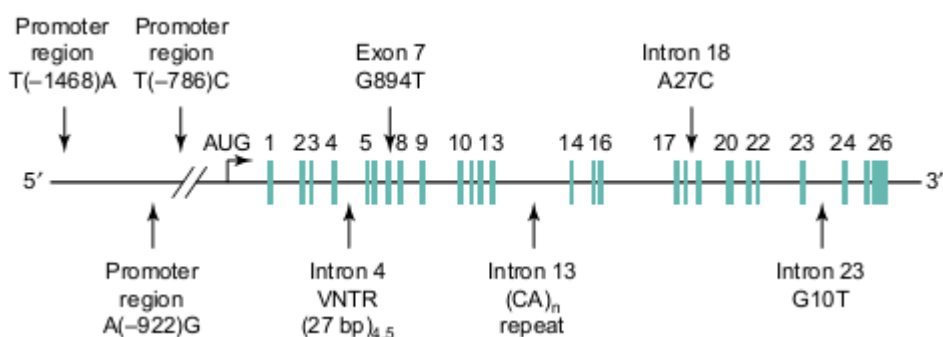


Figura 3 - Imagem esquemática do gene que codifica a sintase do óxido nítrico endotelial e os vários polimorfismos detetados (setas). (Adaptado de Wattanapitayakul *et al.* 2001)

A maioria das variações descritas no gene eNOS ocorre em intrões. Foi identificado um polimorfismo de repetição de 27 pares de base (pb) no intrão 4 do gene. Este polimorfismo influencia a expressão de mRNA, e assim a concentração de proteína e a sua atividade

enzimática em cultura de células endoteliais (Song *et al.* 2003). Além disso os alelos deste polimorfismo foram associados a diversas doenças e associados à asma numa população coreana (Y. C. Lee *et al.* 2000).

Recetor β_2 -adrenérgico ($ADR\beta_2$)

- **β_2 - AGONISTAS**

A inalação de agonistas do recetor β_2 -adrenérgico permanece entre a medicação mais prescrita no tratamento da asma (Hizawa 2011). O tratamento com estes agentes, como o salbutamol, isoetarina, metaproterenol, pirbuterol e terbutalina, providencia uma reversão imediata e efetiva da obstrução do fluxo respiratório com uma melhoria dos sintomas (Israel *et al.* 2000). Este processo funciona através da ativação do recetor β_2 -adrenérgico, seguido de internalização do sinal pela indução da produção de AMP cíclico. Este processo origina relaxamento das vias aéreas através das fosforilação de proteínas de regulação muscular e alteração da concentração de cálcio intracelular (M Johnson 2001).

- **RECETOR β_2 ADRENÉRGICO ($ADR\beta_2$)**

Os recetores adrenérgicos são o protótipo de recetores ligados a proteína G

O recetor β_2 adrenérgico é um membro de 7 famílias de recetores transmembranares, sendo composto por 413 aminoácidos (M Johnson 2001). O gene $ADR\beta_2$ que codifica este recetor é um pequeno gene sem intrões situado no cromossoma 5q31-q32, numa região que está geneticamente ligada à asma e aos fenótipos relacionados (híper-reatividade bronquial e níveis de IgE no soro) (Hizawa 2011).

Uma re-sequenciação de uma região de 5,3 kB contendo o gene $ADR\beta_2$ identificou 49 polimorfismos (Hawkins *et al.* 2006). Destes, dois resultam numa substituição de um aminoácido no recetor (glicina (gly) por arginina (arg) - Arg16Gly - no aminoácido 16, e glutamato (gln) por glutamina (glu) no aminoácido 27 - Gln27Glu) (Figura 4), e têm sido foco de estudo na asma.

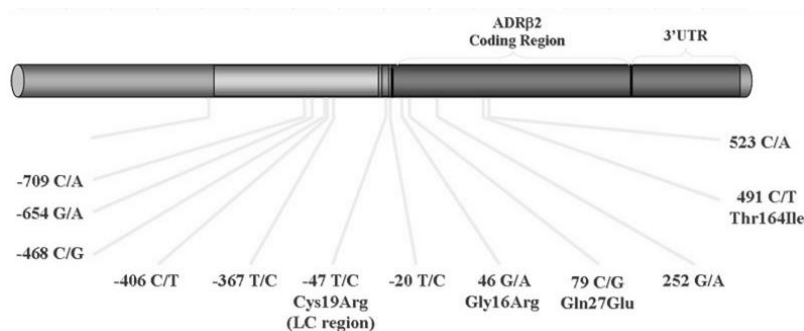


Figura 4- Alguns polimorfismos do gene $ADR\beta_2$ (Modificado de Drysdale *et al.* 2000).

Verificou-se que o polimorfismo 16-glicina está associado à diminuição da expressão do recetor. As células que expressam glutamina no aminoácido 27 eram relativamente resistentes a essa diminuição (Liggett 2000).

Por serem um potencial mecanismo de resistência aos β_2 -agonistas são por isso muito estudados na asma.

- **OBJETIVOS**

Determinar as frequências genóticas e alélicas do polimorfismo de repetição no intrão 4 da eNOS e dos polimorfismos de substituição de um nucleótido no aminoácido 16 e 27 do ADR β_2 em indivíduos que sofrem de asma.

Prever uma possível associação entre os genótipos estudados e o desenvolvimento da doença.

Verificar a existência de uma relação entre a resposta ao tratamento da asma e o genótipo de um indivíduo.

MATERIAL E MÉTODOS

• POPULAÇÃO DE ESTUDO

Neste estudo foram utilizadas 170 amostras de sangue provenientes de pacientes que consentiram o seu uso e que foram seguidos no serviço de ImunoAlergologia do Hospital de Santa Maria-Centro Hospitalar Lisboa Norte pela Doutora Margarida Cortez.

O diagnóstico da asma foi feito pela presença de qualquer um dos seguintes sinais ou sintomas: tosse com agravamento noturno, pieira recorrente, dificuldade respiratória recorrente, aperto torácico recorrente e cansaço. Além disso, foi tida em consideração a história familiar de asma e a presença de outras doenças atópicas frequentemente associadas à asma. Em alguns casos recorreu-se a técnicas de avaliação funcional respiratória (FEV₁ e PEF) para confirmar o diagnóstico de asma.

Foram excluídos os doentes que, tendo sido diagnosticada asma, possuíam anemia, doença hepática, infecciosa ou oncológica, fumadores e os não aderentes à terapêutica.

Como grupo controlo foram utilizadas 174 amostras de dadores de sangue sem a doença.

• DETERMINAÇÃO DA RESPOSTA À TERAPÊUTICA

A avaliação clínica e a medicação prescrita seguiram as recomendações da GINA.

A classificação do paciente como controlado ou não controlado foi feita com base no inquérito ACQ (Asthma Control Questionnaire) (anexo A) (Juniper *et al.* 1999) calculando-se a pontuação média obtida nas 7 perguntas do questionário. Pacientes com uma pontuação abaixo de 0,75 têm asma controlada e acima de 1,25 têm asma não controlada (<http://www.qoltech.co.uk/acq.html>).

• POLIMORFISMOS EM ESTUDO

Neste estudo analisou-se o polimorfismo de repetição de 27 pares de base localizado no intrão 4 do gene da eNOS. O alelo mais pequeno tem 4 repetições de 27 pb e designa-se por 'a' enquanto o alelo maior tem 5 repetições e designa-se por 'b'.

Estudaram-se ainda 2 polimorfismos de substituição de um aminoácido no gene do recetor β_2 adrenérgico no codão 16 e no codão 27 denominados por Arg16Gly (rs1042713) e Gln27Glu (rs1042714) respetivamente. No primeiro polimorfismo há a substituição de um nucleótido adenina por uma guanina (alelo mutado) levando à substituição do aminoácido arginina por uma glicina. No segundo polimorfismo há a substituição de uma citosina por uma guanina provocando a alteração de uma glutamina por um glutamato (alelo mutado).

- **EXTRAÇÃO DE DNA GENÓMICO**

As amostras de sangue total foram colhidas em tubos de 10 ml com EDTA e guardadas a 20°C. O DNA foi obtido a partir de 2 ml de sangue pela técnica de *salting-out* adaptado do método de D. K. Lahiri e J. I. Nurnberger Jr. (1991) (Nucleic Acid research volume 19 nº 19 pag. 5444) que pode ser consultado no anexo B.

- **QUANTIFICAÇÃO DO DNA**

A quantificação (ng/μl) e determinação da pureza do DNA genômico (razão entre absorvências a 260 e 280 nm) foi realizada num espectrofotômetro de espectro completo (NanoDrop® ND-1000).

- **AMPLIFICAÇÃO DO DNA**

A amplificação do DNA foi conseguida através do método de PCR (polimerase chain reaction).

A amplificação dos genes foi realizada no termociclador GeneAmp® PCR System 2700 com diferentes condições de PCR conforme descrito na tabela 2.

Tabela 2- Metodologia e componentes usados no PCR

Gene	Primers	Condições PCR	Componentes
eNOS	5'-AGGCCCTATGGTAGTGCCTTT-3'	35 ciclos	DNA: 10 μl (200ng)
	5'-TCTCTTAGTGCTGTGGTCAC-3'	Desnaturação: 30s a 94°C Anneling: 30s a 53°C Extensão: 45s a 72°C Extensão final: 5 min 72°C	Primer p1: 1μl, 10 pmol Primer p2: 1ul, 10 pmol Master Mix: 12,5 μl H ₂ O: 0,5 μl
ADRB ₂	5'-CCTTCTTGCTGGCACCCCAT-3'	Hot start: 2 min 94°C 35 ciclos	DNA: 10 μl (200ng)
	5'-GGAAGTCCAAAACCTCGCACCA-3'	Desnaturação: 30s a 94°C Anneling: 30s a 63,6°C Extensão: 45s a 72°C Extensão final: 5 min 72°C	Primer p1: 1μl 10 pmol Primer p2: 1μl 10 pmol Master Mix: 12,5 μl H ₂ O: 0,5 μl

- **GENOTIPAGEM DOS INDIVÍDUOS**

Para o polimorfismo de repetição do gene eNOS a genotipagem dos indivíduos foi efetuada por eletroforese em gel de agarose 3% concentrado num volume total de 50 ml de TAE (20 mM Tris-Acetato, 1mM EDTA, pH 8,0) com adição de 5μl de brometo de etídeo (10mg/ml).

Para os polimorfismos de uma única base no gene $ADR\beta_2$ a genotipagem dos indivíduos foi efetuada por RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), uma técnica de restrição enzimática que permite a discriminação dos alelos após separação por electroforese em gel de agarose 4% concentrado num volume de 150 ml de TAE (20 mM Tris-Acetato, 1mM EDTA, pH 8,0) com adição de 15 μ l de brometo de etídeo (10mg/ml) durante 90 minutos a 80 volts.

A restrição para cada polimorfismo deste gene foi feita em alíquotas separadas a partir do mesmo produto de PCR (Tabela 3).

Tabela 3- Metodologia usada e fragmentos de restrição possíveis de obter no estudo dos polimorfismos do gene $ADR\beta_2$ através da técnica de RFLP

Polimorfismo	Componentes (<i>Thermo Scientific</i> ®)	Condições da restrição	Genótipo possível
Arg16gly	Produto de PCR: 8,5 μ l		AA- 308 pb
	Enzima: NcoI (1 μ l)	37°C 5 min	AG-308+291+17 pb
	Tampão: <i>green buffer</i> (2 μ l)	65°C 15 min	GG- 291+17 pb
	H ₂ O:18,5 μ l)		
Gln27Glu	Produto de PCR: 8,5 μ l		CC- 248+60 pb
	Enzima: BbvI (1 μ l)	37°C 5 min	CG- 308+248+60 pb
	Tampão: <i>green buffer</i> (2 μ l)	65°C 15 min	GG-308 pb
	H ₂ O:18,5 μ l		

A visualização das bandas de DNA, após todas as eletroforeses, foi efetuada num transiluminador de ultravioleta (GenoSmart VWR®).

• ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados obtidos foi efetuada nos softwares *Primer of Biostatistics 5.0* e *PASW Statistic 18*, estabelecendo-se como nível de significância o $p < 0,05$.

Para verificar se as populações estariam em equilíbrio Hardy-Weinberg (ex. genótipo vs controlado/não controlado) foi utilizado o teste de chi quadrado (χ^2) de Pearson visto se pretender comparar grupos com dados discretos.

O teste t de *Student* foi utilizado para comparar dois grupos com dados contínuos (ex: média da idade entre caso e controlo). Para calcular possíveis fatores de risco foi usado o Odds Ratio (OR) estabelecendo-se os intervalos de confiança em 95%.

RESULTADOS

Os resultados obtidos derivam dos 170 pacientes que corresponderam aos critérios de seleção mencionados nos materiais e métodos e dos 174 dadores de sangue que serviram como grupo controlo.

Dos 170 asmáticos, foram genotipados eficazmente 116 dos quais 113 foram para o gene eNOS enquanto para o gene ADR β_2 o rendimento foi menor, tendo-se genotipado 52 para o polimorfismo Arg16Gly e 54 para o Gln27Glu.

• CARACTERÍSTICAS DAS POPULAÇÕES ESTUDADAS

A comparação de alguns dados demográficos entre as duas populações estudadas permitiu verificar a existência de diferenças estatisticamente significativas na variável género, mas não na variável idade (Tabela 4).

Tabela 4- Distribuição do sexo e idade pelas populações amostradas

Variável	Pacientes	Controlos	Diferença estatística
Género	Masculino	59(34,7%)	115(68,05%)
	Feminino	111(65,3%)	54(31,95%)
Idade	39,29±18,425	41,10±12,088	Teste t, p=0,231

A distribuição dos géneros nas duas populações tem um comportamento antagónico, com o sexo masculino a ser mais predominante no grupo controlo (68,5%) enquanto no grupo dos pacientes há uma maior percentagem de mulheres (65%).

• eNOS

Em relação à genotipagem do gene eNOS observou-se que no grupo Controlo as frequências dos genótipos bb, ab e aa foram, respetivamente, 67,82%, 23,56% e 8,62%. Dentro da população de asmáticos as frequências dos genótipos bb, ab e aa foram 69,91%, 29,20% e 0,88%, respetivamente (Tabela 5).

Tabela 5- Frequência genotípica do polimorfismo do gene eNOS

	bb	ab	aa	p(χ^2)
Asmáticos	79(69,91%)	33(29,20%)	1(0,88%)	0,016
Controlo	118(67,82%)	41(23,56%)	15(8,62%)	

Há que realçar o facto da população de asmáticos estar em equilíbrio Hardy-Weinberg ($\chi^2=1,51$; $p=0,47$) ao contrário da população controlo que não se encontra em equilíbrio ($\chi^2=13,1$; $p=0,001$).

Existem diferenças significativas na distribuição dos genótipos entre as duas populações ($\chi^2=8,43$ x; $p=0,016$) (Tabela 5). Verifica-se que a percentagem de indivíduos aa é bastante superior no grupo controlo sendo este um fator protetor para a doença (OR=0,095 IC-0,012 a 0,727).

As frequências alélicas nas duas populações divergem ligeiramente com o alelo b a ter maior percentagem na população de doentes, 84,51% comparados com os 79,6% do controlo, embora estas diferenças não sejam estatisticamente significativas ($\chi^2=1,88$; $p=0,170$)

- **ADRB₂**

A genotipagem do recetor β_2 -adrenérgico por RFLP permitiu genotipar 52 pacientes em relação ao polimorfismo Arg16Gly e 54 para o polimorfismo Gln27Glu. Para ambos os polimorfismos as frequências genotípicas estão em equilíbrio Hardy-Weimberg ($\chi^2=2,05$; $p=0,36$ e $\chi^2=0,16$; $p=0,92$). Para este gene não foi usado grupo Controlo pois a população escolhida como controlo não foi adequada.

Posição-16

Neste polimorfismo a frequência de asmáticos homozigóticos para a arginina foi de 42,3%, para os heterozigóticos foi de 51,92% e 5,77% de homozigóticos para a glicina (Tabela 6).

Tabela 6- Frequência genotípica do polimorfismo Arg16Gly do gene ADRB₂

	Arg/Arg	Arg/Gly	Gly/Gly
Asmáticos	22(42,31%)	27(51,92%)	3(5,77%)

Quanto à frequência alélica verifica-se que o alelo com o aminoácido arginina está em maioria nesta população com 68,3% (Tabela 7).

Tabela 7- Frequência alélica do polimorfismo Arg16Gly do gene ADR β_2

	Arg	Gly
Asmáticos	71(68,27%)	33(31,73%)

Posição-27

A distribuição das frequência genotípicas no polimorfismo no codão 27 diverge ligeiramente do polimorfismo Arg16Gly com a frequência dos heterozigóticos a ser de 42,6% e dos homozigóticos de 12,96% e 44,44% para os aminoácidos Gln e Glu, respetivamente (Tabela 8).

Tabela 8- Frequência genotípica do polimorfismo Gln27Glu do gene ADR β_2

	Gln/Gln	Gln/Glu	Glu/Glu
Asmáticos	7(12,96%)	23(42,59%)	24(44,44%)

A frequência alélica para este polimorfismo é de 34% para o alelo Gln e 65,74% para o alelo Glu (Tabela 9).

Tabela 9- Frequência alélica do polimorfismo Gln27Glu do gene ADR β_2

	Gln	Glu
Asmáticos	37(34,26%)	71(65,74%)

Haplótipos (posição 16 com 27)

A distribuição das várias combinações dos polimorfismos nas posições 16 e 27 entre heterozigóticos e homozigóticos está expressa na tabela 10. Verifica-se que não existe nenhum indivíduo homozigótico para o haplótipo Gly16/Glu27. O haplótipo com maior frequência é o Arg/Gly Glu/Glu.

Tabela 10- Associação entre genótipos dos polimorfismos na posição 16 e 27 do ADR β_2

Haplótipo	Frequência (%)
Arg/Arg Glu/Glu	10(22,92%)
Arg/Gly Glu/Glu	14(27,08%)
Gly/Gly Glu/Glu	0(0%)
Arg/Arg Gln/Glu	6(14,58%)
Arg/Gly Glu/Gln	12(22,92%)
Gly/Gly Gln/Glu	2(4,17%)
Arg/Arg Gln/Gln	3(4,17%)
Arg/Gly Gln/Gln	1(2,08%)
Gly/Gly Gln/Gln	1(2,08%)

• RESPOSTA À TERAPÊUTICA

Todos os pacientes incluídos neste estudo foram medicados de acordo com a sua situação clínica e mais tarde foi analisada a evolução da sua condição através do inquérito ACQ. Dos 170 asmáticos, 117 (68,8%) tinham a sua doença controlada e 53 (31,2%) foram classificados como não controlados.

Fatores estudados que podem influenciar a resposta à terapêutica

Um dos objetivos deste estudo é analisar a influência dos fatores genéticos na resposta à terapêutica. Para além dos genes acima mencionados estudou-se ainda a influência da idade, do género e do tipo de asma (alérgica ou não alérgica) no tratamento dos doentes (Tabela 11).

Tabela 11- Fatores estudados que podem influenciar a resposta à terapêutica

Fator		Controlado	Não controlado	Diferença estatística
Idade	Média	117 (34,22±17,04)	53 (50,47±16,43)	(Teste-t) p=0,000
Gênero	M	39(22,94%)	20(11,76%)	(χ^2) p=0,605
	F	78(52%)	33(19,41%)	
Alergia	Asma alérgica	100(58,82%)	44(25,88%)	(χ^2) p=0,654
	Asma não alérgica	17(10%)	9(%,29%)	
eNOS	bb	57(50,44%)	22(19,47%)	(χ^2) p=0,278
	ab	24(21,24%)	9(7,96%)	
	aa	0(0%)	1(0,88%)	
16-ADRB₂	Arg/Arg	16(30,77%)	6(11,54%)	(χ^2) p=0,769
	Arg/Gly	17(32,66%)	10(19,23%)	
	Gly/Gly	2(3,85%)	1(1,92%)	
27- ADRB₂	Gln/Gln	5(9,26%)	2(3,70%)	(χ^2) p=0,682
	Gln/Glu	13(24,07%)	10(18,52%)	
	Glu/Glu	16(29.63%)	8(14,81%)	
Haplotipos (posição 16 com posição 27)				(χ^2) p=0,904

Os resultados expressos na tabela 11 mostram que nenhum dos polimorfismos dos genes analisados (eNOS e ADR β_2) tem influência na resposta à terapêutica. Este resultado verifica-se quer para os genótipos em separado (Tabela 11) como para genótipos agrupados (não apresentado) quer para os haplótipos entre a posição 16 e 27. O único fator estatisticamente relevante na distribuição dos doentes como controlados ou não controlados é a idade.

DISCUSSÃO

A asma é uma doença inflamatória crónica das vias aéreas que se caracteriza por problemas recorrentes de respiração. Esta doença complexa é sobretudo desencadeada por fatores ambientais que podem dar início a uma crise asmática. Contudo não são só os fatores presentes no ambiente a causa para a doença. Desde cedo se reconheceu a asma como uma doença hereditária sendo que 40 a 60% do risco para a doença é atribuído a fatores genéticos (Carroll 2005). Como tal começou por se estudar o gene da sintase do óxido nítrico endotelial, já associado a várias outras doenças tais como a hipertensão, a isquemia e o alzheimer e que é aqui um gene candidato também para a asma.

A eNOS é a forma constitutiva da sintase do óxido nítrico que está presente nas células endoteliais e que está envolvida na formação do óxido nítrico catalizando a reação da arginina a citrulina (Alderton *et al.* 2001). O NO tem vários efeitos nas vias aéreas e há uma produção aumentada deste gás nos pacientes com asma, bem evidenciado pelo aumento dos níveis de NO no ar exalado dos asmáticos (Karitonov & Yates 1994). O óxido nítrico tem efeitos benéficos nas vias aéreas como broncodilatador, e efeitos prejudiciais como vasodilatador, aumentando a exsudação de plasma, e como amplificador da resposta inflamatória (Barnes 1996).

Neste estudo, um dos objetivos foi determinar se o polimorfismo em *tandem* no intrão 4 da eNOS está associado a suscetibilidade para a asma.

Os resultados demonstram que há diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos (Tabela 5), ou seja a distribuição dos genótipos varia dos asmáticos para os não asmáticos. Verificou-se também, através do *odds ratio*, que o genótipo aa é um fator de proteção para a asma.

Tsukada *et al.* revelaram que estes polimorfismos no gene da eNOS se correlacionam com as concentrações de metabolitos de NO circulantes, com os indivíduos com o genótipo bb a apresentarem uma maior concentração, seguidos do genótipo ab e, por fim, o aa (Tsukada *et al.* 1998).

Por estas razões suspeita-se que o genótipo bb poderá estar relacionado com o desenvolvimento da asma devido aos altos teores de NO produzidos pela sintase do óxido nítrico e aos putativos efeitos deletérios que isso provoca nos asmáticos, por exemplo através do aumento do fluxo sanguíneo e da resposta imunitária.

Contudo é importante referir que na análise do grupo controlo se verificou que este não está em equilíbrio Hardy-Weinberg. A população que serviu como controlo deriva de um grupo de dadores de sangue que é um composto maioritariamente por elementos do sexo masculino, ao contrário dos pacientes com asma (Tabela 4), e embora não tenha sido medido este

parâmetro, tem-se a percepção que as pessoas que dão sangue em muitos casos são obesas, uma condição de risco para o desenvolvimento de várias doenças, incluindo a asma (Delgado *et al.* 2008). Estas características poderão ser a causa do enviesamento na distribuição genotípica na população controlo levando a que esta não esteja em equilíbrio Hardy-Weinberg. Este facto faz com que não possamos tirar conclusões efetivas sobre a influência deste polimorfismo na asma.

Comparando as frequências genotípicas resultantes neste estudo com estudos do mesmo tipo verifica-se que numa população coreana com asma brônquica a distribuição dos genótipos bb, ab e aa foi de 88%, 11% e 1% respetivamente sendo estatisticamente diferente dos Controlos (75%, 24% e 1%) (Y. C. Lee *et al.* 2000). Ou seja, estas distribuições de genótipos (tanto no grupo controlo como no grupo asma brônquica) são bastante diferentes das distribuições encontradas neste estudo, destacando-se o valor elevado de indivíduos bb nos asmáticos coreanos.

Num outro estudo, numa população caucasiana Checa (Hollá *et al.* 2002), mais próxima da população portuguesa em termos étnicos, verificou-se que a frequência nos asmáticos do genótipo bb era 69,3%, do genótipo ab 27,0% do genótipo aa 3,1% e do genótipo bc (padrão de banda anormal) 0,6%. Se excluirmos o único indivíduo com o genótipo bc verifica-se que as frequências genotípicas são similares à dos controlos checos (69,4%, 28,7% e 1,9) e semelhantes às da população de asmáticos de Portugal (69,9%, 29,2% e 0,88%) presentes neste estudo.

Por outro lado a população controlo checa diverge relativamente à população controlo (67,2%, 23,6%, 8,62%) deste estudo, sobretudo na frequência de indivíduos aa sendo este mais um argumento a favor do enviesamento da população controlo baseada nos Dadores de Sangue.

Vários estudos têm indicado vários marcadores no cromossoma 5q31 ligados à alergia, a níveis de IgE, a hiper-reatividade brônquica e asma (Liggett 1997). Um dos genes localizados nessa região é o do recetor β_2 -adrenérgico.

O recetor β_2 -adrenérgico é um protótipo dos recetores acoplados à proteína G e está presente no músculo liso, no epitélio bronquial e nas células endoteliais. Um dos principais efeitos do recetor no músculo liso do brônquio é o relaxamento e dilatação bronquial que ocorre pela sua ativação por catecolaminas endógenas ou por β_2 -agonistas administrados (Liggett 1997).

A associação dos polimorfismos do gene $ADR\beta_2$ com a asma é controversa devido a resultados contraditórios encontrados na literatura. Num estudo realizado com crianças egípcias foi encontrada uma elevada diferença estatística na distribuição do polimorfismo no codão 16 entre asmáticos e controlo e entre asma severa e asma moderada (Salama *et al.*

2011). Já num estudo com doentes americanos não foi encontrada qualquer diferença na distribuição das frequências genótípicas na posição 16 e 27 entre asmáticos e não asmáticos (Liggett 1997). O mesmo resultado foi obtido na Nova Zelândia (Holloway *et al.* 2000) e na Colombia (Isaza *et al.* 2012).

Num estudo no México feito com adultos locais não foi encontrada nenhuma diferença entre asmáticos e grupo controlo relativamente ao polimorfismo Arg16Gly mas sim no polimorfismo Gln27Glu. Ainda neste estudo foi demonstrado o efeito protetor do alelo Glu face ao alelo Gln e uma associação entre asma noturna e o alelo 16-Gly (Santillan *et al.* 2003). Outros estudos referem ainda que o alelo Glu na posição 27 do gene ADR β_2 está associado a níveis elevados de IgE no soro (J. C. Dewar *et al.* 1997) e a uma baixa reatividade das vias aéreas (Haltel *et al.* 1995). Resumindo, estes dados no seu conjunto parecem referir que estes polimorfismos não são fatores influenciadores da asma por si, mas podem estar associados ao tipo de asma ou a fenótipos relacionados com a doença.

Neste estudo as frequências genótípicas obtidas nos asmáticos para o polimorfismo Arg16Gly foram de 42,3% para Arg/Arg, 51,9% para Arg/Gly e 5,8% para Gly/Gly. As frequências alélicas foram de 68,3% para o alelo Arg e 31,7% para o alelo Gly.

As frequências genótípicas são diferentes das obtidas em estudos onde não foram encontradas diferenças entre os doentes e os controlos, como no estudo feito numa população asmática americana, onde as frequências são de 14,1%, 32,2% e 53,1% (Liggett 1997). Já numa população chinesa de asmáticos obteve-se uma frequência genotípica para os homozigóticos Arg/Arg de 35,6%, para os heterozigóticos de 49,2% e 15% para os homozigóticos Gly/Gly (Kwok *et al.* 2003) e uma frequência alélica de 60,4% para o alelo Arg e 39,6% para o alelo Gly o que significa que está mais próxima das frequências alélicas obtidas para a população asmática portuguesa (68,3% e 31,7%).

Numa população brasileira de asmáticos onde foi encontrada uma diferença significativa entre controlos e asmáticos verificamos que as frequências alélicas divergem das do presente estudo com a percentagem do alelo Gly (57,5%) a ser mais elevada que o alelo Arg (42,5%) na população brasileira (Paiva 2007).

Para a posição 27 os resultados indicam que a prevalência dos genótipos Gln/Gln, Gln/Glu e Glu/Glu nos asmáticos foi de 13%, 42,6% e 44,4%. Nestes números destaca-se o facto do alelo considerado mutado (Glu) ter uma percentagem maior que o alelo selvagem (Gln). Se tivermos em consideração que o alelo Glu está associado a níveis mais elevados de IgE em famílias de asmáticos (J. C. Dewar *et al.* 1997) pode-se estar perante a origem de um fenótipo relacionado com a asma.

Noutros trabalhos a frequência do polimorfismo Gln/Gly nos doentes com asma foi de 51% para homozigóticos Gln, 23% para heterozigóticos e 26% para homozigóticos Glu numa população brasileira (Paiva 2007) e 26%, 50% e 24% numa população americana, (Liggett 1997) e 70% 27% e 4% numa população colombiana (Isaza *et al.* 2012).

No entanto, devido à ausência de um grupo Controlo, não se podem fazer extrapolações sobre a influência destes polimorfismos do gene $ADR\beta_2$ na origem da asma já que não se pode comparar diretamente com outras populações pois existem grandes diferenças nas frequências dos polimorfismos entre indivíduos Afro-Americanos, Caucasianos e Chineses (Xie *et al.* 1999).

Outro objetivo deste estudo foi investigar a existência de uma relação entre a resposta ao tratamento da asma e o genótipo de um indivíduo. Nenhum dos polimorfismos estudados influencia este parâmetro, ou seja, o fato do doente estar controlado ou não controlado não varia conforme o genótipo.

Apesar de não se encontrar nenhum estudo que relacione a terapêutica na asma e o gene eNOS, sabe-se que os corticosteroides diminuem os níveis de óxido nítrico exalado (Zanconato & Dario 1997) através da inibição da expressão da iNOS (Simmons *et al.* 1996). Pelo contrário, este estudo veio demonstrar que no caso da eNOSs os polimorfismos não influenciam a resposta ao tratamento da asma. Uma possível explicação para esse resultado é a medicação prescrita para os doentes não influenciar a sintase do óxido nítrico endotelial.

Os estudos farmacogenéticos na asma ganharam um grande interesse a partir de 1994 quando se verificou que o genótipo 16-gly estava associado a uma maior perda no número de recetores em relação ao genótipo 16-arg após 24 horas de exposição a agonistas e que o genótipo Glu-27 era mais resistente a essa diminuição (Liggett 2000). Uma vez que os β_2 -agonistas são um dos medicamentos mais prescritos no tratamento da asma, a variabilidade genética no $ADR\beta_2$ pode resultar em diferentes sucessos no tratamento da doença. Este fato foi demonstrado por Tan *et al* que evidenciou que o uso de broncodilatadores provocava dessensibilização dos recetores dependente destes polimorfismos do gene $ADR\beta_2$ (Tan *et al.* 1997). Outros estudos relacionaram o efeito destes polimorfismos do gene $ADR\beta_2$ com a resposta a um determinado β_2 -agonistas. Num desses estudos, realizado por Martinez *et al*, mostrou-se que o polimorfismo Arg16Gly afeta a resposta ao albuterol, sendo que as melhores respostas eram para indivíduos Arg/Arg, seguidos por Arg/Gly e por fim Gly/Gly (Martinez *et al.* 1997).

Neste estudo não foi encontrada nenhuma relação entre os polimorfismos do ADR β_2 e a resposta à terapêutica da asma. Este resultado pode ser expectável se tivermos em consideração o facto de cada doente estar sujeito a diferentes medicamentos (por exemplo, nem todos tomam b2-agonistas ou só b2-agonistas) o que pode contrabalançar a possível influência dos genótipos do ADR β_2 .

Dos outros fatores estudados apenas a idade se mostrou ser importante na resposta a terapêutica. Contudo este dado é meramente indicativo não se podendo tirar conclusões uma vez que não se conhece a duração da doença em cada paciente.

CONCLUSÕES

Foi encontrada uma associação entre o polimorfismo de repetição de 27pb do gene eNOS e a suscetibilidade para asma, contudo este resultado está condicionado pela escolha do grupo controlo.

A prevalência dos alelos Arg e Gly do polimorfismo Arg16Gly do $ADR\beta_2$ nos asmáticos é de 68,3% e 31,7% respetivamente.

No polimorfismo Gln27Glu do $ADR\beta_2$ a prevalência nos asmáticos do alelo mutado (Glu) é superior ao alelo selvagem (Gln).

Nenhum dos determinantes genéticos estudados tem influência na resposta à terapêutica na asma.

BIBLIOGRAFIA

- Alderton, W.K., Cooper, C.E. & Knowles, R.G., 2001. Nitric oxide synthases : structure , function and inhibition. *Biochem J.*, 357, pp.593–615.
- Asher, M.I. *et al.*, 2006. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. *Lancet*, 368(9537), pp.733–43.
- Barnes, P.J. & Belvisi, M.G., 1993. Nitric oxide and lung disease. *Thorax*, 48, pp.1034–1043.
- Barnes, P.J. & Liew, F.Y., 1993. Nitric oxide and asthmatic inflammation. *Immunology Today*, 16, pp.128–130.
- Barnes, P.J., 1996. NO or no NO in asthma? *Thorax*, 51, pp.218–221.
- Bogdan, C., Röllinghoff, M. & Diefenbach, A., 2000. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Current Opinion in Immunology*, pp.64–76.
- Bousquet, J. *et al.*, 2000. From Bronchoconstriction to Airway Inflammation and Remodeling. *Am J Respir Crit Care Med*, 161, pp.1720–1745.
- Bugalho de Almeida, A., 2008. Programa Nacional de Controlo da Asma: Plano de Actividades.
- Bugalho de Almeida, A., 2010. Relatório Síntese das Actividades do ano de 2010 da Comissão de Coordenação do Programa Nacional de Controlo da Asma.
- Burney, P. *et al.*, 1996. Variations in the prevalence of respiratory symptoms, self-reported asthma attacks, and use of asthma medication in the European Community Respiratory Health Survey (ECRHS). *European Respiratory Journal*, 9(4), pp.687–695.
- Cabral, P.D. *et al.*, 2001. Cellular regulation of endothelial nitric oxide. *Am J physiol Renal Physiol*, pp.193–206.
- Carroll, W., 2005. Asthma genetics: pitfalls and triumphs. *Paediatric respiratory reviews*, 6(1), pp.68–74.
- Coleman, J.W., 2001. Nitric oxide in immunity and inflammation. *International Immunopharmacology*, pp.1397–1406.
- Cookson, W., 2004. The immunogenetics of asthma and eczema: a new focus on the epithelium. *Nature reviews. Immunology*, 4(12), pp.978–88.
- Delgado, J., Barranco, P. & Quirce, S., 2008. Obesity and Asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 18(6), pp.420–425.
- Dewar, J.C. *et al.*, 1997. The glutamine 27 B2-adrenoceptor polymorphism is associated with elevated IgE levels in asthmatic families. *J Allergy Clin Immunol*, pp.261–265.
- Drazen, Jeffrey M, Silverman, E.K. & Lee, T.H., 2000. Heterogeneity of therapeutic response in asthma. *British Medical Bulletin*, 56(4), pp.1054–1070.

- Drysdale, C.M. *et al.*, 2000. Complex promoter and coding region beta 2-adrenergic receptor haplotypes alter receptor expression and predict in vivo responsiveness. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(19), pp.10483–8.
- Dupuy, P.M. *et al.*, 1992. Bronchodilator action of inhaled nitric oxide in guinea pigs. *The Journal of clinical investigation*, 90(2), pp.421–8.
- European Respiratory Society, 2003. *European Lung White Book*, <http://dev.ersnet.org/268-white-book.htm>. Acedido em 19/03/2012
- Gaspar, A., Morais de Almeida, M. & Nunes, C., 2006. Epidemiologia da asma grave. *Rev Port Imunoalergologia*, 4(Supl 2), pp.27–41.
- Gaston, B. *et al.*, 1993. Endogenous nitrogen oxides and bronchodilator S-nitrosothiols in human airways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(23), pp.10957–61.
- Ghosh, S. & Erzurum, S.C., 2011. Nitric oxide metabolism in asthma pathophysiology. *Biochimica et biophysica acta*, 1810(11), pp.1008–16.
- GINA, 2010. *Global strategy for asthma management and prevention*, <http://www.ginasthma.org/> Acedido em 14/11/2011
- Gould, H.J. & Sutton, B.J., 2008. IgE in allergy and asthma today. *Nature reviews. Immunology*, 8(3), pp.205–17.
- Haltel, I.P. *et al.*, 1995. Association of Glu 27 B2-adrenoceptor polymorphism with lower airway reactivity in asthmatic subjects. *Lancet*, 345, pp.1213–1214.
- Hawkins, G. a *et al.*, 2006. Sequence, haplotype, and association analysis of ADRbeta2 in a multiethnic asthma case-control study. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 174(10), pp.1101–9.
- Hizawa, N., 2011. Pharmacogenetics of B2 -Agonists. *Allergology International*, 60, pp.239–246.
- Högman, M. *et al.*, 1993. Inhalation of nitric oxide modulates adult human bronchial tone. *The American review of respiratory disease*, 148, pp.1474–8.
- Hollá, I.L. *et al.*, 2002. Prevalence of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in patients with atopic asthma. *Clin Exp Allergy*, 32, pp.1193–1199.
- Holloway, J.W. *et al.*, 2000. Association of B2-adrenergic receptor polymorphisms with severe asthma. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 30, pp.1097–1103.
- Ignarro, L.J. *et al.*, 1987. Endothelium- derived relaxing factor produced and release from artery and vein is nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(December), pp.9265–9269.
- Isaza, C. *et al.*, 2012. B(2) -Adrenoceptor Polymorphisms in Asthmatic and Non-Asthmatic Schoolchildren From Colombia and Their Relationship To Treatment Response. *Pediatric pulmonology*, 47(9), pp.848–55.

- Israel, E. *et al.*, 2000. The Effect of Polymorphisms of the B2 -Adrenergic Receptor on the Response to Regular Use of Albuterol in Asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 162, pp.75–80.
- Johnson, M, 2001. Beta2-adrenoceptors: mechanisms of action of beta2-agonists. *Paediatric respiratory reviews*, 2(1), pp.57–62.
- Juniper, E.F. *et al.*, 1999. Development and validation of a questionnaire to measure asthma control. *Eur Respir J*, 14, pp.902–907.
- Karitonov, S.A. & Yates, D., 1994. Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Lancet*, 343(8890), pp.133–35.
- Khurana, V.G. & Meyer, F.B., 2003. Translational paradigms in cerebrovascular gene transfer. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 23(11), pp.1251–62.
- Kubes, P. & Granger, D.N., 1992. Nitric oxide modulates microvascular permeability. *The American journal of physiology*, 262(2 Pt 2), pp.H611–5.
- Kwok, Wing-ye & Winnie, 2003. *Polymorphisms of the b2-adrenergic receptor gene associated with asthma among Chinese in Hong Kong.*
- Larché, M., Robinson, D.S. & Kay, A.B., 2003. The role of T lymphocytes in the pathogenesis of asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 111(3), pp.450–463.
- Lee, Y.C. *et al.*, 2000. Gene polymorphisms of endothelial nitric oxide synthase and angiotensin-converting enzyme in patients with asthma. *Allergy*, 55, pp.959–963.
- Liggett, S.B., 1997. Polymorphisms of the B2 -Adrenergic Receptor and Asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 156, pp.156–162.
- Liggett, S.B., 2000. The pharmacogenetics receptors : Relevance of B2-adrenergic to asthma. *J Allergy Clin Immunol*, pp.487–492.
- Los, H., Postmus, P.E. & Boomsma, D.I., 2001. Asthma genetics and intermediate phenotypes: a review from twin studies. *Twin research : the official journal of the International Society for Twin Studies*, 4(2), pp.81–93.
- Maniscalco, M., Sofia, M. & Pelaia, G., 2007. Nitric oxide in upper airways inflammatory diseases. *official journal of the European Histamine Research Society*, 56(2), pp.58–69.
- Marín, J. & Rodríguez-Martínez, M.A., 1997. Role of Vascular Nitric Oxide in Physiological and Pathological Conditions. *Pharmacol. Ther*, 75(2), pp.111–134.
- Marketos, S. & Ballas, C., 1982. Bronchial asthma in medical literature of Greek antiquity. *Histoire des sciences médicales*, 17(Spec 2), pp.35–9.
- Marsden, P.A. *et al.*, 1992. Molecular cloning and characterization of human endothelial nitric oxide synthase. *Federation of European Biochemical Societies*, 307(3), pp.287–293.

- Martinez, F.D. *et al.*, 1997. Association between Genetic Polymorphisms of the B2 - Adrenoceptor and Response to Albuterol in Children with and without a History of Wheezing. *J. Clin. Invest.*, 100(12), pp.3184–3188.
- Masoli, M. *et al.*, 2004. The global burden of asthma : executive summary of the GINA Dissemination Committee Report. *Allergy*, (59), pp.469–478.
- National Heart Lung and Blood Institute, 1996. *National asthma education and prevention program task force on the cost effectiveness, quality of care, and financing of asthma care*, http://www.nhlbi.nih.gov/health/prof/lung/asthma/ast_cost.pdf Acedido em 28/03/2012
- National Heart Lung and Blood Institute, 2007. *Expert Panel Report 3: Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma Full Report 2007*, <http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/asthma/asthgdln.pdf> Acedido em 10/03/2012
- Paiva, A.C.Z. de, 2007. *Associação dos polimorfismos gln27 , glu27 , arg16 e gly16 do gene adrb2r com asma.*
- Palmer, L.J. *et al.*, 2002. Pharmacogenetics of Asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 165(7), pp.861–866.
- Radomski, M.W., Palmer, R.M. & Moncada, S., 1987. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet*, 2(8567), pp.1057–8.
- Ricciardolo, F.L.M., 2003. Multiple roles of nitric oxide in the airways. *Thorax*, 58, pp.175–182.
- Salama, M.S., Ashaat, N. a. & Hamad, A. a., 2011. Genetic association between common beta-2 adrenoceptor polymorphism and asthma severity in school-age children. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, 12(2), pp.151–156.
- Santillan, A. a *et al.*, 2003. Association between beta2-adrenoceptor polymorphisms and asthma diagnosis among Mexican adults. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 112(6), pp.1095–1100.
- Simmons, W.W. *et al.*, 1996. Glucocorticoids Regulate Inducible Nitric Oxide Synthase by Inhibiting Tetrahydrobiopterin Synthesis and L -Arginine Transport. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 271(39), pp.23928–23937.
- Song, J. *et al.*, 2003. Genotype-specific Influence on Nitric Oxide Synthase Gene Expression , Protein Concentrations , and Enzyme Activity in Cultured Human Endothelial Cells. *Clinical Chemistry*, 49(6), pp.847–852.
- Stankevicius, E. *et al.*, 2003. Role of nitric oxide and other endothelium-derived factors. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 39(4), pp.333–41.
- Szabó, C., Ischiropoulos, H. & Radi, R., 2007. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nature reviews. Drug discovery*, 6(8), pp.662–80.
- Tan, S. *et al.*, 1997. Association between B2 -adrenoceptor polymorphism and susceptibility to bronchodilator desensitisation in moderately severe stable asthmatics. *Lancet*, 350, pp.995–999.

- Todo-Bom, A. & Pinto, A.M., 2006. Fisiopatologia da asma grave. *Rev Port Imunoalergologia*, 4(Supl 2), pp.43–48.
- Tournoy, K.G., Kips, J.C. & Pauwels, R. a, 2002. Is Th1 the solution for Th2 in asthma? *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 32(1), pp.17–29.
- Tsukada, T. *et al.*, 1998. Evidence of Association of the ecNOS Gene Polymorphism with Plasma NO Metabolite Levels in Humans. *BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS*, 245, pp.190–193.
- Vercelli, D., 2008. Discovering susceptibility genes for asthma and allergy. *Nature reviews. Immunology*, 8(3), pp.169–82.
- Waltraud, E., Ege, M.J. & Mutius, E. von, 2006. The Asthma Epidemic. *N Engl Med*, (355), pp.2226–2235.
- Wattanapitayakul, S.K. *et al.*, 2001. Therapeutic implications of human endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism. *TRENDS in Pharmacological Sciences*, 22(7), pp.361–368.
- Welch, G.N., Upchurch, G.R. & Loscalzo, J., 1995. Nitric Oxide as a Vascular Modulator. *Blood Reviews*, 9, pp.262–269.
- WHO, 2007. *Vigilância global, prevenção e controlo das doenças respiratórias crónicas: Uma abordagem integradora*,
- Williams, A.E. *et al.*, 2006. Cost of scheduled and unscheduled asthma management in seven European Union countries. *European Respiratory Review*, 15(98), pp.4–9.
- Xie, H.-G. *et al.*, 1999. Frequency of functionally important b2 adrenoreceptor polymorphism varies markedly among African-American, Caucasian and Chinese individuals. *Pharmacogenetics*, 9, pp.511–516.
- Zanconato, S. & Dario, C., 1997. Corticosteroids decrease exhaled nitric oxide in acute asthma. *The Journal of Pediatrics*, pp.381–385.

ANEXOS

- ANEXO A

ASTHMA CONTROL QUESTIONNAIRE©

Please answer questions 1–6.

Circle the number of the response that best describes how you have been during the past week

- | | |
|--|-------------------------------------|
| 1. On average, during the past week, how often were you woken by your asthma during the night? | 0 Never |
| | 1 Hardly ever |
| | 2 A few minutes |
| | 3 Several times |
| | 4 Many times |
| | 5 A great many times |
| | 6 Unable to sleep because of asthma |
| 2. On average, during the past week, how bad were your asthma symptoms when you woke up in the morning? | 0 No symptoms |
| | 1 Very mild symptoms |
| | 2 Mild symptoms |
| | 3 Moderate symptoms |
| | 4 Quite severe symptoms |
| | 5 Severe symptoms |
| | 6 Very severe symptoms |
| 3. In general, during the past week, how limited were you in your activities because of your asthma? | 0 Not limited at all |
| | 1 Very slightly limited |
| | 2 Slightly limited |
| | 3 Moderately limited |
| | 4 Very limited |
| | 5 Extremely limited |
| | 6 Totally limited |
| 4. In general, during the past week, how much shortness of breath did you experience because of your asthma? | 0 None |
| | 1 A very little |
| | 2 A little |
| | 3 A moderate amount |
| | 4 Quite a lot |
| | 5 A great deal |
| | 6 A very great deal |
| 5. In general, during the past week, how much of the time did you wheeze? | 0 Not at all |
| | 1 Hardly any of the time |
| | 2 A little of the time |
| | 3 A moderate amount of the time |
| | 4 A lot of the time |
| | 5 Most of the time |
| | 6 All the time |
| 6. On average, during the past week, how many puffs of short-acting bronchodilator (eg. Ventolin) have you used each day? | 0 None |
| | 1 1–2 puffs most days |
| | 2 3–4 puffs most days |
| | 3 5–8 puffs most days |
| | 4 9–12 puffs most days |
| | 5 13–16 puffs most days |
| | 6 More than 16 puffs most days |

To be completed by a member of the clinic staff

- | | |
|--|------------------|
| 7. FEV ₁ pre-bronchodilator: | 0 >95% predicted |
| FEV ₁ predicted | 1 95–90% |
| FEV ₁ % predicted | 2 89–80% |
| (Record actual values on the dotted lines | 3 79–70% |
| and score the FEV ₁ % predicted in the next | 4 69–60% |
| column) | 5 59–50% |
| | 6 <50% predicted |

©The Asthma Control Questionnaire is copyrighted. It may not be changed, translated or sold (paper or software) without the permission of Elizabeth Juniper.

- **ANEXO B**

Extração de sangue método de *salting-out*

1. O DNA é extraído de sangue periférico colhido num tubo com anticoagulante EDTA.
2. Transfere-se 2mL para um tubo rolhado e graduado de 10ml.
3. Adiciona-se 1 volume de TKM X-100 tendo o cuidado de adicionar parte deste tubo onde a amostra foi colhida de forma a evitar desperdícios de sangue.
4. Adiciona-se 25 μ L de IPGEPAL CA 630 por cada ml de sangue, com o objetivo de lisar as células, com conseqüente libertação de DNA e outros constituintes celulares.
5. O tubo é agitado 4-5vezes por inversão vigorosa.
6. Segue-se uma centrifugação a 2200rpm, à temperatura de aproximadamente 4°C e durante 15min., que deve ser repetida caso o *pellet* formado não adira ao fundo do tubo. NOTA: o travão da centrífuga tem de ser regulado para 0
7. O sobrenadante é rejeitado e ao *pellet* que contém, entre outros constituintes, o DNA, é adicionado 2mL de tampão TKM 1 por cada ml de sangue.
8. Centrifuga-se à mesma temperatura, a 1600rpm e por um período de 10min e são repetidos os passos de rejeição do *pellet* e adição de tampão TKM 1.
9. O passo anterior é repetido no máximo 2x de modo a ser obtido um *pellet* branco, evitando perdas excessivas de DNA.
10. Ressuspende-se o *pellet* (*vortex*) na solução TKM 2 numa proporção de 160 ml por ml de sangue.
11. Adiciona-se 10 μ L de SDS 10% por ml de sangue e a mistura é ressuspendida com o auxílio de uma micropipeta. Este reagente dissolve as proteínas ainda existentes em solução.
12. Incuba-se a 55°C por 10min.
13. Ao fim deste intervalo de tempo o conteúdo do tubo é transferido para um eppendorf ao qual se juntam 60 μ L de NaCl saturado por ml de sangue. Visualiza-se de imediato a precipitação de proteínas existentes na suspensão de DNA que formam uma fase branca opaca distinta de outra completamente transparente (suspensão de DNA).

14. Agita-se o tubo *ependorf* (*vortex*).
15. Centrifuga-se (centrífuga de *ependorfs*), a 1200rpm, à temperatura ambiente e por 30min (*salting-out*).
16. Verte-se o sobrenadante (que contém o DNA) resultante da centrifugação anterior para um tubo de vidro e adicionam-se 2 volumes de etanol absoluto gelado (colocado a -20°C cerca de 5min antes de ser utilizado).
17. O tubo, devidamente selado com parafilme, é invertido suavemente até precipitação do DNA.
18. Ressuspende-se o DNA em 200µL de tampão TE previamente colocados no tubo *ependorf* devidamente rotulado e armazena-se a 4°C.