

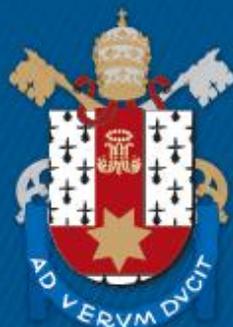
ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PEDIATRIA E SAÚDE DA CRIANÇA
DOUTORADO EM PEDIATRIA E SAÚDE DA CRIANÇA

MAGÁLI MOCELLIN

ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS DE IL-10 E
CÉLULAS T CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ EM ESCOLARES ASMÁTICOS

PORTO ALEGRE
2018

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

MAGÁLI MOCELLIN

**ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS DE IL-10 E
CÉLULAS T CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ EM ESCOLARES ASMÁTICOS**

Tese apresentada como requisito para obtenção do título de Doutora em Saúde da Criança pelo Programa de Pós-Graduação em Pediatria e Saúde da Criança da Escola de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Araújo Pinto

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Duarte de Souza

Porto Alegre

2018

Ficha Catalográfica

M688a Mocellin, Magáli

Associação entre polimorfismos de IL-10 e células T
CD4+CD25+FOXP3+ em escolares asmáticos / Magáli Mocellin . –
2018.

064 f.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em
Medicina/Pediatria e Saúde da Criança, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Araújo Pinto.

Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Duarte de Souza.

1. asma. 2. polimorfismo. 3. interleucina-10. 4. células T
regulatórias. I. Pinto, Leonardo Araújo. II. Souza, Ana Paula Duarte
de. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecária responsável: Salete Maria Sartori CRB-10/1363

MAGÁLI MOCELLIN

**ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS DE IL-10 E
CÉLULAS T CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ EM ESCOLARES ASMÁTICOS**

Tese apresentada como requisito para obtenção do título de Doutora em Saúde da Criança pelo Programa de Pós-Graduação em Pediatria e Saúde da Criança da Escola de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Araújo Pinto

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Duarte de Souza

Apresentada em 28 de março de 2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Cristian Roncada

Profa. Dra. Lidiane de Azeredo Leitão

Profa. Dra. Maria Teresa Vieira Sanseverino

Porto Alegre

2018

Dedicatória

Aos meus pais Caetano Mocellin (in memoriam) e Realda Ignez Bonatto Mocellin, pela vida.

Ao meu esposo Paulo Renato, aos meus filhos Fernando e Henrique, meu agradecimento pelo amor e apoio em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul e ao Programa de Pós-Graduação em Pediatria e Saúde da Criança da PUCRS, pelo ensino de qualidade;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida durante o estudo;

Aos pacientes e seus responsáveis, por aceitarem participar deste estudo e desta forma contribuir para o campo da pesquisa;

Ao professor e orientador Dr. Leonardo Araújo Pinto, meus sinceros agradecimentos pelos seus ensinamentos, e minha admiração por sua dedicação e conhecimento a serviço da saúde e do ensino;

À professora e coorientadora Dra. Ana Paula Duarte de Souza, pelo seu imenso conhecimento de Imunologia, por sua dedicação e empenho;

Ao meu amado esposo Paulo Renato Vasques Kulpa pelo amor, carinho e apoio em todos os momentos e aos nossos filhos Fernando e Henrique, extensão do nosso amor;

À secretária Carla Carmo de Melo Rothmann (PPG-Pediatria), pela amizade e apoio;

A todos os colegas do Centro Infant, pela amizade e apoio. Um agradecimento especial aos colegas Krist Antunes, Tiago Fazolo e Rodrigo Benedetti Gassen, por compartilharem seus conhecimentos na área da Imunologia.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional.

Muito obrigada!

RESUMO

Introdução: a asma é a doença crônica mais frequente na infância. No Brasil, a doença apresenta-se com altas taxas de prevalência e de incidência, segundo dados do DATASUS. A inflamação e a hiperresponsividade na asma são desencadeadas por várias células do sistema imune nas vias aéreas. A interleucina-10 (IL-10) é uma citocina anti-inflamatória e seus níveis estão geralmente diminuídos nos asmáticos. Alguns polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) do gene da IL-10 foram associados à asma. Além disso, a IL-10 pode potencializar a diferenciação de células T reguladoras (Tregs). Estudos mostraram que um desequilíbrio no número e / ou função dessas células pode estar relacionado ao desenvolvimento da asma.

Objetivos: o objetivo principal deste estudo foi avaliar a associação entre os polimorfismos do gene da IL-10 e a gravidade da asma em uma amostra de escolares. Como objetivos secundários, investigou-se a associação entre os genótipos de IL-10 e a frequência de linfócitos T regulatórios (Tregs) e a associação entre os genótipos da IL-10 e os níveis da proteína IL-10.

Métodos: quatro polimorfismos do gene da IL-10 (rs1518111, rs3024490, rs3024496, rs3024491) foram genotipados em escolares asmáticos e controles de Porto Alegre (Brasil) utilizando PCR em tempo real. As células Tregs e os níveis da proteína IL-10 foram analisados em células mononucleares do sangue periférico por citometria de fluxo. A gravidade da asma foi definida de acordo com a diretriz do GINA.

Resultados: cento e vinte e três escolares asmáticos e cinquenta e oito controles participaram do estudo. O SNP rs3024491 (alelo T) associou-se à gravidade da asma, apresentando maior frequência nos pacientes do grupo asma moderada. O alelo T da variante rs3024491 também mostrou uma associação com níveis reduzidos de IL-10 ($p = 0,01$) e com a frequência de células Tregs aumentada ($p = 0,01$). As outras variantes não apresentaram associações consistentes.

Conclusões: nossos resultados sugerem que a asma moderada / grave está associada a uma maior frequência do alelo T no SNP rs3024491. Além disso, a variante rs3024491 (TT) foi associada a uma redução na produção de IL-10 e um aumento na porcentagem de células Tregs, sugerindo possíveis mecanismos que influenciam a gravidade da asma.

Palavras-chave: asma, interleucina-10, polimorfismo, células T reguladoras.

ABSTRACT

Introduction: asthma is the most common chronic illness in childhood. In Brazil, the disease presents high rates of prevalence and incidence, according to DATASUS data. Inflammation and hyperresponsiveness in asthma are triggered by various cells of the immune system in the airways. Interleukin-10 (IL-10) is an anti-inflammatory cytokine and its levels are generally decreased in asthmatics. Some single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the IL-10 gene were associated with asthma. In addition, IL-10 may potentiate the differentiation of regulatory T cells (Tregs). Studies have shown that an imbalance in the number and / or function of these cells may be related to the development of asthma.

Objectives: the main objective of this study was to evaluate the association between IL-10 gene polymorphisms and asthma severity in a sample of schoolchildren. As secondary objectives, we investigated the association between IL-10 genotypes and the frequency of regulatory T lymphocytes (Tregs) and the association between IL-10 genotypes and IL-10 protein levels.

Methods: four polymorphisms of the IL-10 gene (rs1518111, rs3024490, rs3024496, rs3024491) were genotyped in asthmatic schoolchildren and controls from Porto Alegre (Brazil) using real-time PCR. Tregs cells and IL-10 protein levels were analyzed in peripheral blood mononuclear cells by flow cytometry. Asthma severity was defined according to the GINA guideline.

Results: one hundred twenty-three asthmatic schoolchildren and fifty-eight controls participated in the study. The SNP rs3024491 (T allele) was associated with the severity of asthma, presenting a higher frequency in patients in the moderate asthma group. The T allele of variant rs3024491 also showed an association with reduced IL-10 levels ($p = 0.01$) and increased Tregs cells frequency ($p = 0.01$). The other variants did not present consistent associations.

Conclusions: our results suggest that moderate / severe asthma is associated with a higher frequency of the T allele in the SNP rs3024491. In addition, the variant rs3024491 (TT) was associated with a reduction in IL-10 production and an increase in the percentage of Tregs cells, suggesting possible mechanisms that influence the severity of asthma.

Keywords: asthma, interleukin-10, polymorphism, regulatory T cells.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Fluxograma com a amostra inicial e final do estudo. | 59 |
| Figura 2. Estrutura do gene da IL-10..... | 62 |
| Figura 3. Pairwise Linkage disequilibrium no Haploview usando a estatística R' ao quadrado para o gene da IL-10. | 63 |
| Figura 4. Associação entre o SNP rs3024491 do gene da IL-10 e os níveis de IL-10 (a), gravidade da asma (b) e expressão de Tregs (c). | 64 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Dados descritivos da amostra comparando o grupo em estudo versus o grupo controle..... | 60 |
| Tabela 2 - Variantes do gene da IL-10 incluídas no estudo. | 61 |

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

| | |
|----------------------|--|
| Anti-CD3 | Anticorpo anti-CD3 |
| Anti-CD4 | Anticorpo anti-CD4 |
| Anti-CD25 | Anticorpo anti-CD25 |
| Anti-CD28 | Anticorpo anti-CD28 |
| CD | Grupo de diferenciação |
| CDs | Células dendríticas |
| CD4 | Grupo de diferenciação 4 |
| CD8 | Grupo de diferenciação 8 |
| CD25 | Grupo de diferenciação 25 |
| CD44 | Grupo de diferenciação 44 |
| CD45RB low | Grupo de diferenciação 45RB <i>low</i> |
| CD62L | Grupo de diferenciação 62L |
| CD152 | Grupo de diferenciação 152 |
| CD357 | Grupo de diferenciação 357 |
| CEP | Comitê de Ética em Pesquisa |
| CSIF | Fator inibidor de síntese de citocinas |
| CT | Limiar de ciclo (<i>threshold cycle</i>) |
| CVF | Capacidade vital forçada |
| dbSNP | Base de dados dos polimorfismos de nucleotídeo único |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| DPBS | Solução salina tamponada com fosfato |
| EDTA | Ácido etilenodiamino tetra-acético |
| FEF (25%-75%) | Fluxo expiratório forçado entre 25% e 75% |
| Foxp3 | Fator de transcrição <i>forkhead box P3</i> |
| GATA-3 | Fator de transcrição GATA-3 |
| gDNA | Ácido desoxirribonucleico genômico |
| GINA | Iniciativa global para a asma |
| GLI | Iniciativa global da função pulmonar |
| GM-CSF | Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos |
| GWAS | Estudo de associação do genoma inteiro |
| IgE | Imunoglobulina E |

| | |
|---|--|
| IL | Interleucina |
| IL-3 | Interleucina-3 |
| IL-4 | Interleucina-4 |
| IL-5 | Interleucina-5 |
| IL-9 | Interleucina-9 |
| IL-10 | Interleucina-10 |
| IL-13 | Interleucina-13 |
| IPEX | Síndrome da desregulação imune, poliendocrinopatia e enteropatia ligada ao X |
| ISAAC | Estudo Internacional de Asma e Alergia na Infância |
| iTreg | Célula T regulatória induzida |
| kU / L | Kilo unidades por litro |
| LBA | Lavado broncoalveolar |
| DL | Desequilíbrio de ligação |
| LT | Leucotrieno |
| LTRA | Antagonista do receptor de leucotrieno |
| MAF | Frequência do menor alelo |
| MHCII | Complexo principal de histocompatibilidade de classe II |
| NCBI | Centro Nacional de Informações Biotecnológicas |
| NKT | Linfócito T <i>natural killer</i> |
| nTreg | Célula T regulatória natural |
| OR | Razão de chances |
| PBMCs | Células mononucleares do sangue periférico |
| Pg/ml | Picograma por mililitro |
| Proteinase K | Serino-protease |
| pTreg | Célula T regulatória periférica |
| Real-Time PCR | Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real |
| SNP | Polimorfismo de nucleotídeo único |
| TCD4 | Linfócito T do grupo de diferenciação 4 |
| T CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ | Células T regulatórias |
| TGF-β | Fator transformador de crescimento beta |
| Th1 | Célula T helper 1 |

| | |
|----------------------------|--|
| Th2 | Célula T helper 2 |
| Th3 | Célula T helper 3 |
| Th9 | Célula T helper 9 |
| Th17 | Célula T helper 17 |
| Th22 | Célula T helper 22 |
| Treg | Célula T regulatória |
| tTreg | Célula T regulatória derivada do timo |
| Tr1 | Célula T regulatória 1 |
| UFRGS | Universidade Federal do Rio Grande do Sul |
| VEF₁ | Volume expiratório forçado no primeiro segundo |
| VEF₁/CFV | Razão entre volume expiratório forçado no primeiro segundo e a capacidade vital forçada (Índice de <i>Tiffenau</i>) |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 15 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA..... | 18 |
| 2.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA ASMA E FENÓTIPOS | 18 |
| 2.2 SISTEMA IMUNE NA ASMA | 19 |
| 2.3 LINFÓCITOS T CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁺ | 20 |
| 2.4 A INTERLEUCINA-10 (IL-10) | 22 |
| 2.5 O GENE DA IL-10 E ESTUDOS RELACIONADOS | 23 |
| 3 HIPÓTESE..... | 25 |
| 4 OBJETIVOS | 26 |
| 4.1 OBJETIVO PRINCIPAL..... | 26 |
| 4.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS | 26 |
| 5 MATERIAIS E MÉTODOS | 27 |
| 5.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO E TAMANHO DA AMOSTRA | 27 |
| 5.2 SELEÇÃO DA AMOSTRA E ETAPAS DO ESTUDO | 27 |
| 5.3 CLASSIFICAÇÃO DE SEVERIDADE DOS PACIENTES ASMÁTICOS | 28 |
| 5.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO | 28 |
| 5.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO | 28 |
| 5.6 AVALIAÇÃO DE ATOPIA..... | 28 |
| 5.7 ESPIROMETRIA | 29 |
| 5.8 SELEÇÃO DOS POLIMORFISMOS DE IL-10..... | 29 |
| 5.9 COLETA DE SANGUE | 30 |
| 5.10 EXTRAÇÃO DO gDNA | 30 |
| 5.11 GENOTIPAGEM..... | 31 |
| 5.12 ANÁLISE DA FREQUÊNCIA DAS CÉLULAS T REGULATÓRIAS E PRODUÇÃO DA IL-10 | 31 |
| 5.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA | 32 |
| 5.14 ASPECTOS ÉTICOS | 32 |

| | |
|---|-----------|
| 6 CONCLUSÕES..... | 34 |
| 7 REFERÊNCIAS | 35 |
| ANEXO..... | 40 |
| ANEXO 1 – APROVAÇÃO CEP..... | 41 |
| ANEXO 2 – APROVAÇÃO PLATAFORMA BRASIL..... | 42 |
| APÊNDICE | 43 |
| APÊNDICE 1 – ARTIGO ORIGINAL | 44 |

1 INTRODUÇÃO

A asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas inferiores, multifatorial e complexa, resultante da interação entre diferentes genes e fatores ambientais.^{1,2} A doença apresenta elevada prevalência mundial em adultos e em crianças, e ocorre tanto em países desenvolvidos, quanto nos países em desenvolvimento. Atualmente são, aproximadamente, 300 milhões de pessoas acometidas pela doença, acarretando altos custos aos serviços públicos de saúde. Estima-se que até 2025 poderão ser diagnosticados 100 milhões de casos novos devido às mudanças ambientais, associadas ao desenvolvimento e a urbanização.³ Além do elevado custo social, a asma ocasiona prejuízo na frequência escolar, laboral e na qualidade de vida do doente e de seus familiares. Dentre os vários fatores de risco que podem estar relacionados ao desenvolvimento da doença e ao aumento de sua prevalência estão os estímulos ambientais, o estilo de vida moderno, fatores psicossociais, nutricionais, genéticos e epigenéticos.⁴

A asma é a doença crônica mais frequente na infância e no Brasil a doença apresenta-se com elevadas taxas de prevalência e de incidência nesta população (DATASUS – www.datasus.gov.br). Um estudo de revisão usando o questionário ISAAC (*International Study of Asthma and Allergies in Childhood*), realizado por Solé e colaboradores⁵ em vários centros do país em crianças e adolescentes, mostrou que a prevalência média da asma ativa na população pediátrica e de adolescentes é em torno de 24,3% e 19% respectivamente, variando entre as cidades de cada região do país. Esta variação da prevalência em crianças de 6-7 anos oscilou entre 16,5% a 31,2%, e, em adolescentes de 13-14 anos a prevalência variou entre 11,8% a 30,5%.⁵ Outro estudo de 2012 realizado em Porto Alegre, na região sul do país, por Roncada et al,⁶ mostrou que a prevalência da doença nesta capital é bastante alta, em torno de 20%. O estudo também mostrou outros dados importantíssimos: em 251 escolares da fase III do protocolo ISAAC, com média de idade de $10,36 \pm 2,05$ anos, 44,5% desta população não tinham a doença controlada e 71,7% dos pacientes com asma não controlada não faziam acompanhamento médico regular.⁶

De acordo com o *guideline* do GINA (www.ginasthma.org), a asma é classificada em 5 níveis de gravidade: intermitente, persistente leve, persistente moderada, grave e grave resistente à terapia. Cada nível de gravidade exige uma forma de tratamento específico, a fim de controlar a doença.

A asma caracteriza-se pela inflamação e pela hiperresponsividade da via aérea, havendo o envolvimento de muitas células do sistema imune inato e adaptativo neste processo.^{7,8} A doença, inicialmente, foi caracterizada como uma inflamação alérgica do tipo T *helper* 2 (Th2) com produção de citocinas como a interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5) e interleucina-13 (IL-13), imunoglobulina E (IgE) e resposta eosinofílica. Porém, atualmente, há evidências de que outras células, como as células NKT (linfócitos T *natural killer*) do sistema imune inato, e outras células do sistema imune adaptativo além das Th2, como as T *helper* 17 (Th17) e as T regulatórias (Tregs), também participam da sua patogênese, atuando sozinhas ou em conjunto.⁸ Devido a essa gama de células envolvidas, a asma apresenta manifestações clínicas de intensidade variada, que vão depender da gravidade da inflamação desencadeada e, como consequência, o grau de obstrução das vias aéreas. Esta variação nas manifestações clínicas também pode ser influenciada por fatores genéticos, pois muitos genes estão relacionados à doença, podendo influir na sua etiologia.

As interleucinas (ILs) são proteínas produzidas por várias células que desempenham um importante papel na modulação da resposta imune, ativando ou suprimindo esta resposta, sendo consideradas citocinas pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias. Desequilíbrio na produção destes dois grupos de citocinas compromete a função adequada deste sistema.⁹ A interleucina-10 (IL-10) é uma citocina pleiotrópica, ou seja, apresenta diferentes funções biológicas em diferentes tipos celulares, tendo importante ação anti-inflamatória e imunorreguladora. É produzida por várias células do sistema imune, como monócitos, macrófagos, mastócitos, neutrófilos, células dendríticas (CDs), linfócitos T e B,⁹ entre outras, sendo as células T regulatórias 1 (Tr1) uma das principais fonte de IL-10.¹⁰ A principal função da IL-10 é suprimir a produção de citocinas pró-inflamatórias, bem como quimiocinas, receptores de quimiocinas e enzimas inflamatórias.¹¹ A expressão da IL-10 está frequentemente diminuída em asmáticos, sugerindo um importante papel desta citocina na patogênese da doença.¹²⁻¹⁴

A IL-10 pode também potencializar a diferenciação das células T regulatórias (Tregs).¹⁵ As Tregs são um tipo de linfócito T CD4⁺ responsáveis pela manutenção do

Introdução

equilíbrio entre a ativação e a tolerância da resposta imune, atuando na regulação de doenças inflamatórias como a asma.¹⁶

Além dos fatores ambientais, fatores genéticos têm forte influência na etiologia da asma. Estudos com gêmeos monozigóticos e dizigóticos mostraram que a asma apresenta uma herdabilidade de aproximadamente 60%.¹⁷⁻¹⁹ Um dos fatores genéticos mais associados ao risco de asma são os chamados Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs). O polimorfismo de nucleotídeo único consiste na troca de um único nucleotídeo, em um determinado locus gênico, numa frequência na população \geq a 1%. Essa troca de nucleotídeo pode afetar a expressão gênica ou a função proteica. O gene da IL-10 está localizado no cromossomo 1q31-32, uma região genômica frequentemente associada à asma e a fenótipos relacionados à atopia.^{20, 21} Alguns polimorfismos do gene da IL-10 foram relacionados à asma e os mais estudados estão na região promotora do gene.²²⁻²⁴ Estes SNPs compreendem as variantes rs1800896 (-1082A/G), rs1800871 (-819T/C) e rs1800872 (-592A/C). Recentemente, um estudo realizado na Índia mostrou associação de dois SNPs do gene da IL-10 (rs 1800896 e rs1800871) com a asma.²⁵

Portanto, o objetivo principal deste estudo foi avaliar a associação entre polimorfismos de IL-10 e a gravidade da asma em uma amostra de escolares. Como objetivos secundários, investigar a associação entre genótipos de IL-10 dos pacientes asmáticos com a frequência de linfócitos T CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ (Tregs) e a associação entre os genótipos de IL-10 e os níveis da proteína IL-10 no sobrenadante de células mononucleares estimuladas com anticorpo anti-CD3 (anti-CD3) e anticorpo anti-CD28 (anti-CD28).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA ASMA E FENÓTIPOS

A asma atópica é o fenótipo mais típico da asma,²⁶ caracterizado por uma resposta Th2. No entanto, alguns estudos mostraram que os neutrófilos também estão aumentados na asma, sendo associados à asma não atópica ou não-alérgica.^{27,28} Há décadas a asma tem sido classificada em atópica e não-atópica.²⁹ Na asma atópica clássica, os pacientes apresentam os sintomas da doença ainda na infância, geralmente apresentam história familiar e teste cutâneo positivo para alergias, níveis de IgE elevados, escarro do tipo eosinofílico e a resposta alérgica é mediada principalmente por citocinas do tipo Th2.⁷ Pode ocorrer a ativação de mastócitos que sofrem degranulação, liberando mediadores pró-inflamatórios como histamina, leucotrienos e prostaglandinas. Estes pacientes geralmente respondem à terapia tradicional com corticoides e β -2 agonistas. O tratamento profilático com corticoide inalatório diário é importante para o controle da doença, pois reduz a ocorrência frequente das crises, a gravidade das mesmas e a perda progressiva da função pulmonar. A medicação anti-inflamatória também reduz o número de atendimentos nas emergências, o número de hospitalizações e recupera a qualidade de vida do asmático, pois melhora a função pulmonar, a hiperresponsividade brônquica e diminui a broncoconstrição induzida pelo exercício.³⁰

Na asma não-atópica, os pacientes têm maior probabilidade de apresentar sintomatologia clínica bem semelhante aos atópicos, porém apresentam teste negativo para atopia, não apresentam história familiar de atopia e, geralmente, a doença manifesta-se tardiamente. Na asma não-atópica, os pacientes frequentemente têm níveis normais de IgE e escarro neutrofilico. Esses pacientes podem responder melhor ao tratamento com antagonistas dos receptores dos leucotrienos (LTRAs) (antileucotrienos). Os leucotrienos (LT) são mediadores lipídicos importantes envolvidos na fisiopatologia da asma. A produção de LT está aumentada em torno de 5 a 10 vezes nos indivíduos com asma do que nos não asmáticos.³¹ A asma atópica e não atópica se diferenciam pelo aumento e normalidade nos valores de anticorpos IgE em resposta aos alérgenos do ar ambiente (aeroalérgenos).

Existe também um subgrupo de pacientes asmáticos com asma severa que geralmente não respondem adequadamente ao tratamento convencional, mesmo em altas doses. São pacientes com asma alérgica grave resistente à terapia. Estes pacientes podem responder melhor ao tratamento com o anticorpo monoclonal recombinante humanizado, o Omalizumabe® subcutâneo, um anticorpo anti-IgE.³² Este tratamento é específico para este tipo de fenótipo. Sendo assim, podemos dizer que os diferentes fenótipos de asma requerem diferentes abordagens de tratamento.

Embora a asma seja uma patologia crônica com alta prevalência mundial, os estudos até o momento não proporcionaram a cura da doença. O tratamento atual proposto tem como objetivos principais controlar as exacerbações da doença e evitar a perda progressiva da função pulmonar.

2.2 SISTEMA IMUNE NA ASMA

Várias células do sistema imune inato e adaptativo participam da patogênese da asma, no qual a resposta imune adaptativa tem um papel de destaque. A resposta imune adaptativa é dividida em resposta humoral e resposta celular. Os linfócitos T CD4⁺, pertencente à resposta celular, podem secretar diversos tipos de citocinas, classificando-os, posteriormente, em diferentes subtipos, com funções específicas. Inicialmente, as células T CD4⁺ ativadas foram classificadas por Mossman e Coffman³³ em células T CD4⁺ do tipo *helper* 1 (Th1) e 2 (Th2), que diferiam uma da outra pelo padrão de citocinas produzidas por elas a fim de se diferenciarem em células T efetoras, com suas respectivas funções. A presença significativa de células Th2 nas vias aéreas de pacientes asmáticos a definiu como uma doença alérgica induzida por estas células.³⁴ Posteriormente, outras células T CD4⁺ efetoras foram descobertas e estudos mostraram que as mesmas também estão envolvidas na patogênese da asma, como as células Th17,^{35,36} as células Tregs^{37,38} e mais recentemente as T *helper* 9 (Th9),³⁹ bem como as células Th1.⁴⁰ Todos os fenótipos de células T CD4⁺ podem participar da resposta imune na asma, podendo haver a participação de um só tipo ou de mais de um tipo celular,^{8,41} evidenciando a complexidade das interações imunológicas na doença. Esta participação vai depender da resposta imune do indivíduo. Devido à população de células T CD4⁺ ser heterogênea, e

devido também à sua plasticidade, estas células podem expressar outras moléculas que vão caracterizá-las como outro tipo de célula T, dependendo das citocinas efetoras presentes no microambiente.⁸ Todo este contexto evidencia a complexidade da asma.

As principais características da asma são a inflamação e a hiperresponsividade da via aérea, manifestadas no paciente através da sibilância, dispneia, sensação de opressão no peito e tosse contínua, principalmente à noite ou início da manhã. Estas características são decorrentes principalmente da resposta imune de citocinas Th2 (IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13)⁴². Na resposta Th2, as células T CD4⁺ começam a expressar o fator de transcrição GATA-3 e a secretar as citocinas pró-inflamatórias IL-3, IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, perpetuando esta resposta. Estas citocinas apresentam inúmeras funções como aumentar a sobrevivência e ativação dos eosinófilos nos pulmões, induzir o linfócito B a fazer a mudança de classe de imunoglobulinas para IgE, provocar a hiperplasia das células caliciformes de Goblet, aumentando a produção de muco, e fazer o remodelamento tecidual das vias aéreas através da potente ação destas citocinas inflamatórias na musculatura lisa dos brônquios. Como resultado, o epitélio pulmonar destes pacientes apresenta edema significativo, hipersecreção de muco e broncoespasmo, podendo levar à obstrução da via aérea. Este dano no epitélio, causado pela resposta Th2, é mediado por eosinófilos caracterizando a asma atópica ou alérgica.²⁶

2.3 LINFÓCITOS T CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺

As células Tregs, também denominadas de células T CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺, são uma subpopulação dos linfócitos TCD4⁺. São células reguladoras responsáveis pela manutenção do equilíbrio entre a ativação e a tolerância da resposta imune.⁴³ Sua ação acontece através de vários mecanismos, entre eles a produção de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 e TGF- β (Fator Transformador de Crescimento beta). As Tregs desempenham um papel fundamental neste processo ativo de homeostase da via aérea, atuando no controle da resposta imune de doenças inflamatórias como a asma, não deixando a inflamação exacerbar. Porém, sua função pode estar alterada em pacientes asmáticos⁴⁴. Neste contexto, alguns estudos em modelo animal mostraram o envolvimento das Tregs no desenvolvimento da asma alérgica.^{45,46}

As Tregs podem expressar vários marcadores de superfície que podem ajudar na sua identificação, como CD45RB low (*Cluster of Differentiation 45RB low*), CD62L (*Cluster of Differentiation 62L*), CD152 (*Cluster of Differentiation 152*), CD357 (*Cluster of Differentiation 357*), entre outros. No entanto, os principais marcadores de superfície das Tregs são CD4⁺ (*Cluster of Differentiation 4*), CD25⁺ (*Cluster of Differentiation 25*) e o fator de transcrição Foxp3 (*Factor forkhead box P3*). Até o momento, o fator de transcrição FoxP3 é o marcador que melhor caracteriza o fenótipo e a função da célula Treg.⁴⁷

O gene *FoxP3* humano está localizado no braço curto do cromossomo 10 (10p11-23). Consiste de 14 éxons e codifica uma proteína de 431 aminoácidos, também denominada FoxP3 (www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/50943). Tanto em camundongos quanto em humanos, mutações neste gene causam importante desregulação do sistema imune, ocasionando doenças graves com óbito precoce. Em camundongos, determinam doenças autoimunes graves, com depleção completa das células T regulatórias. Em humanos, mutações neste gene causa uma doença fatal chamada de síndrome IPEX (*Immunodeficiency Poliendocrinopathy and Enteropathy X-linked Syndrome*). Esta síndrome acomete meninos e também se caracteriza por várias doenças autoimunes, levando a criança ao óbito em torno dos dois anos de idade.⁴⁸ A proteína FoxP3 é um fator de transcrição cuja função é exercida sobre regiões reguladoras específicas dentro do DNA, aumentando ou suprimindo a transcrição de genes específicos.

São conhecidas duas subpopulações de células Tregs com diferentes funções: célula T regulatória natural (nTreg) também denominada, segundo consenso de Abbas e colaboradores em 2013,⁴⁹ de célula T regulatória derivada do timo (tTreg), cuja principal função é mediar a tolerância a antígenos próprios, e a célula T regulatória induzida (iTreg) ou célula T regulatória periférica (pTreg), produzida fora do timo, nos tecidos linfoides periféricos. A pTreg possui especificidade contra antígenos microbianos ou alérgenos ambientais (antígenos não-próprios). São particularmente enriquecidas no trato gastrointestinal e nos pulmões durante a inflamação crônica. As células pTregs apresentam dois subpopulações de acordo com a expressão de citocinas: as células Tr1, responsável pela expressão da IL-10, com ou sem produção de TGF- β , e as células T *helper* 3 (Th3), produtora de TGF- β .⁵⁰

Tendo em vista que, além das células Th2, outros subtipos de células T CD4⁺ estão envolvidos na asma, a atuação das células Tregs tem sido intensamente investigada, tanto no lavado broncoalveolar (LBA), quanto no sangue destes pacientes. Estudos têm mostrado que há uma relação entre as Tregs e a asma e evidenciam que vários mecanismos podem estar envolvidos, sugerindo uma relação direta entre as Tregs e a asma através do aumento da frequência destas células em pacientes asmáticos quando comparados com os controles.^{37,38} No entanto, outros estudos mostraram que o número e a função das Tregs também podem estar diminuídos em pacientes asmáticos, quando comparados com indivíduos saudáveis^{51,52}, e conseqüentemente falham em fazer algumas de suas funções como suprimir as células T efectoras e a resposta Th2.⁵² Na relação direta Treg e asma pode ocorrer aumento de Tregs nos pacientes asmáticos sem significar mais supressão. Raedler et al³⁸ propõem que o aumento da frequência das células T regulatórias nos pacientes asmáticos, provavelmente, é devido a um mecanismo de contrabalanço da resposta imune, onde num ambiente inflamado o organismo reage produzindo mais Tregs na tentativa de controlar a inflamação. As células Tregs são importantes na supressão da inflamação, mas se sua função supressora está prejudicada, a reação do sistema imune seria de aumentar a produção destas células.

2.4 A INTERLEUCINA-10 (IL-10)

A proteína codificada pelo gene da IL-10 é uma citocina com importante ação anti-inflamatória. Foi descrita em 1989 por Fiorentino et al sendo inicialmente denominada fator inibidor de síntese de citocinas (CSIF), devido sua habilidade de inibir a síntese de várias outras citocinas.⁵³ Muitas células do sistema imune inato e adaptativo produzem IL-10, entre elas, as CD4⁺, as células NKs, monócitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, células B, células T CD8⁺ e T CD4⁺ (Th1, Th2, Th17, Th22 e Tregs).⁹ As Tr1, derivadas das células pTregs, produzem altos níveis de IL-10.¹⁰

Alguns estudos mostraram uma associação inversa entre os níveis da IL-10 e a asma.¹²⁻¹⁴ Borish e colaboradores mostraram que a média dos níveis de IL-10 no LBA de asmáticos foi menor (9pg/mL) do que nos controles (130pg/mL).¹² Portanto, a deficiência ou redução de IL-10 pode ter um importante papel na patogênese da asma.

Por fim, a IL-10 possui importante ação na regulação do sistema imune e, como uma citocina imunossupressora, apresenta várias funções como inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias, inibir a função das células apresentadoras de antígeno, bloqueando a maturação das CDs, regular negativamente a expressão de moléculas MHC de classe II (Complexo principal de histocompatibilidade de classe II) e moléculas co-estimuladoras, suprimir os macrófagos, os monócitos e os linfócitos T.¹¹ Em contraste a este efeito imunossupressor nos linfócitos T, nos linfócitos B a IL-10 melhora sua proliferação, sua diferenciação e a produção de anticorpos.⁵⁴ Todas estas funções caracterizam o efeito pleiotrópico da IL-10 na asma.

2.5 O GENE DA IL-10 E ESTUDOS RELACIONADOS

Pelo fato da asma ser uma doença complexa envolvendo a interação de diferentes genes e fatores ambientais, diversos estudos de associação genética usando *Genome-Wide Association Study* (GWAS) têm sido realizados a fim de investigar a influência dos polimorfismos genéticos na doença. A variação na sequência de um nucleotídeo, que caracteriza o polimorfismo, pode levar a uma alteração na expressão do gene ou na função da proteína, podendo predispor um indivíduo a doenças. Esta função alterada do gene ou da proteína pode estar relacionada a uma maior ou menor susceptibilidade em desenvolver determinadas patologias, bem como influenciar os fatores que determinam sua gravidade (www.hapmap.org). Os polimorfismos de IL-10 estão entre essas variações genéticas que podem estar associados à susceptibilidade genética do indivíduo à asma. O gene da IL-10 está localizado no cromossomo 1q31-32, uma região associada à asma e a fenótipos associados à atopia.^{20, 21} Este gene apresenta um tamanho de 4,89 kb⁵⁵ e tem cinco éxons e quatro íntrons. Os polimorfismos do gene da IL-10 mais estudados estão na região promotora do gene e compreendem os polimorfismos A-1082G (rs1800896), T-819C (rs3021097) e o polimorfismo A-592C (rs1800872). Essas três variantes têm sido associadas a modificações na expressão da IL-10.⁵⁵ Três recentes metanálises²²⁻²⁴ analisaram estes três polimorfismos e o risco de asma, mas os resultados não foram conclusivos.

Na metanálise de 2012²², 17 estudos fizeram parte da análise final (4478 asmáticos e 4803 controles). Os estudos foram realizados em adultos, em crianças e em adultos e

crianças. O grupo observou associações significativas entre os polimorfismos -1082A/G e -592A/C do gene da IL-10 e o risco de asma em asiáticos, caucasianos, egípcios e caucasianos africanos. No entanto, não houve associação significativa com o polimorfismo -819T/C. Na metanálise de 2013²³, 11 estudos fizeram parte do estudo final (2215 asmáticos e 2170 controles). Estes estudos foram realizados em população europeia e da Ásia. Esta metanálise concluiu que o polimorfismo -1082G/A do gene da IL-10 confere susceptibilidade à asma em sujeitos adultos do leste asiático. Os polimorfismos -592C/A e -819C/T e seus haplótipos não estavam associados à doença. Na metanálise de 2014²⁴, 23 estudos fizeram parte da análise final (4716 asmáticos e 5093 controles). Dos 23 estudos, 15 foram realizados em populações asiáticas, seis em caucasianos e dois estudos em africanos. Destes 23 estudos, 10 foram realizados em adultos, 11 estudos em crianças e dois estudos foram realizados em ambas as populações, adultos e crianças. Esta metanálise concluiu que os polimorfismos do gene promotor de IL-10 -1028A/G e -592A/C provavelmente se correlacionam com a susceptibilidade à asma, principalmente em asiáticos com asma atópica. Não houve associação do polimorfismo -819T/C. Os haplótipos -1082/-819/-592 podem predispor ao aumento da susceptibilidade à asma.

Em resumo, vários estudos de associação genética foram realizados em populações europeias, africanas e asiáticas para examinar o papel dos polimorfismos de IL-10 na asma. No entanto, ainda não são bem conhecidos quais os polimorfismos associados ao risco de asma na população brasileira, bem como o mecanismo pelos quais estes polimorfismos têm um efeito no risco ou na gravidade da doença.

3 HIPÓTESE

O gene da IL-10 está localizado numa região associada à asma. Vários estudos de associação genética foram realizados em diversas populações a fim de examinar o papel de polimorfismos do gene da IL-10 na asma. No entanto, não existem estudos de associação genética deste gene em amostra de escolares com desfecho em asma no Brasil. A nossa hipótese é de que possa existir uma associação entre polimorfismos de IL-10 e a gravidade de asma, bem como os níveis da proteína IL-10 e a frequência das células T regulatórias.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO PRINCIPAL

O objetivo deste trabalho é avaliar a associação entre polimorfismos de IL-10 e a gravidade da asma em uma amostra de escolares.

4.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

4.2.1 Investigar a associação entre os genótipos do gene da IL-10 e os níveis da proteína IL-10 no sobrenadante de células mononucleares estimuladas com anti-CD3 e anti-CD28;

4.2.2 Investigar a associação entre genótipos de IL-10 dos pacientes asmáticos com a frequência de linfócitos T CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ (Tregs).

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO E TAMANHO DA AMOSTRA

Este é um estudo de associação genética com delineamento de caso-controle aninhado. Em um estudo de associação genética, quando consideramos uma frequência alélica de 0,04 (40%), uma força de associação com Odds Ratio (OR) = 2, um poder de 90% e α de 0,001, o número total estimado seria de 177 pacientes.⁵⁷ Fazem parte da análise final deste estudo de associação genética 123 casos e 58 controles, totalizando 181 pacientes, sendo considerado um tamanho amostral suficiente.

5.2 SELEÇÃO DA AMOSTRA E ETAPAS DO ESTUDO

Este estudo está associado ao projeto Bright, já aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP/PUCRS) sob o número 10/04978, Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) sob o número 16.083 e pela Secretaria Municipal de Saúde de Porto Alegre (CEP/SMS). A amostra do estudo, composta de crianças de 8 a 14 anos, foi selecionada em escolas públicas de Porto Alegre. O estudo foi dividido em três etapas: 1. Questionário ISAAC⁵ para avaliar a prevalência de asma; 2. Avaliação dos fenótipos e controle da asma através de procedimentos simples como questionário GINA - Iniciativa Global para a Asma (www.ginasthma.org) e teste de função pulmonar; 3. Coleta de sangue para avaliação de atopia com IgE específica, para estudos de marcadores inflamatórios e genotipagem.

Foi utilizado o questionário ISAAC, a fim de selecionar a população de asmáticos. Após, as crianças diagnosticadas com a doença passaram por uma série de procedimentos de avaliação nas fases 2 e 3: espirometria, testes para aero-alérgenos e pesquisa de marcadores inflamatórios no sangue. Por último, foi realizada a genotipagem das amostras (casos e controles). O grupo controle era de escolares da mesma rede de ensino, mesma faixa etária, sem diagnóstico de asma pelo questionário ISAAC.⁵

5.3 CLASSIFICAÇÃO DE SEVERIDADE DOS PACIENTES ASMÁTICOS

A severidade da asma foi definida por um médico de acordo com o *guideline* do GINA, e os sujeitos da pesquisa foram classificados em asmáticos intermitentes, persistentes leves, persistentes moderados, graves, graves resistentes à terapia e controles.

5.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Os critérios de inclusão para o grupo casos foram: escolares de 08 a 14 anos do ensino público de Porto Alegre, com diagnóstico de asma pelo questionário ISAAC, no período de março de 2011 a dezembro de 2012, segundo os seguintes critérios: sim para o diagnóstico da asma, sim para chiado nos últimos 12 meses, sim para uso de medicação para asma nos últimos 12 meses, ou diagnóstico para asma mais sibilos ou diagnóstico de asma mais medicação. Para o grupo controle foi selecionada uma amostra de escolares da mesma idade, do ensino público de Porto Alegre sem diagnóstico de asma no mesmo período, segundo os seguintes critérios: não para o diagnóstico de asma, não ter chiado nos últimos 12 meses, e não fazer uso de medicação para asma nos últimos 12 meses.

5.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Os critérios de exclusão foram históricos de doenças cardiovasculares ou condições de imunodeficiência, presença de outras doenças respiratórias crônicas, exacerbações recentes de asma ou rinite (nas últimas quatro semanas) e diagnóstico de infecção respiratória aguda ou uso de esteroides orais, nas últimas quatro semanas.

5.6 AVALIAÇÃO DE ATOPIA

A atopia foi definida por IgE específica (ImmunoCAP, Pharmacia Diagnostics, AB, Uppsala, Suécia) para os aeroalérgenos *Dermatofagoides pteronyssinus*, *Dermatofagoides farinae*, poeira e *Blomia tropicalis*, *Periplaneta americana*, pelo de cão e gato, fungos, pólen e grama. As crianças com um nível de detecção de pelo menos 0,35kU / L de qualquer um dos alérgenos testados foram consideradas atópicas.

5.7 ESPIROMETRIA

A espirometria foi realizada por profissionais treinados no Laboratório de Fisiologia Respiratória do Centro Infantil/PUCRS. O exame foi realizado de acordo com as diretrizes do ERS/ATS (The European Respiratory Society/American Thoracic Society (<https://www.thoracic.org/statements/resorces/pft/PFT1.pdf>). Pelo menos três curvas aceitáveis de fluxo-volumes máximos reproduzíveis foram obtidas antes e após o uso de um broncodilatador (Salbutamol, 400 µg). Os resultados foram transformados em escores z de acordo com valores de referência GLI 2012 (The Global Lung Initiative 2012), que se ajustam à altura, idade, etnia e sexo.⁵⁸

5.8 SELEÇÃO DOS POLIMORFISMOS DE IL-10

Os polimorfismos de IL-10 foram inicialmente rastreados utilizando a base de dados do projeto *Hapmap* (versão 28.0), a fim de selecionar as variações genéticas mais frequentes descritas em populações caucasiana.⁵⁹ Este projeto descreve todos os polimorfismos frequentes em humanos e os dados de sua frequência em diferentes etnias. Com o suporte desta base de dados, identificamos os SNPs rs1518111, rs3024490, rs3024496 e rs3024491, com frequência em populações caucasianas de 42%, 40%, 31% e 28%, respectivamente.

PROCEDIMENTOS:

5.9 COLETA DE SANGUE

Todas as coletas de sangue foram realizadas no Centro Infantil/PUCRS por uma equipe de profissionais do Hospital São Lucas da PUCRS, durante as consultas ambulatoriais, após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) pelos representantes legais dos sujeitos da pesquisa e do termo de assentimento livre e esclarecido (TALE) pelos sujeitos da pesquisa (crianças). Foram coletados 10 mL de sangue periférico em tubo com o anticoagulante heparina. Após a coleta do sangue, as amostras foram estocadas em alíquotas e armazenadas em freezer – 20°C, para posterior utilização na extração do DNA genômico (gDNA) e análise dos marcadores inflamatórios.

5.10 EXTRAÇÃO DO gDNA

Realizamos a extração do gDNA, a partir de 1 mL do sangue periférico previamente aliquotado, seguindo a técnica de extração fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1), já descrita⁶⁰ e aprimorada no laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Bioquímica da UFRGS. Basicamente, a extração consiste em uma série de etapas sucessivas durante três dias. No primeiro dia as células foram lisadas com água ultrapura seguido por repetidas centrifugações de curta duração, lavadas em DPBS (Sigma-Aldrich, EUA) e incubadas por 12-18 horas a 50°C em banho maria em solução tamponada (constituído por 2% de Tween 20, EDTA 1mM e Tris-HCl 50mM) contendo Proteinase K (2mg/mL, Promega, Madison, Wisconsin, USA). No segundo dia, 800µL de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) (Sigma-Aldrich, MO, EUA) foram adicionados à solução seguido de centrifugação a 14.000rpm. Após centrifugação, a fase aquosa (superior) foi coletada e incubada por 12-18 horas a -20°C em solução contendo 20% de acetato de sódio e 70% de álcool isopropílico a fim de precipitar o gDNA. No terceiro e último dia, o gDNA foi centrifugado e ressuspendido em água ultrapura e estocado a -20 °C para posterior uso. A pureza e concentração do gDNA estimado pela razão entre as absorbâncias medidas a 260 e 280nm de todas as amostras foi realizada no aparelho BioPhotometer Plus (Eppendorf, Hamburg, GER).

5.11 GENOTIPAGEM

A genotipagem foi realizada no Centro Infantil/PUCRS, utilizando a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (Real-Time PCR). Os kits de genotipagem foram adquiridos da Applied Biosystems (Applied Biosystems (AB) – Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) e as técnicas utilizadas seguiram as normas do fabricante. A genotipagem foi realizada com o objetivo de identificar o polimorfismo de interesse. Foram utilizadas as concentrações de 0,1ng e 0,25ng de gDNA na reação de Real-Time PCR para identificação do SNP. A *genotyping master mix*, catálogo 4371355 (AB - ThermoFischer Scientific, Waltham, MA, EUA) e os iniciadores da *IL-10, primer SNP genotyping assays* (AB – Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), foram usados no processo de genotipagem com o suporte do equipamento StepOne™ Real-Time PCR System (AB – Thermo Fisher Scientific, Waltham , MA, EUA) e os dados obtidos da amplificação (*threshold cycle- CT*) foram analisados pelo programa *StepOne* (versão 2.3). O resultado foi expresso em homozigoto frequente, heterozigoto, homozigoto raro ou indeterminado. Os indeterminados foram excluídos do estudo.

5.12 ANÁLISE DA FREQUÊNCIA DAS CÉLULAS T REGULATÓRIAS E PRODUÇÃO DA IL-10

As células mononucleares do sangue periférico foram purificadas a partir dos nove mL restantes da coleta utilizando gradiente de separação Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, MO, EUA) e congeladas a -80°C. Após o descongelamento, 2×10^5 células foram marcadas com anticorpos anti-CD4 PE Cy7 (clone SK3 - BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EUA) e anticorpos anti-CD25 da APC H7 (clone M-A251 - BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EUA) durante 30 min. As células foram permeabilizadas utilizando tampão FoxP3 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EUA) e depois marcadas com anticorpo anti-FoxP3 Alexa Fluor®488 (clone 259d / C7, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EUA) durante 20 min em temperatura ambiente. Após, as células foram

analisadas por citometria de fluxo (FACS Canto II, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EUA) e os dados foram analisados com o software Flow Jo (Tree Star, Ashland, Oregon, EUA). Os linfócitos foram analisados por dispersão para a presença do fator de transcrição para células Tregs. Os anticorpos de controle de isotipo foram usados para excluir as células não marcadas especificamente. Para análise da produção da IL-10, células mononucleares do sangue periférico foram purificadas e cultivadas com anticorpo anti-CD3 e anti-CD28 por 24h e o sobrenadante foi recolhido e analisado por citometria de fluxo.

5.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para fins estatísticos, as variáveis quantitativas foram avaliadas através do teste de *Kolmogorov-Smirnov*. Os dados que apresentaram distribuição normal foram apresentados em média e desvio-padrão e os dados assimétricos, em mediana e intervalo interquartil. Já as variáveis qualitativas foram expressas em frequência absoluta e relativa. A comparação entre os dados quantitativos foi realizada pelo teste *t* de *Student* para amostras independentes ou pelo teste U de *Mann-Whitney*. A comparação entre as variáveis categóricas foi realizada pelo teste de qui-quadrado de *Pearson*. Para análise da expressão das células Tregs e produção da IL-10 foi usado o programa GraphPad Prism 5 (San Diego, CA, EUA). As demais análises e o processamento dos dados foram realizados com o programa SPSS versão 18,0 (SPSS Inc., EUA). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5.14 ASPECTOS ÉTICOS

A assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foi obtida junto ao responsável legal da criança. O responsável autorizou a participação do paciente antes de qualquer procedimento. A assinatura do termo de assentimento livre e esclarecido (TALE) foi obtida junto aos participantes da pesquisa. A identidade de todos os participantes da pesquisa foi mantida em sigilo. A pesquisa foi iniciada após a

Materiais e Métodos

avaliação e aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital São Lucas da PUCRS (casos) e da Secretaria Municipal de Saúde (controles).

6 CONCLUSÕES

A asma é uma doença heterogênea e complexa e os mecanismos relacionados à sua patogênese ainda não são bem compreendidos. Vários estudos têm sido realizados buscando um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos. O conhecimento de polimorfismos genéticos de IL-10 pode ser um dos mecanismos relacionados à variação na gravidade da asma e sua associação com desfechos na doença pode ter grande relevância clínica, podendo direcionar as estratégias terapêuticas específicas para os pacientes. Os nossos resultados sugerem que a asma moderada está associada com uma frequência maior do alelo T no SNP rs3024491. Este dado está de acordo com o resultado da análise do modelo dominante, que mostra que o alelo T desta variante está associado com uma redução na produção de IL-10, elevada frequência de asma moderada e consequente aumento na frequência das células Tregs. Entretanto, há necessidade de mais estudos, em diversas populações, com o objetivo de ampliar o conhecimento da via IL-10 – Treg - asma.

7 REFERÊNCIAS

1. Von Mutius E. Gene-environment interactions in asthma. *J. Allergy Clin Immunol.* 2009;123(1):3-11.
 2. Holloway JW, Yang IA, Holgate ST. Genetics of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(2):S81-S94.
 3. Masoli M, Fabian D, Holt S, Beasley R. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. *Allergy.* 2004;59(5):469-78.
 4. Noutsios GT, Floros J. Childhood asthma: causes, risks, and protective factors; a role of innate immunity. *Swiss Med Wkly.* 2014;144:w14036.
 5. Solé D, Camelo-Nunes IC, Wandalsen GF, Mallozi MC. Asthma in children and adolescents in Brazil: contribution of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Rev Paul de Pediatr.* 2014;32(1):114-25.
 6. Roncada C, de Oliveira SG, Cidade SF, Sarria EE, Mattiello R, Ojeda BS, et al. Burden of asthma among inner-city children from Southern Brazil. *J Asthma.* 2016;53(5):498-504.
 7. Lambrecht BN, Hammad H. The immunology of asthma. *Nature immunol.* 2015;16(1):45.
 8. Lloyd CM, Hessel EM. Functions of T cells in asthma: more than just TH2 cells. *Nature rev immunol.* 2010;10(12):838-48.
 9. Trifunović J, Miller L, Debeljak Ž, Horvat V. Pathologic patterns of interleukin 10 expression—A review. *Biochem Med.* 2015;25(1):36-48.
 10. Groux, H., A. O'Garra, M. Bigler, M. Rouleau, S. Antonenko, J. E. de Vries and M. G. Roncarolo. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature.* 1997; 389(6652): 737-42.
 11. de Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, Roncarolo M-G, Te Velde A, Figdor C, et al. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med.* 1991;174(4):915-24.
 12. Borish L, Aarons A, Rumbyrt J, Cvietusa P, Negri J, Wenzel S. Interleukin-10 regulation in normal subjects and patients with asthma. *J Allergy and Clin Immunol.* 1996;97(6):1288-96.
-

13. Akdis M, Burgler S, Cramer R, Eiwegger T, Fujita H, Gomez E, et al. Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127(3):701-21. e70.
 14. Raeiszadeh Jahromi S, Mahesh P, Jayaraj B, Madhunapantula SRV, Holla AD, Vishweswaraiah S, et al. Serum levels of IL-10, IL-17F and IL-33 in patients with asthma: a case-control study. *J Asthma*. 2014;51(10):1004-13.
 15. Hsu P, Santner-Nanan B, Hu M, Skarratt K, Lee CH, Stormon M, et al. IL-10 potentiates differentiation of human induced regulatory T cells via STAT3 and Foxo1. *J Immunol*. 2015;195(8):3665-74.
 16. Akbari O, Stock P, DeKruyff RH, Umetsu DT. Role of regulatory T cells in allergy and asthma. *Curr Opin Immunol*. 2003;15(6):627-33.
 17. Thomsen SF, Van Der Sluis S, Kyvik K, Skytthe A, Backer V. Estimates of asthma heritability in a large twin sample. *Clin & Exp Allergy*. 2010;40(7):1054-61.
 18. Thomsen SF, van der Sluis S, Kyvik KO, Skytthe A, Skadhauge LR, Backer V. Increase in the heritability of asthma from 1994 to 2003 among adolescent twins. *Resp Med*. 2011;105(8):1147-52.
 19. Ullemar V, Magnusson PK, Lundholm C, Zettergren A, Melén E, Lichtenstein P, et al. Heritability and confirmation of genetic association studies for childhood asthma in twins. *Allergy*. 2016;71(2):230-8.
 20. Kurz T, Strauch K, Heinzmann A, Braun S, Jung M, Rüschemdorf F, et al. A European study on the genetics of mite sensitization. *J Allergy Clin Immunol*. 2000;106(5):925-32.
 21. Hunninghake GM, Soto-Quirós ME, Lasky-Su J, Avila L, Ly NP, Liang C, et al. Dust mite exposure modifies the effect of functional IL10 polymorphisms on allergy and asthma exacerbations. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;122(1):93-8. e5.
 22. Nie W, Fang Z, Li B, Xiu Q-y. Interleukin-10 promoter polymorphisms and asthma risk: a meta-analysis. *Cytokine*. 2012;60(3):849-55.
 23. Hyun M-H, Lee C-H, Kang M-H, Park B-K, Lee YH. Interleukin-10 promoter gene polymorphisms and susceptibility to asthma: a meta-analysis. *PloS one*. 2013;8(1):e53758.
 24. Zheng X-Y, Guan W-j, Mao C, Chen H-f, Ding H, Zheng J-p, et al. Interleukin-10 promoter 1082/- 819/- 592 polymorphisms are associated with asthma susceptibility in Asians and atopic asthma: a meta-analysis. *Lung*. 2014;192(1):65-73.
 25. Jahromi SR, Mahesh P, Jayaraj B, Holla AD, Vishweswaraiah S, Ramachandra NB. IL-10 and IL-17F Promoter Single Nucleotide Polymorphism and Asthma: A Case-Control Study in South India. *Lung*. 2015;193(5):739-47.
 26. Kim HY, DeKruyff RH, Umetsu DT. The many paths to asthma: phenotype shaped by innate and adaptive immunity. *Nature Immunol*. 2010;11(7):577.
-

Referências

27. Drews A, Pizzichini M, Pizzichini E, Pereira M, Pitrez P, Jones M, et al. Neutrophilic airway inflammation is a main feature of induced sputum in nonatopic asthmatic children. *Allergy*. 2009;64(11):1597-601.
 28. Peters SP. Asthma phenotypes: nonallergic (intrinsic) asthma. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2014;2(6):650-2.
 29. Rackemann FM. A working classification of asthma. *The American journal of medicine*. 1947;3(5):601-6.
 30. Bimestral P. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia para o manejo da asma-2012. *J Bras Pneumol*. 2012;38(Suplemento 1).
 31. Bruijnzeel P, RIHS S, Walker C, Verhagen J. Lack of increased numbers of low-density eosinophils in the circulation of asthmatic individuals. *Clin & Exp Allergy*. 1993;23(4):261-9.
 32. Bush A, Saglani S. Management of severe asthma in children. *Lancet*. 2010;376(9743):814-25.
 33. Mosmann TR, Coffman RL. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. *Adv Immunol*. 1989;46:111-47.
 34. Robinson DS, Hamid Q, Ying S, Tsicopoulos A, Barkans J, Bentley AM, et al. Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med*. 1992;326(5):298-304.
 35. Molet S, Hamid Q, Davoineb F, Nutku E, Tahaa R, Pagé N, et al. IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;108(3):430-8.
 36. Al-Ramli W, Préfontaine D, Chouiali F, Martin JG, Olivenstein R, Lemièrre C, et al. TH17-associated cytokines (IL-17A and IL-17F) in severe asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;123(5):1185-7.
 37. Smyth LJ, Eustace A, Kolsum U, Blaikely J, Singh D. Increased airway T regulatory cells in asthmatic subjects. *Chest*. 2010;138(4):905-12.
 38. Raedler D, Ballenberger N, Klucker E, Böck A, Otto R, da Costa OP, et al. Identification of novel immune phenotypes for allergic and nonallergic childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;135(1):81-91.
 39. Xing J, Wu Y, Ni B. Th9: a new player in asthma pathogenesis? *J Asthma*. 2011;48(2):115-25.
 40. Truyen E, Coteur L, Dilissen E, Overbergh L, Dupont LJ, Ceuppens JL, et al. Evaluation of airway inflammation by quantitative Th1/Th2 cytokine mRNA measurement in sputum of asthma patients. *Thorax*. 2006;61(3):202-8.
 41. Afshar R, Medoff B, Luster A. Allergic asthma: a tale of many T cells. *Clin & Exp Allergy*. 2008;38(12):1847-57.
-

42. Holgate ST. Innate and adaptive immune responses in asthma. *Nature Med.* 2012;18(5):673.
 43. Thorburn AN, Hansbro PM. Harnessing regulatory T cells to suppress asthma: from potential to therapy. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2010;43(5):511-9.
 44. Lloyd CM, Hawrylowicz CM. Regulatory T cells in asthma. *Immunity.* 2009;31(3):438-49.
 45. Lewkowich IP, Herman NS, Schleifer KW, Dance MP, Chen BL, Dienger KM, et al. CD4+ CD25+ T cells protect against experimentally induced asthma and alter pulmonary dendritic cell phenotype and function. *J Exp Medicine.* 2005;202(11):1549-61.
 46. Kearley J, Robinson DS, Lloyd CM. CD4+ CD25+ regulatory T cells reverse established allergic airway inflammation and prevent airway remodeling. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;122(3):617-24. e6.
 47. Fontenot JD, Rudensky AY. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nature Immunol.* 2005;6(4):331.
 48. Gambineri E, Torgerson TR, Ochs HD. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis. *Curr Opin Rheumatol.* 2003;15(4):430-5.
 49. Abbas AK, Benoist C, Bluestone JA, Campbell DJ, Ghosh S, Hori S, et al. Regulatory T cells: recommendations to simplify the nomenclature. *Nature Immunol.* 2013;14(4):307.
 50. Levings MK, Bacchetta R, Schulz U, Roncarolo MG. The role of IL-10 and TGF-beta in the differentiation and effector function of T regulatory cells. *Int Arch Allergy Immunol.* 2002;129:263-76
 51. Lee JH, Yu HH, Wang LC, Yang YH, Lin YT, Chiang BL. The levels of CD4+ CD25+ regulatory T cells in paediatric patients with allergic rhinitis and bronchial asthma. *Clin & Exp Immunol.* 2007;148(1):53-63.
 52. Hartl D, Koller B, Mehlhorn AT, Reinhardt D, Nicolai T, Schendel DJ, et al. Quantitative and functional impairment of pulmonary CD4+ CD25hi regulatory T cells in pediatric asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;119(5):1258-66.
 53. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann T. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med.* 1989;170(6):2081-95.
 54. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol.* 2001;19(1):683-765.
 55. Spits H, de Waal Malefyt R. Functional characterization of human IL-10. *Int Arch Allergy Immunol.* 1992;99(1):8-15.
-

Referências

56. Turner D, Williams D, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott P, Hutchinson I. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet.* 1997;24(1):1-8.
 57. Hattersley AT, McCarthy MI. What makes a good genetic association study? *Lancet.* 2005;366(9493):1315-23.
 58. Quanjer PH, Stanojevic S, Cole TJ, Baur X, Hall GL, Culver BH, et al. Multiethnic reference values for spirometry for the 3-95-yr age range: the global lung function 2012 equations. *Eur Respir J* (2012) 40:1324–43
 59. Consortium IH. The international HapMap project. *Nature.* 2003;426(6968):789.
 60. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162(1):156-9.
-

ANEXO

ANEXO 1 – APROVAÇÃO CEP

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

OF.CEP-587/10

Porto Alegre, 04 de maio de 2010.

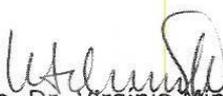
Senhor Pesquisador,

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa registro CEP 10/04978 intitulado **“Prevalência de asma em uma amostra de crianças brasileiras e caracterização de fenótipos clínicos, marcadores biológicos e funcionais”**, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (fase 1) e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (fase 2).

Salientamos que seu estudo será encaminhado à CONEP e somente poderá ser iniciado após parecer aprobatório da mesma.

Os relatórios parciais e final deverão ser encaminhados a este CEP.

Atenciosamente,



Prof. Dr. Virginia Minghelli Schmitt
Coordenadora Substituta do CEP-PUCRS

Ilmo. Sr.
Dr. Renato Tetelbom Stein
Nesta Universidade

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6690 – 3º andar – CEP: 90610-000
Sala 314 – Fone Fax: (51) 3320-3345
E-mail: cep@pucrs.br
www.pucrs.br/prppg/cep

ANEXO 2 – APROVAÇÃO PLATAFORMA BRASIL

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO RIO GRANDE
DO SUL - PUC/RS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: PREVALÊNCIA DE ASMA EM UMA AMOSTRA DE CRIANÇAS BRASILEIRAS E CARACTERIZAÇÃO DE FENÓTIPOS CLÍNICOS, MARCADORES BIOLÓGICOS E FUNCIONAIS

Pesquisador: Renato Tettelbom Stein

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 19835913.8.0000.5336

Instituição Proponente: UNIAO BRASILEIRA DE EDUCACAO E ASSISTENCIA

Patrocinador Principal: CONS NAC DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLÓGICO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 337.598

Data da Relatoria: 19/07/2013

Apresentação do Projeto:

Vide conclusões

Objetivo da Pesquisa:

Vide conclusões

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Vide conclusões

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Vide conclusões

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Vide conclusões

Recomendações:

Vide conclusões

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovada a inclusão de mais 25 sujeitos de pesquisa.

Endereço: Av. Itália, 6681
Bairro: CEP: 90.619-000
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)33320-3345 Fax: (51)33320-3345 E-mail: cep@pucrs.br

Página 01 de 02

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO RIO GRANDE
DO SUL - PUC/RS



Continuação do Parecer: 337.598

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Aprovação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

PORTO ALEGRE, 20 de Julho de 2013

Assinado por:
Osvaldo Oelheiro Marques
(Coordenador)

APÊNDICE

APÊNDICE 1 – ARTIGO ORIGINAL**ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS DE IL-10 E CÉLULAS T
CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ EM ESCOLARES ASMÁTICOS****RESUMO**

Introdução: a asma apresenta elevada prevalência na população infantil brasileira. Fatores genéticos e imunológicos podem estar associados a sua gravidade. A interleucina-10 (IL-10) é uma citocina anti-inflamatória e seus níveis estão frequentemente diminuídos nos asmáticos.

Objetivos: avaliar a associação entre polimorfismos do gene da IL-10 e a gravidade da asma em uma amostra de escolares, e a associação entre genótipos de IL-10 dos pacientes asmáticos com a expressão da citocina e de linfócitos T regulatórios (Tregs).

Métodos: quatro polimorfismos do gene da IL-10 (rs1518111, rs3024490, rs3024496, rs3024491) foram genotipados em escolares da rede pública de Porto Alegre/Brasil, usando Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (Real-Time PCR). Células mononucleares do sangue periférico foram analisadas por citometria de fluxo para a frequência das células Tregs e produção da IL-10.

Resultados: 123 escolares asmáticos e 58 controles participaram do estudo. O SNP rs3024491 (T) demonstrou associação com a gravidade da asma, apresentando frequência maior nos pacientes do grupo asma moderada ($p=0,042$). O alelo T da variante rs3024491 apresentou também uma associação com níveis reduzidos da IL-10 ($p=0,01$) e com o aumento da frequência das células Tregs ($p=0,01$). As outras variantes não apresentaram associações consistentes.

Conclusão: nossos resultados sugerem que a asma moderada está associada com uma frequência maior do alelo T no SNP rs3024491. Além disso, a variante rs3024491(TT) foi associada com uma redução na produção de IL-10 e aumento na frequência das Tregs, sugerindo possíveis mecanismos de ação das variantes genéticas sobre o risco e a gravidade da asma.

Palavras-chave: asma, polimorfismo, interleucina-10, células T regulatórias.

ABSTRACT

Introduction: asthma has a high prevalence in the Brazilian child population. Genetic and immunological factors may be associated with its severity. Interleukin-10 (IL-10) is an anti-inflammatory cytokine and its levels are often decreased in asthmatics.

Objectives: to assess the association between IL-10 gene polymorphisms and asthma severity in a sample of schoolchildren, and the association between IL-10 genotypes of asthmatic patients with cytokine expression and regulatory T lymphocytes (Tregs).

Methods: four polymorphisms of the IL-10 gene (rs1518111, rs3024490, rs3024496, rs3024491) were genotyped in public school students in Porto Alegre (Brazil), using Real-Time PCR. Peripheral blood mononuclear cells were analyzed by flow cytometry for Tregs frequency and IL-10 production.

Results: 123 asthmatic schoolchildren and 58 controls participated in the study. The SNP rs3024491 (T) showed association with asthma severity, presenting a higher frequency in patients in the moderate asthma group ($p=0.042$). The T allele of variant rs3024491 also showed an association with reduced IL-10 levels ($p=0.01$) and with increased Tregs cell frequency ($p=0.01$). The other variants did not present consistent associations.

Conclusions: our results suggest that moderate asthma is associated with a higher frequency of the T allele in the SNP rs3024491. In addition, the variant rs3024491 (TT) was associated with a reduction in IL-10 production and increased Treg frequency, suggesting possible mechanisms of action of the genetic variants on the risk and severity of asthma.

Keywords: asthma, polymorphism, interleukin-10, regulatory T cells.

INTRODUÇÃO

A asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas inferiores, extremamente complexa, multifatorial e poligênica. A doença ocorre tanto em adultos quanto em crianças, em todos os níveis sociais. Mundialmente são aproximadamente 300 milhões de pessoas acometidas, com importante impacto psicológico, social e econômico, evidenciando um grave problema de saúde pública. Estima-se que em 2025 haverá 100 milhões de novos casos de asma no mundo.¹ É a doença crônica mais comum na infância e o aumento da sua prevalência nas últimas décadas é expressivo nesta população. Geralmente, a manifestação da doença acontece na idade escolar.²

A etiologia da asma é multifatorial e é resultante da interação entre os diversos fatores ambientais e a predisposição genética.^{3,4} Estudos com gêmeos mono/dizigóticos mostraram que a asma apresenta uma herdabilidade de aproximadamente 60%.⁵⁻⁷

Citocinas inflamatórias, produzidas por células Th2, têm um importante papel na inflamação crônica, na hiperresponsividade e na obstrução reversível da via aérea. No entanto, outros subtipos de células TCD4⁺ também estão envolvidos na sua patogênese⁸, associados a diversos genes, evidenciando a complexidade da doença. A interleucina-10 (IL-10) é uma importante citocina anti-inflamatória pleiotrópica, produzida por várias células do sistema imune inato e adaptativo como os monócitos, macrófagos, células dendríticas, linfócitos T e B, entre outras⁹, sendo os linfócitos T CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ (Tregs) uma das principais fontes da IL-10.¹⁰ Esta citocina tem marcante papel imunorregulador, modulando a expressão de outras citocinas, mediadores solúveis e moléculas de superfície celular, sendo capaz de influenciar respostas imunes e inflamatórias.¹⁰ A principal função da IL-10 é inibir a produção de várias citocinas e quimiocinas, receptores de quimiocinas e enzimas inflamatórias.¹¹ Em contraste a este efeito imunossupressor que a IL-10 causa nos linfócitos T, nos linfócitos B ela melhora sua proliferação, diferenciação e a produção de anticorpos.¹⁰

De acordo com o *guideline* do GINA – Iniciativa Global para a Asma (www.ginasthma.org), a asma apresenta cinco níveis de gravidade: intermitente, persistente leve, persistente moderada, grave e grave resistente à terapia. A avaliação da gravidade da asma é feita pelo médico de acordo com a frequência e intensidade dos

sintomas, bem como de acordo com a dose necessária de medicação para controlar a doença e também pelo teste da função pulmonar (espirometria).

Borish et al¹² mostrou uma inversa associação entre a gravidade da asma e a concentração de IL-10 no lavado broncoalveolar (LBA). A média da concentração de IL-10 no LBA de asmáticos era menor do que nos controles saudáveis. Os pacientes com asma atópica, quando comparados com não-atópicos, tinham concentração de IL-10 diminuída no LBA, como resultado da inibição da transcrição mRNA. A redução de IL-10 na asma pode causar secreção elevada e continuada de citocinas pró-inflamatórias, contribuindo para a inflamação da via aérea. Além disso, a IL-10 pode potencializar a diferenciação das células T regulatórias (Tregs).¹³ As Tregs são um subtipo de linfócito T CD4⁺ responsáveis pela manutenção do equilíbrio entre a ativação e a tolerância da resposta imune, atuando na regulação de doenças inflamatórias como a asma. Alguns estudos têm mostrado alterações no número e na função das Tregs na asma.¹⁴⁻¹⁸

O gene da IL-10 está localizado no cromossomo 1q31-32, uma região associada à suscetibilidade para asma e a fenótipos relacionados à atopia.¹⁹ Alguns polimorfismos do gene da IL-10 foram relacionados à doença e os mais estudados estão na região promotora do gene.²⁰⁻²² Compreendem as variantes rs1800896 (-1082A/G), rs1800871 (-819T/C) e rs1800872 (-592A/C). Estes SNPs apresentam desequilíbrio de ligação (DL) com outros polimorfismos do gene e têm sido relatados por regular a expressão da IL-10.²²

Assim, os objetivos deste estudo foram avaliar a associação entre polimorfismos de IL-10 e a gravidade da asma em uma amostra de escolares, investigar a associação entre genótipos de IL-10 dos pacientes asmáticos com a frequência de linfócitos T CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ (Tregs) e investigar a associação entre genótipos de IL-10 dos pacientes asmáticos com os níveis da proteína IL-10.

MATERIAIS E MÉTODOS

Delineamento e amostra

Este é um estudo de associação genética com delineamento de caso-controle aninhado (nested case-control). Este estudo está associado ao projeto Bright, já aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP/PUCRS) sob o número 10/04978.

A amostra do estudo foi composta por escolares de 8 a 14 anos de escolas públicas de Porto Alegre/RS. O estudo foi dividido em três etapas: 1. Questionário ISAAC para avaliar a prevalência de asma; 2. Avaliação dos fenótipos e controle da gravidade da asma através de procedimentos simples como questionário GINA e teste de função pulmonar; 3. Coleta de sangue para avaliação de atopia com IgE específica, para análise de marcadores inflamatórios e para estudos de genotipagem.

Foi usado o questionário ISAAC, a fim de selecionar a população de asmáticos. Após, as crianças diagnosticadas com a doença passaram por uma série de procedimentos de avaliação nas fases 2 e 3: espirometria, testes para aero-alérgenos (*Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, *Periplaneta americana*, poeira e *Blomia tropicalis*, pólen, pelo de gato e de cachorro, gramínea e fungos) e pesquisa de marcadores inflamatórios no sangue. Por último, foi realizada a genotipagem das amostras (casos e controles). O grupo controle era de escolares da mesma rede de ensino, sem diagnóstico de asma pelo questionário ISAAC.

A severidade da asma foi definida por um médico de acordo com o *guideline* da GINA e os sujeitos da pesquisa foram classificados em asmáticos (intermitentes, persistentes leves, persistentes moderados) e controles.

Critérios de inclusão e exclusão

Os critérios de inclusão para o grupo casos foram: escolares de 08 a 14 anos do ensino público de Porto Alegre/RS com diagnóstico de asma pelo questionário ISAAC, no período de março de 2011 a dezembro de 2012, segundo os seguintes critérios: sim para o diagnóstico da asma, sim para chiado nos últimos 12 meses, sim para uso de medicação para asma nos últimos 12 meses, ou diagnóstico para asma mais sibilos ou diagnóstico de asma mais medicação. Para o grupo controle foi selecionada uma amostra de escolares da mesma idade, da mesma rede de ensino público de Porto Alegre/RS sem diagnóstico de asma no mesmo período, segundo os seguintes critérios: não para o diagnóstico de asma, não ter chiado nos últimos 12 meses, e não fazer uso de medicação para asma nos últimos 12 meses. Os critérios de exclusão compreenderam históricos de doenças cardiovasculares ou condições de imunodeficiência, presença de outras doenças

respiratórias crônicas, exacerbações recentes de asma ou rinite e diagnóstico de uma infecção respiratória aguda ou uso de esteroides orais nas últimas quatro semanas.

Avaliação da atopia e função pulmonar

A atopia foi definida por IgE específica (ImmunoCAP, Pharmacia Diagnostics, AB, Uppsala, Suécia) para os aeroalérgenos *Dermatofagoides pteronyssinus*, *Dermatofagoides farinae*, poeira e *Blomia tropicalis*, *Periplaneta americana*, pelo de cão e gato, fungos, pólen e grama. As crianças com um nível de detecção de pelo menos 0,35kU / L de qualquer um dos alérgenos testados foram consideradas atópicas.

A espirometria foi realizada por profissionais treinados no Laboratório de Fisiologia Respiratória do Centro Infantil/PUCRS. O exame foi realizado de acordo com as diretrizes do ERS/ATS (<https://www.thoracic.org/statements/resorces/pft/PFT1.pdf>). Pelo menos três curvas aceitáveis de fluxo-volumes máximos reproduzíveis foram obtidas antes e após o uso de um broncodilatador (Salbutamol, 400 µg). Os resultados das variáveis volume expiratório forçado no 1º segundo (VEF₁), capacidade vital forçada (CVF), índice de *Tiffenou* (VEF₁/CVF) e fluxo expiratório forçado entre 25% e 75% (FEF 25%-75%) foram transformados em escores z de acordo com valores de referência da iniciativa global da função pulmonar (GLI 2012), que se ajustam à altura, idade, etnia e sexo.²⁴

Seleção dos polimorfismos de IL-10

Os polimorfismos de *IL-10* foram inicialmente rastreados utilizando a base de dados do projeto *HapMap* (versão 28.0), a fim de selecionar as variações genéticas mais frequentes descritas em populações caucasianas.²⁵ Com o suporte desta base de dados, identificamos os SNPs rs1518111, rs3024490, rs3024496 e rs3024491, com frequência alélica em populações caucasianas de 42%, 40%, 31%, 28%, respectivamente.

Aspectos Éticos

A assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foi obtida junto ao responsável legal da criança. O responsável autorizou a participação do paciente antes de qualquer procedimento. A assinatura do termo de assentimento livre e esclarecido (TALE) foi obtida junto aos participantes da pesquisa. A identidade de todos os participantes da pesquisa foi mantida em sigilo. A pesquisa foi iniciada após a avaliação e aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital São Lucas da PUCRS e da Secretaria Municipal de Saúde (controles).

Coleta de sangue para extração do gDNA

As coletas de sangue foram realizadas no Centro Infantil/PUCRS por uma equipe de profissionais do Hospital São Lucas da PUCRS, durante as consultas ambulatoriais, após assinatura do TCLE de seus representantes legais. Foram coletados 10 mL de sangue de cada participante do estudo. Alíquotas de 1 mL foram estocadas e armazenadas em freezer – 20°C, para posterior utilização na extração do DNA genômico (gDNA), seguindo a técnica de extração fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1), já descrita²⁶ e aprimorada no laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Bioquímica da UFRGS.

Genotipagem

A genotipagem das amostras foi realizada no Centro Infantil/PUCRS, utilizando a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (Real-Time PCR) - (TaqMan - Applied Biosystems (AB) – Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), seguindo as normas do fabricante. A genotipagem foi realizada com o objetivo de identificar os polimorfismos de interesse. Foram utilizadas as concentrações de 0,1ng e 0,25ng de gDNA na reação de PCR em tempo real para identificação dos SNPs. A *genotyping master mix*, catálogo 4371355 (AB, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) e os iniciadores da *IL-10, primer SNP genotyping assays* (AB, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), foram usados no processo de genotipagem com o

suporte do equipamento StepOne™ Real-Time PCR System (AB, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Os dados obtidos da amplificação (*threshold cycle- CT*) foram analisados pelo programa *StepOne* (versão 2.3). O resultado foi expresso em homozigoto frequente, heterozigoto, homozigoto raro ou indeterminado. Os indeterminados foram excluídos do estudo.

Análise da frequência das células T regulatórias e produção da IL-10

Para análise da frequência das células T regulatórias, as células mononucleares do sangue periférico foram purificadas a partir dos nove mL restantes da coleta utilizando gradiente de separação Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, MO, EUA) e congeladas a -80 ° C. Após o descongelamento, 2×10^5 células foram marcadas com anticorpos anti-CD4 PE Cy7 (clone SK3 - BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EUA) e anticorpos anti-CD25 da APC H7 (clone M-A251 - BD Biosciences, NJ, EUA) durante 30 min. As células foram permeabilizadas utilizando tampão FoxP3 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EUA) e depois marcadas com anticorpo anti-FoxP3 Alexa Fluor®488 (clone 259d / C7, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EUA) durante 20 min em temperatura ambiente. Após, as células foram analisadas por citometria de fluxo (FACS Canto II, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EUA) e os dados foram analisados com o software Flow Jo (Tree Star, Ashland, OR, EUA). Os linfócitos foram analisados por dispersão para a presença do fator de transcrição para células Tregs. Os anticorpos de controle de isotipo foram usados para excluir as células não marcadas especificamente. Para análise da produção da IL-10, células mononucleares do sangue periférico foram purificadas e cultivadas com anticorpo anti-CD3 e anti-CD28 por 24h e o sobrenadante foi recolhido e analisado por citometria de fluxo.

RESULTADOS

Neste estudo de associação genética foram incluídos 123 casos e 72 controles, totalizando 195 pacientes com amostras de DNA disponíveis. A taxa de sucesso da genotipagem foi de 92,82% (181/195). Assim, participaram da análise final deste estudo 123 casos e 58 controles (Figura 1). Não houve diferença significativa entre os grupos quanto as variáveis idade, sexo, peso ao nascimento VEF₁ e CVF (Tabela 1). Pacientes com asma apresentaram atopia com maior frequência (75,6% vs 54,4%, $p = 0,004$) e redução de algumas funções pulmonares, como VEF₁/CVF ($-0,50 \pm 0,91$ vs $-0,13 \pm 0,70$, $p = 0,013$) e FEF25% -75 % ($-0,43 \pm 1,06$ vs $-0,00 \pm 0,91$, $p = 0,015$). Os pacientes com asma também apresentaram maior frequência do marcador FoxP3⁺ nas células T CD4⁺ e CD25⁺, apresentando uma mediana de CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ de 1,38 (0,39-3,25) em comparação aos controles 0,25 (0,02-0,52); $p < 0,0001$ (Tabela 1).

Quatro SNPs comuns da IL-10 (rs1518111, rs3024490, rs3024496 e rs3024491) foram selecionados para genotipagem (Figura 2). As frequências dos alelos raros para cada SNP foram de 38,6%; (Alelo A, rs1518111), 40,6% (alelo G, rs3024490), 29,8% (alelo T, rs3024496), 27,4% (alelo G, rs3024491) (Tabela 2). Os SNPs selecionados estão em LD com outros polimorfismos do gene e representam uma grande parte das variações do loci (Figura 3).

O SNP IL-10 rs3024491 mostrou uma tendência de associação com a gravidade da asma quando avaliado pela frequência em pacientes com asma moderada, asma leve e controles (Fig. 4). No entanto, quando analisamos pacientes asmáticos leves e controles versus asma moderada/grave, o SNP IL-10 rs3024491 mostrou uma associação significativa com a gravidade da asma, apresentando uma maior frequência de alelo T em pacientes do grupo com asma moderada versus controles leves (71,4% vs. 48,5%, $p = 0,042$).

Na análise do modelo dominante, o genótipo TT (rs3024491) mostrou estar associado a uma redução nos níveis da IL-10; $p = 0,01$ (Figura 4a). Nesse mesmo modelo, o genótipo TT da variante rs3024491 mostrou-se mais frequente em pacientes com asma mais grave (71,4%), demonstrando uma tendência de associação com a gravidade da doença; $p=0,068$ (Figura 4b). Por fim, o mesmo genótipo rs3024491 TT também

demonstrou associação com o aumento da frequência de células T reguladoras; $p = 0,01$ (Figura 4c). A variante rs3024496 mostrou uma associação apenas com o aumento da frequência de células Tregs no alelo C ($p = 0,01$). Os demais SNPs não apresentaram resultados significativos com os desfechos avaliados.

DISCUSSÃO

Neste estudo, a variante rs3024491 do gene da IL-10 apresentou os resultados de associação mais importantes. O alelo T da variante rs3024491 do gene da IL-10 mostrou associação com a gravidade da asma, apresentando frequência maior nos pacientes do grupo asma moderada versus asma leve/controles. O genótipo TT também está associado a uma menor produção de IL-10 (Figura 4a), mostrando que este polimorfismo (rs3024491) pode influenciar na produção da proteína. Além da associação com a gravidade da asma (Figura 4b), este polimorfismo também demonstrou influenciar a frequência das células Tregs (Figura 4c). Raedler et al também encontrou aumento da frequência das células Tregs em asmáticos atópicos comparados com os controles saudáveis. Este aumento da frequência das células Tregs nos pacientes asmáticos, provavelmente, é devido a um mecanismo de contrabalanço da resposta imune, onde num ambiente inflamado o organismo reage produzindo mais Tregs para contrabalançar ou conter a inflamação.¹⁷

Os polimorfismos da IL-10 têm sido amplamente estudados em várias doenças. Já foram descritas associações destas três variantes do gene da IL-10 com artrite reumatoide²⁷, lúpus eritematoso sistêmico²⁸, doença de Crohn^{29, 30} e psoríase.³¹ Alguns estudos identificaram associação entre polimorfismos do gene da IL-10 e o risco de asma, mas os resultados não foram conclusivos. Três recentes metanálises²⁰⁻²² analisaram polimorfismos na região promotora do gene da IL-10 (-1082/-592/-819) e o risco de asma. Nie W et al²⁰ avaliaram 17 estudos (4478 asmáticos e 4803 controles) e observou associações significativas entre os polimorfismos -1082A/G e -592A/C do gene da IL-10 e o risco de asma em asiáticos, caucasianos, egípcios. Os indivíduos portadores da homozigose AA (-1082A/G, em LD com rs3024491) tinham um aumento de 27% no risco da doença. Portadores do alelo A no polimorfismo -592A/C também tiveram um aumento no risco de asma (17%). No entanto, não houve associação significativa com o

polimorfismo -819T/C. Hyun M-H et al²¹, avaliaram 11 estudos (2215 asmáticos e 2170 controles). Três destes estudos foram realizados em população europeia, três em população do leste asiático, quatro em população do oeste asiático e um estudo foi realizado com indianos. Quatro estudos foram realizados somente com crianças, três somente com adultos e quatro incluíram crianças e adultos. Esta metanálise demonstrou novamente que o polimorfismo -1082G/A confere susceptibilidade à asma em sujeitos adultos do leste asiático. Os polimorfismos -592C/A e -819C/T e seus haplótipos não estavam associados à doença.

Na metanálise de Zheng XY et al²², foram avaliados 23 estudos (4716 asmáticos e 5093 controles). Dos 23 estudos, 15 foram realizados em populações asiáticas, seis em caucasianos e dois estudos em africanos. Dez estudos foram realizados em adultos, 11 estudos em crianças e dois estudos foram realizados em ambas as populações, adultos e crianças. Esta metanálise concluiu que os polimorfismos da região promotora de IL-10 -1028A/G e -592A/C provavelmente se correlacionam com a susceptibilidade à asma, principalmente em asiáticos com asma atópica.

Interessantemente, existe associação de LD entre os polimorfismos da região promotora e as variantes avaliadas em nosso estudo (especialmente -1082A e rs3024491T). O gene da IL-10 é altamente polimórfico e vários polimorfismos próximos ou dentro dele podem influenciar os níveis de transcrição de mRNA, codificando para a proteína.³² A variante rs3024491 mostrou estar aproximadamente 100% em LD com a variante da região promotora, rs1800896 (-1082A/G), do gene da IL-10³³ Logo, os alelos raros são herdados juntos e por isso representam o mesmo efeito. Dessa forma, pode-se suspeitar que apenas um deles seja o causador do efeito final, mas a associação entre eles e a asma é exatamente a mesma, conforme resultados apresentados.

A maioria dos estudos de associação genética foi realizada com as variantes da região promotora do gene da IL-10. No nosso estudo utilizamos quatro SNPs do gene da IL-10 que tinham MAF alto e que estavam distribuídos ao longo da estrutura do gene (Fig. 2). Alguns deles (especialmente rs3024491) estão em LD com os SNPs da região promotora da IL-10.

Este estudo apresentou algumas limitações a serem descritas, sendo o tamanho da amostra a mais importante. Entretanto, a consistência dos resultados de associações encontrados em diversos níveis (genética, expressão IL-10, Tregs e fenótipo) demonstram

a força e provável impacto do resultado, apesar da amostra pequena para um estudo de associação genética. Outra limitação é que não tivemos pacientes com asma grave na amostra, no qual poderiam contribuir nos resultados. Tivemos somente pacientes com asma intermitente, persistente leve e persistente moderada. Outra possível limitação é que as análises das células Tregs foram realizadas somente em sangue periférico. O ideal seria colher amostras diretamente no sítio da inflamação, no LBA ou através de biópsia brônquica. No entanto, este tipo de amostra exige um procedimento invasivo, o que geralmente é vetado pelos comitês de ética em estudos com crianças.

Em conclusão, o conhecimento de polimorfismos genéticos de IL-10 pode ser um dos mecanismos relacionados à variação na gravidade da asma. A sua associação com desfechos na asma pode ter grande relevância clínica, podendo direcionar as estratégias terapêuticas específicas para os pacientes. Os nossos resultados sugerem que a asma moderada está associada com uma frequência maior do alelo T no SNP rs3024491. Este dado está de acordo com o resultado da análise do modelo dominante, que mostra que o alelo T desta variante está associado com uma redução na produção de IL-10, elevada frequência de asma moderada e consequente aumento da frequência das células Tregs. Entretanto, há a necessidade de mais estudos de associação genética em diversas populações, com o objetivo de ampliar o conhecimento nesta área. Dessa forma, a IL-10 pode ser considerada um alvo para estudos de intervenção em pacientes com asma.

REFERÊNCIAS

1. Masoli M, Fabian D, Holt S, Beasley R. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. *Allergy*. 2004;59(5):469-78.
 2. Tang S-P, Liu Y-L, Wang S-B, Weng S-F, Chen S, Zhang M-J, et al. Trends in prevalence and risk factors of childhood asthma in Fuzhou, a city in Southeastern China. *J Asthma*. 2015;52(1):10-5.
 3. von Mutius E. Gene-environment interactions in asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2009 Jan;123(1):3-11.
 4. Mukherjee AB, Zhang Z. Allergic asthma: influence of genetic and environmental factors. *J. Biol Chem*. 2011 Sep 23;286(38):32883-9.
 5. Thomsen SF, van der Sluis S, Kyvik KO, Skytthe A, Skadhauge LR, Backer V. Increase in the heritability of asthma from 1994 to 2003 among adolescent twins. *Respir Med*. 2011;105(8):1147-52.
 6. Thomsen SF, Van Der Sluis S, Kyvik K, Skytthe A, Backer V. Estimates of asthma heritability in a large twin sample. *Clin Exp Allergy*. 2010;40(7):1054-61.
 7. Ullemar V, Magnusson PK, Lundholm C et al. Heritability and confirmation of genetic association studies for childhood asthma in twins. *Allergy* 2016;71(2):230-8.
 8. Lloyd CM, Hessel EM. Functions of T cells in asthma: more than just T H 2 cells. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(12):838-48.
 9. Trifunović J, Miller L, Debeljak Ž, Horvat V. Pathologic patterns of interleukin 10 expression—A review. *Biochem Med (Zagreb)*. 2015;25(1):36-48.
 10. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*. 2001;19(1):683-765.
 11. de Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H et al. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med*. 1991;174(4):915-24.
 12. Borish L, Aarons A, Rumblyrt J, Cvietusa P, Negri J, Wenzel S. Interleukin-10 regulation in normal subjects and patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1996;97(6):1288-96.
 13. Hsu P, Santner-Nanan B, Hu M et al. IL-10 potentiates differentiation of human induced regulatory T cells via STAT3 and Foxo1. *J Immunol*. 2015;195(8):3665-74.
-

14. Hartl D, Koller B, Mehlhorn AT et al. Quantitative and functional impairment of pulmonary CD4⁺ CD25^{hi} regulatory T cells in pediatric asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;119(5):1258-66.
 15. Mamessier E, Nieves A, Lorec AM et al. T-cell activation during exacerbations: a longitudinal study in refractory asthma. *Allergy.* 2008;63(9):1202-10.
 16. Smyth LJ, Eustace A, Kolsum U, Blaikely J, Singh D. Increased airway T regulatory cells in asthmatic subjects. *Chest.* 2010;138(4):905-12.
 17. Raedler D, Ballenberger N, Klucker E et al. Identification of novel immune phenotypes for allergic and nonallergic childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2015;135(1):81-91.
 18. Lee JH, Yu HH, Wang LC, Yang YH, Lin YT, Chiang BL. The levels of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in paediatric patients with allergic rhinitis and bronchial asthma. *Clin Exp Immunol.* 2007;148(1):53-63.
 19. Kurz T, Strauch K, Heinzmann A et al. A European study on the genetics of mite sensitization. *J Allergy Clin Immunol.* 2000;106(5):925-32.
 20. Nie W, Fang Z, Li B, Xiu QY. Interleukin-10 promoter polymorphisms and asthma risk: a meta-analysis. *Cytokine.* 2012;60(3):849-55.
 21. Hyun MH, Lee CH, Kang MH, Park BK, Lee YH. Interleukin-10 promoter gene polymorphisms and susceptibility to asthma: a meta-analysis. *PloS One.* 2013;8(1):e53758.
 22. Zheng XY, Guan WJ, Mao C et al. Interleukin-10 promoter 1082/- 819/- 592 polymorphisms are associated with asthma susceptibility in Asians and atopic asthma: a meta-analysis. *Lung.* 2014;192(1):65-73.
 23. Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson IV. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet* 1997;24(1):1-8.
 24. Quanjer PH, Stanojevic S, Cole TJ et al. Multiethnic reference values for spirometry for the 3-95-yr age range: the global lung function 2012 equations. *Eur Respir J.* (2012) 40(6):1324-43
 25. Consortium IH. The international HapMap project. *Nature.* 2003;426(6968):789.
 26. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162(1):156-9.
 27. Paradowska-Gorycka A, Trefler J, Maciejewska-Stelmach J, Łącki J. Interleukin-10 gene promoter polymorphism in Polish rheumatoid arthritis patients. *Inter J Immunogenet* 2010;37(4):225-31.
-

28. Song GG, Choi SJ, Ji JD, Lee YH. Associations between interleukin-10 polymorphisms and susceptibility to systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Hum Immunol*. 2013;74(3):364-70.
 29. Zhu H, Lei X, Liu Q, Wang Y. Interleukin-10-1082A/G polymorphism and inflammatory bowel disease susceptibility: a meta-analysis based on 17,585 subjects. *Cytokine*. 2013;61(1):146-53.
 30. Lv H, Jiang Y, Li J et al. Association between polymorphisms in the promoter region of interleukin-10 and susceptibility to inflammatory bowel disease. *Mol Biol Rep*. 2014;41(3):1299-310.
 31. Lee YH, Choi SJ, Ji JD, Song GG. Associations between interleukin-10 polymorphisms and susceptibility to psoriasis: a meta-analysis. *Inflamm Res* 2012;61(7):657-63.
 32. Lio D, Candore G, Crivello A et al. Opposite effects of interleukin 10 common gene polymorphisms in cardiovascular diseases and in successful ageing: genetic background of male centenarians is protective against coronary heart disease. *J Med Genet*. 2004;41(10):790-4.
 33. Figueiredo CA, Barreto ML, Alcantara-Neves NM et al. Coassociations between IL10 polymorphisms, IL-10 production, helminth infection, and asthma/wheeze in an urban tropical population in Brazil. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;131(6):1683-90.
-

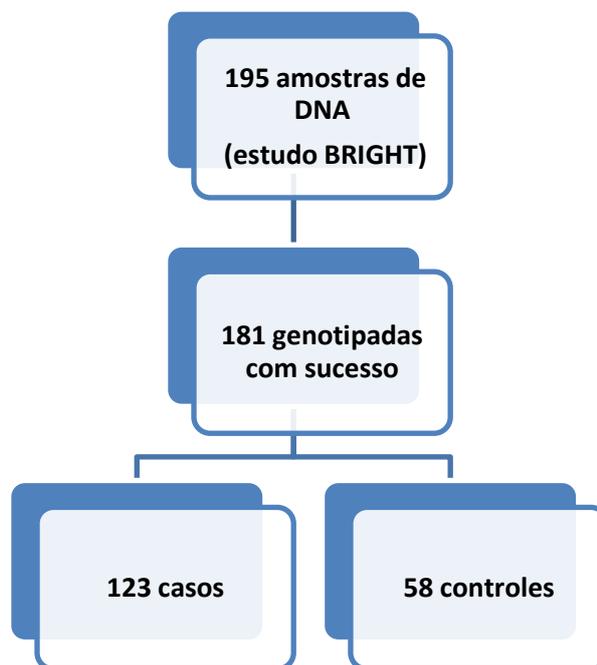
TABELAS/FIGURAS

Figura 1. Fluxograma com a amostra inicial e final do estudo.

Tabela 1 – Dados descritivos da amostra comparando o grupo de estudo versus o grupo controle.

| Variáveis | Asma (n =123) | Controles (n = 58) | <i>p</i> |
|---|--------------------|-----------------------|------------|
| Idade, anos | 11.17±1.09 | 11.28±1.24 | 0.537 |
| Sexo masculino, n (%) | 63 (51.2) | 27 (46.6) | 0.558 |
| Peso ao nascimento, g | 3.40±0.57 | 3.29±0.45 | 0.228 |
| Atopia, n (%) | 90 (75.6) | 31 (54.4) | 0.004* |
| VEF₁, escore Z[†] | -0.01±1.06 | -0.02±0.94 | 0.953 |
| CVF, escore Z[‡] | 0.29±1.09 | 0.01±0.98 | 0.121 |
| VEF₁/CVF, escore Z[§] | -0.50±0.91 | -0.13±0.70 | 0.013** |
| FEF_{25-75%}, escore Z[¶] | -0.43±1.06 | -0.00±0.91 | 0.015** |
| CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺, (% of cells) | 1.38 (0.39 – 3.25) | 0.25 (0.02– 0.52) | <0.0001*** |

[†]VEF₁: volume expiratório forçado no primeiro segundo; [‡]CVF: capacidade vital forçada; [§]VEF₁ / CVF: índice de *Tiffenou*; [¶]FEF (25-75%): fluxo expiratório forçado entre 25 and 75%; *teste qui-quadrado (absoluto e relativo); ** Teste t de *Student* (média±DP); ***Teste U de *Mann-Whitney* (mediana e intervalo interquartil).

Tabela 2 - Variantes do gene da IL-10 incluídas no estudo.

| SNP | Posição no cromossomo | Localização no gene | Alelo | MAF (HapMap) | MAF (Amostra) |
|------------------|------------------------------|----------------------------|--------------|---------------------|----------------------|
| rs1518111 | 206944645 | Íntron 1 | A/G | 0,42 | 38,62 % (A) |
| rs3024490 | 206945311 | Íntron 1 | G/T | 0,40 | 40,65% (G) |
| rs3024496 | 206941864 | Exon 5 | C/T | 0,31 | 29,83% (T) |
| rs3024491 | 206771701 | Íntron 2 | G/T | 0,28 | 27,45% (G) |

Legenda: MAF: Minor allele frequency

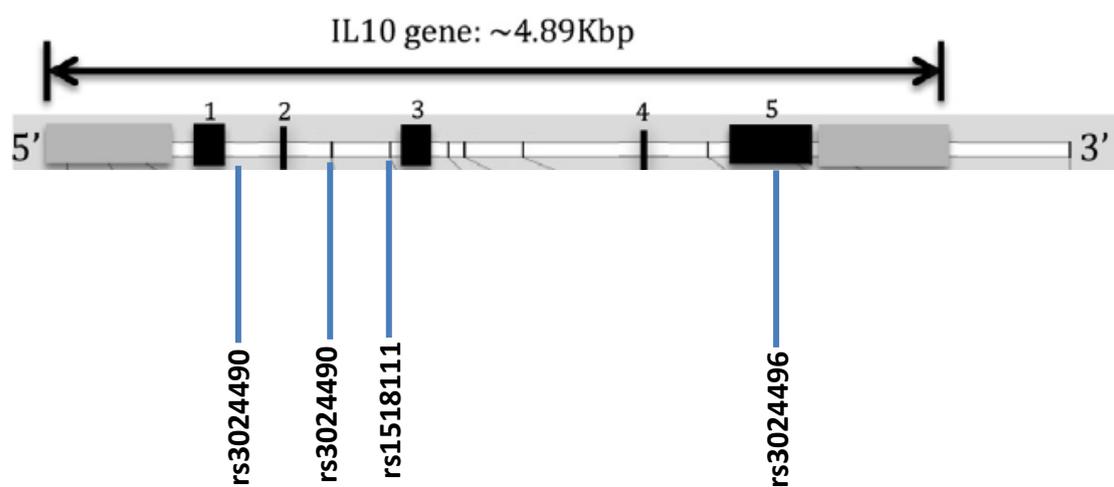
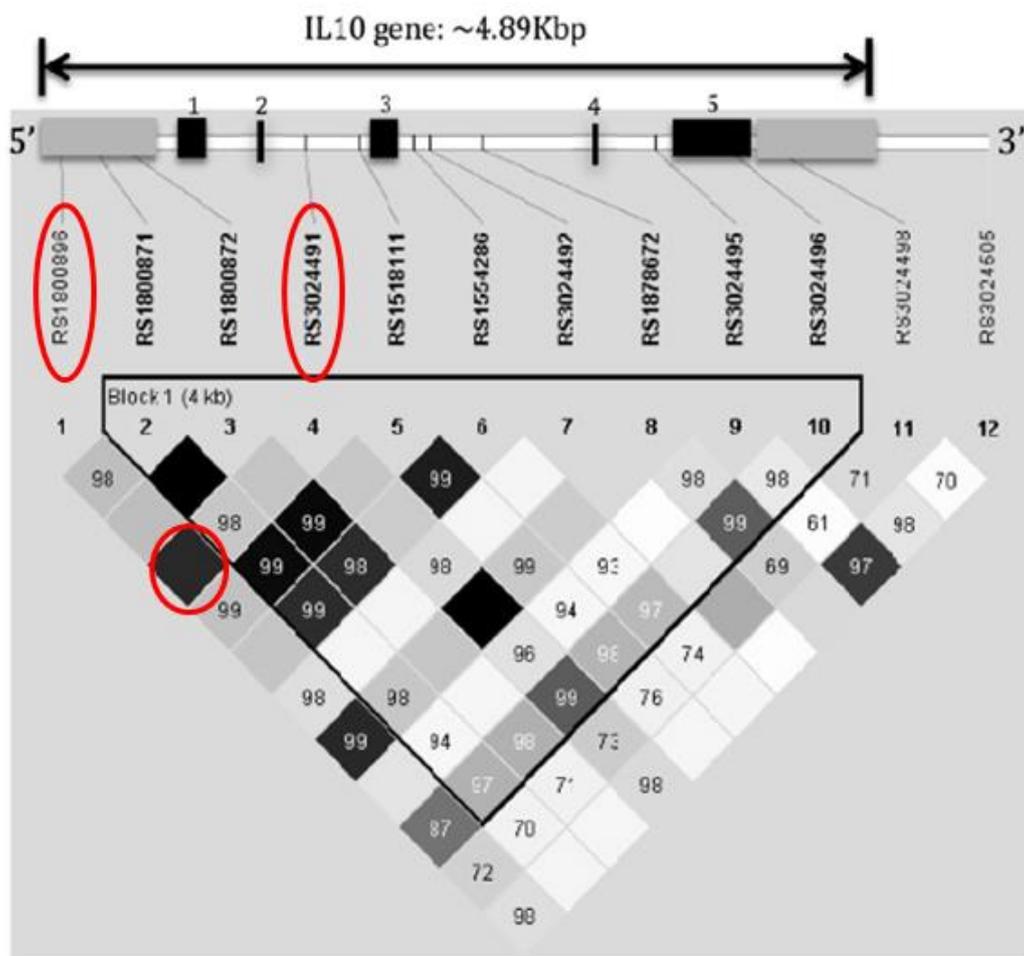


Figura 2. Localização dos SNPs do estudo no gene da IL-10.



Fonte: Figueiredo et al, JACI, 2012

Figura 3. Pairwise Linkage disequilibrium no Haploview usando a estatística R^2 ao quadrado para o gene da *IL-10*. A intensidade do sombreamento indica o grau de confiança no valor R^2 . Os quadrados sólidos escuros indicam $R^2=1$. O SNP rs3024491 está, aproximadamente, 100% em LD com o SNP 1800896 da região promotora do gene da *IL-10*.

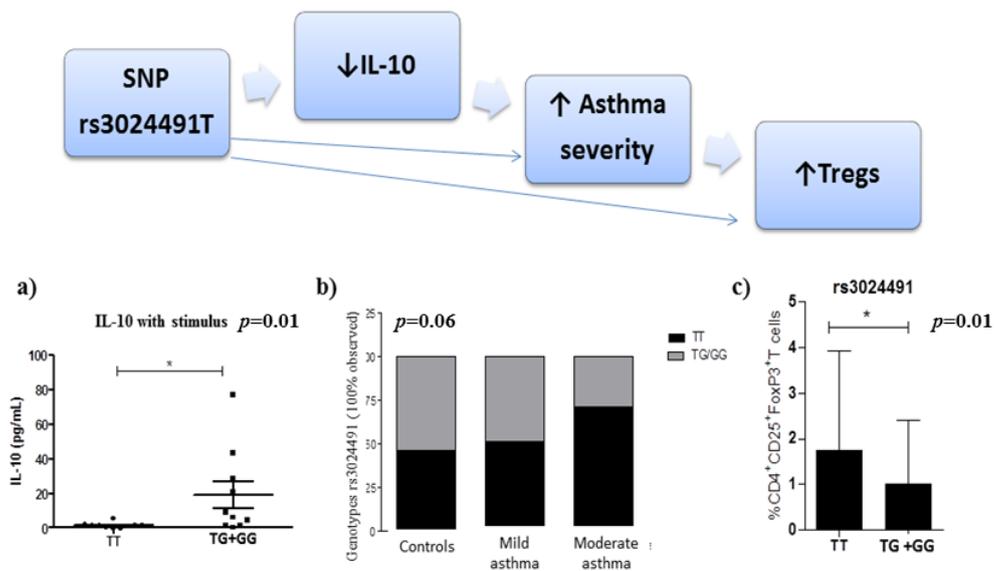


Figura 4. Associação entre o SNP rs3024491 do gene da IL-10 e os níveis da proteína IL-10 (a), gravidade da asma (b) e frequência de Tregs (c). Legenda: Genótipo TT, genótipo TG, genótipo GG.