ISABEL CRISTINA JACINTO DE FARIA

INVESTIGAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS DOS GENES:

TGFB1, CD14, IL4, IL4 -Ra, e ADAM33 com a gravidade da asma atópica entre crianças e adolescentes

CAMPINAS

2007

ISABEL CRISTINA JACINTO DE FARIA

INVESTIGAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS DOS GENES:

TGFB1, CD14, IL4, IL4 -Ra, e ADAM33 com a gravidade da asma atópica entre crianças e adolescentes

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas, área de concentração em Ciências Biomédicas.

ORIENTADORA: *CARMEN SÍLVIA BERTUZZO*

CAMPINAS

2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP
Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

Faria, Isabel Cristina de
F225i Investigação da associação entre os polimorfismos dos genes : TGFBI, CD14, IL4, IL4-RA, e ADAM33 com a gravidade da asma atópica entre crianças e adolescentes / Isabel Cristina de Faria. Campinas, SP : [s.n.], 2007.

Orientador : Carmen Silvia Bertuzzo
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Asma. 2. Polimorfismos (Genética). 3. Genes. I. Bertuzzo, Carmen Silvia. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : Polymorphisms in the TGFB1, CD14,IL4-RA, ADAM33 genes and asthma severity

Keywords: • Asthma
• Polymorphisrms
• Gene

Área de concentração : Ciências Médicas
Titulação: Doutorado emGenética Médica

Banca examinadora: Profa. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
Profa. Dra. Marilda de Souza Gonçalves
Profa. Dra. Mônica Barbosa de Melo
Profa. Dra. Vera Lúcia Gil da Silva Lopes
Prof Dr Walter Pinto Júnior

Data da defesa: 26-02-2007

Banca Examinadora da Dissertação de Doutorado

Orientador (a): Prof. (a). Dr (a). CARMEN SÍLVIA BERTUZZO

MEMBROS:
1- Carmen Sílvia Bertuzzo
2- Marilda de Souza Gonçalves
3- Mônica Barboza de Melo
4- Walter Pinto Júnior
5- Vera Lúcia Gil da Silva Lopes

Curso de Pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 26/02/2007

DEDICATÓRIA

Aos meus pais por tudo de bom que proporcionam

A minha imã pela força e companherismo

Deus em primeiro lugar, pela força que tem me dado para enfrentar os desafios.

Aos meus pais, Eurides e Neide, pelo amor e apoio em tudo que faço.

À minha irmã, Elisangela, pelos desabafos do dia a dia, pelo incentivo, pelo companheirismo.

À Carmen pela orientação, confiança e sugestões.

Ao Dr. José Dirceu Ribeiro e a Dra. Adyleia A. Dallo Contreia Toro, pela obtenção dos pacientes e o auxílio em sua classificação.

Aos estagiários do laboratório que me ajudaram, especialmente, João Paulo, Cristiane, Márcia, os estagiários do Anglo, especialmente, Natália e Renata (Lucilinha), pela ajuda em fazer aqueles intermináveis géis, montar placa, aplicar... e pela amizade, que criamos.

À Madá, por ter feito a extração de DNA das amostras controle e pela amizade que conquistamos.

Aos meus amigos do laboratório, Lili, Daniela Furgeri, Lidiane, Lucila, Estela, Renato pelos momentos alegres que passamos no laboratório, apesar dos muitos afazeres, criávamos um clima de alegria e descontração e também pelos nossos almoços.

Ao Anderson e Fábio por sempre tirarem minhas amostras de PCR da máquina, para não ficarem durante a noite. Á Marilza que é uma pessoa super dedicada ao laboratório. Enfim, ao pessoal do laboratório em geral.

PÁG.

RESUMO..... *xxxi*

ABSTRACT..... *xxxv*

1- INRODUÇÃO..... 39

1.1- Asma..... 41

1.1.1- Definição..... 41

1.1.2- Epidemiologia..... 42

1.1.3- Patologia e Patogenia..... 44

1.1.4- Classificação da Asma..... 45

1.2- Asma e Genética..... 47

1.3- TGF-B (Fator de crescimento transformante β)..... 49

1.3.1- Características estruturais de TGF-β e mecanismos de sinalização 49

1.3.2- A função de TGF-β na patogenia de doenças pulmonares..... 50

1.3.3- TGF-β1(Fator de crescimento transformante β1)..... 50

1.3.4- Possíveis funções de TGF-β1 nas vias aéreas de asmáticos 51

1.3.5- Polimorfismos de TGF-β1 52

1.4- CD14..... 54

1.4.1- Polimorfismo C-159T do gene CD14..... 55

1.5- IL-4 e IL-4Ra..... 56

1.5.1- Polimorfismos C-590T do gene da IL-4 e Ile50val do gene IL-4Ra..... 58

1.6- ADAM33..... 59

1.6.1- Associações de ADAM33 com Asma..... 60

2- OBJETIVOS..... 65

3- MATERIAL E MÉTODOS..... 69

3.1- Material 71

3.2- Métodos..... 71

3.2.1- Avaliação clínica da asma atópica (AA)..... 71

3.2.2- Extração de DNA de leucócitos..... 72

3.2.3- TGF – β1..... 73

3.2.4- CD14..... 76

3.2.5- IL-4 78

3.2.6- IL-4Ra..... 79

3.2.7- ADAM33..... 80

3.2.8- Análise dos dados..... 82

4- RESULTADOS..... 83

4.1- Caracterização da amostra..... 85

4.2- Análise das mutações..... 91

4.2.1- T869C (TGF-β1)..... 91

4.2.1.1- C-509T (TGF-β1)..... 93

4.2.2- C-159T (CD14)..... 95

4.2.3- Ile50Val (IL4R)..... 98

4.2.4- C-590T (IL4)..... 101

4.2.5- S_2 (ADAM33)..... 103

5- DISCUSSÃO..... 107

6- CONCLUSÃO..... 115

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 119

8- ANEXOS..... 137

AA	Asma atópica
ADAM33	Desintegrina e metaloprotease 33
ATS	American Thoracic Society
BHR	Hiper-responsividade brônquica
COPD	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EHW	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
FCM	Faculdade de Ciências médicas
GINA	Global Iniciative for Asthma
HC	Hospital das Clínicas
IgE	Imunoglobulina E
IL	Interleucina
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PFP	Prova de função pulmonar
SNP	Polimorfismos de base única
TGF-β	Fator de crescimento Transformante- β
TH	Célula T helper
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas – SP
VEF1	Volume expiratório forçado do primeiro segundo

		PÁG.
Tabela 1-	Classificação de gravidade clínica da asma, segundo GINA (Global Iniciative for asthma).....	46
Tabela 2-	Distribuição de pacientes asmáticos leves, moderados e graves quanto ao gênero e idade, provenientes do Ambulatório de Imunologia, Alergia e Pneumologia do Departamento de Pediatria da FCM – UNICAMP.....	85
Tabela 3-	Comparação da freqüência alélica do polimorfismo T869C do gene *TGF-β1* entre pacientes asmáticos e o grupo controle.....	91
Tabela 4-	Comparação da freqüência genotípica do polimorfismo T869C do gene *TGF-β1* entre pacientes asmáticos e o grupo controle.....	92
Tabela 5-	Distribuição da freqüência alélica por gravidade da asma quanto ao polimorfismo T869C do gene *TGF-β1*.....	92
Tabela 6-	Distribuição da freqüência genotípica por gravidade da asma quanto ao polimorfismo T869C do gene *TGF-β1*.....	92
Tabela 7-	Comparação da distribuição da freqüência genotípica da asma grave com o grupo controle quanto ao polimorfismo T869C do gene *TGF-β1*.....	93
Tabela 8-	Distribuição da freqüência genotípica por gravidade da asma II quanto ao polimorfismo T869C do gene *TGF-β1*.....	93
Tabela 9-	Comparação da freqüência alélica do polimorfismo C509T do gene *TGF-β1* entre pacientes asmáticos e o grupo controle.....	94

Tabela 10- Comparação da freqüência genotípica do polimorfismo C509T do 94

gene *TGF-β1* entre pacientes asmáticos e o grupo controle.....

Tabela 11- Distribuição da freqüência alélica por gravidade da asma quanto ao polimorfismo C509T do gene *TGF-β1*..... 94

Tabela 12- Distribuição da freqüência genotípica por gravidade da asma quanto ao polimorfismo C509T do gene *TGF-β1*..... 95

Tabela 13- Distribuição da freqüência genotípica por gravidade da asma II quanto ao polimorfismo C-509T do gene *TGF-β1*..... 95

Tabela 14- Comparação da freqüência alélica do polimorfismo C-159T do gene *CD14* entre pacientes asmáticos e o grupo controle..... 96

Tabela 15- Comparação da freqüência genotípica do polimorfismo C-159T do gene *CD14* entre pacientes asmáticos e o grupo controle 96

Tabela 16- Distribuição da freqüência alélica por gravidade da asma quanto ao polimorfismo C-159T do gene *CD14*..... 97

Tabela 17- Distribuição da freqüência genotípica por gravidade da asma quanto ao polimorfismo C-159T do gene *CD14*..... 97

Tabela 18- Comparação da distribuição da freqüência genotípica da asma grave com o grupo controle quanto ao polimorfismo C-159T do gene *CD14*..... 98

Tabela 19- Distribuição da freqüência genotípica por gravidade da asma II quanto ao polimorfismo C-159T do gene *CD14*..... 98

Tabela 20- Comparação da freqüência alélica do polimorfismo Ile50Val do gene *IL4R* entre pacientes asmáticos e o grupo controle..... 99

Tabela 21- Comparação da freqüência genotípica do polimorfismo Ile50Val do gene *IL4R* entre pacientes asmáticos e o grupo controle..... 99

Tabela 22- Distribuição da freqüência alélica por gravidade da asma quanto ao polimorfismo Ile50Val do gene *IL4R*..... 99

Tabela 23- Distribuição da freqüência genotípica por gravidade da asma 100

quanto ao polimorfismo Ile50Val do gene *IL4R*.....

Tabela 24- Comparação da distribuição da freqüência genotípica da asma leve com a asma grave quanto ao polimorfismo Ile50Val do gene *IL4R*..... 100

Tabela 25- Distribuição da freqüência genotípica por gravidade da asma II quanto ao polimorfismo Ile50Val do gene *IL4R*..... 100

Tabela 26- Comparação da freqüência alélica do polimorfismo C-590T do gene *IL4* entre pacientes asmáticos e o grupo controle..... 101

Tabela 27- Comparação da freqüência genotípica do polimorfismo C-590T do gene *IL4* entre pacientes asmáticos e o grupo controle..... 101

Tabela 28- Distribuição da freqüência alélica por gravidade da asma quanto ao polimorfismo C-590T do gene *IL4*..... 102

Tabela 29- Distribuição da freqüência genotípica por gravidade da asma quanto ao polimorfismo C-590T do gene *IL4*..... 102

Tabela 30- Distribuição da freqüência genotípica por gravidade da asma II quanto ao polimorfismo C-590T do gene *IL4*..... 102

Tabela 31- Comparação da freqüência alélica do polimorfismo S_2 do gene ADAM33 entre pacientes asmáticos e o grupo controle..... 103

Tabela 32- Comparação da freqüência genotípica do polimorfismo S_2 do gene ADAM33 entre pacientes asmáticos e o grupo controle 104

Tabela 33- Distribuição da freqüência alélica por gravidade da asma quanto ao polimorfismo S_2 do gene *ADAM33*..... 104

Tabela 34- Distribuição da freqüência genotípica por gravidade da asma quanto ao polimorfismo S_2 do gene *ADAM33*..... 104

Tabela 35- Comparação da distribuição da freqüência genotípica da asma 105

leve com o grupo controle quanto ao polimorfismo S_2 do gene *ADAM33*.....

Tabela 36- Comparação da distribuição da freqüência genotípica da asma grave com o grupo controle quanto ao polimorfismo S_2 do gene *ADAM33*..... 105

Tabela 37- Distribuição da freqüência genotípica por gravidade da asma II quanto ao polimorfismo S_2 do gene *ADAM33*..... 105

		PÁG.
Figura 1-	Prevalência de sintomas de asma no mundo.....	43
Figura 2 -	Representação da localização dos polimorfismos no gene *TGF-β1*(C-509T, T869C).....	53
Figura 3-	Relação da IL4 na patogenia da asma.....	58
Figura 4a-	Estrutura dos domínios de ADAM33 em relação a suas funções.....	61
Figura 4b-	Localização de SNPs no gene *ADAM33*.....	62
Figura 5-	Representação da estrutura tridimensional da proteína ADAM33, com especificidade ao substrato.....	62
Figura 6-	Representação das variantes presentes no gene ADAM33 em splicing alternativos em fibroblastos.....	63
Figura 7-	Análise do polimorfismo T869C.....	74
Figura 8-	Análise do polimorfismo C-509T.....	76
Figura 9-	Análise do polimorfismo C-159T.....	77
Figura 10-	Análise do polimorfismo C-590T.....	79
Figura 11-	Análise do polimorfismo ILe50Val.....	80
Figura 12-	Análise do polimorfismo S_2.....	81

PÁG.

Gráfico 1- Distribuição dos pacientes asmáticos, provenientes do Ambulatório de Imunologia, Alergia e Pneumologia do Departamento de Pediatria da FCM-UNICAMP, quanto à raça..... 89

Gráfico 2- Distribuição dos pacientes asmáticos, provenientes do Ambulatório de Imunologia, Alergia e Pneumologia do Departamento de Pediatria da FCM–UNICAMP, quanto ao gênero..... 89

Gráfico 3- Distribuição do grupo controle quanto à raça..... 90

Gráfico 4- Distribuição do grupo controle quanto ao gênero..... 90

RESUMO

A Asma é uma doença inflamatória crônica de vias aéreas, na qual várias células têm papel fundamental, tais como os eosinófilos, mastócitos e linfócitos T. O processo inflamatório está associado à hiper-responsividade brônquica a uma variedade de estímulos. A asma é uma doença genética complexa e multifatorial que não acompanha os padrões monogênicos de hereditariedade. Estudos de ligação sugerem que múltiplos genes estão envolvidos na patogenia dessa doença. O objetivo desse trabalho é verificar em uma amostra de pacientes com asma leve, moderada e grave, uma possível associação entre os polimorfismos dos genes *TGF-β1, CD14, IL-4, IL-4Ra, ADAM33* e a gravidade da asma. A análise do polimorfismo T869C do gene *TGF-β1* foi realizada pela técnica de PCR + ARMS. Os outros polimorfismos C-509T do gene *TGF-β1*, C-159T do gene *CD14*, C-590T da *IL-4*, Ile50Val da *IL-4Ra* , S2 do gene *ADAM33* foram detectados por PCR + enzima de restrição. Em relação ao polimorfismo T869C (TGF-β1), em nossa amostra observou-se uma associação entre o genótipo CC e os pacientes portadores de asma grave. Quanto ao polimorfismo C-509T(TGF-β1*),* nenhuma associação foi encontrada. Quando se comparou a distribuição da frequência genotípica do polimorfismo C-159T(CD14) na asma grave com o grupo controle foi observado um resultado significativo com genótipos TT e CT. Não encontramos associação entre C-590T (IL4*)* e asma. Houve significância entre o genótipo Val/Val (IL-4Ra) e a asma leve. O heterozigoto GC do polimorfismo S_2 (ADAM33) com a asma leve e grave. O homozigoto CC com a asma leve. Nossos resultados indicam que os polimorfismos T869C(TGF-β1) e C-159T(CD14) podem estar envolvidos na modulação da gravidade da asma.

ABSTRACT

Asthma is a chronic inflammatory disease affecting air pathways, in which several cells, such as eosinophils, mastocytes and T lymphocytes, play fundamental roles. The inflammatory process is associated with bronchial hyperresponsiveness to a variety of stimulus types. Asthma is a complex and multifactorial genetic disease that does not follow the monogenic line of hereditary patterns. Linkage studies suggest that multiple genes are involved in its pathogenesis. The objective of this work was to verify, in a sample of patients with mild, moderate and acute asthma, a possible association between *TGF-β1, CD14, IL-4, IL-4Ra, ADAM33* gene polymorphisms and asthma severity. The T869C polymorphism of the *TGF-β1* gene was analyzed using the ARMS-PCR technique. The other polymorphisms C-509T of the *TGF-β1* gene, C-159T of the *CD14* gene, C-590T of the *IL-4* gene, Ile50Val of the *IL-4Ra* gene , S2 of the *ADAM33* gene were be detected by PCR + restriction analysis. The T869C polymorphism (TGF-β1) in our sample showed an association between the CC genotype and the patients who presented acute asthma. No association was found concerning the C-509T (TGF-β1) polymorphism. Comparing the genotype distribution of the C-159T (CD14) polymorphism on the control group of acute asthma, a significant result with TT and CT genotypes was observed. There was no association between C-590T (IL4) and asthma. There was a significant association between Val/Val (IL-4Ra) genotype and mild asthma. The GC heterozygote of the S_2 polymorphism (ADAM33) with acute and mild asthma. The CC homozygote and mild asthma. The results indicated that T869C (TGF-β1) and C-159T (CD14) polymorphisms can modulate asthma severity.

1 - INTRODUÇÃO

1.1- Asma

1.1.1- Definição

Em 1889, William Osler descreveu alguns dos aspectos patológicos da asma brônquica, como o edema da mucosa e a presença de bronquiolite exsudativa. Em 1920, a asma era definida como "uma doença caracterizada por dificuldade para respirar devido a um espasmo brônquico recorrente, acompanhado de sibilos, tosse e expectoração". Desde então, o conceito de asma tem sido discutido e modificado (Sears, 1993). Em 1997, o workshop do "International Consensus Report on Diagnosis and Managment of Asthma" do NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH (NIH) definiu asma como sendo "uma doença inflamatória crônica de vias aéreas, na qual várias células têm papel fundamental tais como os eosinófilos, mastócitos e linfócitos T". Em indivíduos suscetíveis, esta inflamação causa episódios recorrentes de dispnéia, chiado e tosse, principalmente à noite ou no início da manhã. Esses sintomas estão associados à obstrução brônquica que é, ao menos parcialmente reversível espontaneamente ou com tratamento. O processo inflamatório está associado à hiper-responsividade brônquica a uma variedade de estímulos.

O III Consenso Brasileiro no Manejo da Asma de 2002 (Sociedade Brasileira de Alergia e Imunopatologia, Sociedade Brasileira de Pediatria, Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia, Sociedade Brasileira de Clínica Médica, 2002) define asma como uma doença inflamatória crônica caracterizada por hiper-responsividade das vias aéreas inferiores, e por limitação variável ao fluxo aéreo, reversível espontaneamente ou com tratamento, manifestando-se clinicamente por episódios recorrentes de sibilância, dispnéia, aperto no peito e tosse, particularmente à noite e pela manhã ao despertar. Resulta de uma interação entre genética, exposição ambiental e outros fatores específicos que levam ao desenvolvimento e manutenção dos sintomas.

As definições mais recentes dão uma maior ênfase na asma como um processo inflamatório crônico, e acrescentam as células como causa da inflamação, ressaltando os mediadores celulares como os principais responsáveis pela resposta inflamatória. Sem dúvida a inflamação brônquica constitui o fator fisiopatogênico mais importante na asma alérgica e não alérgica.

1.1.2- Epidemiologia

De acordo com GINA (Global Iniciative for asthma), a asma afeta cerca de 14 a 15 milhões de pessoas, sendo 4,8 milhões de crianças (National Heart Lung Blood Institute / World Health Organization, 1995). Anualmente ocorrem cerca de 350.000 internações por asma no Brasil, constituindo-se na quarta causa de hospitalização pelo SUS (2.3% do total) e sendo a terceira causa entre crianças e adultos jovens (Ministério da Saúde, 2000). Há registro de aumento desse número de internações entre 1993 e 1999 e indícios de que a prevalência da asma esteja aumentando em todo o mundo, inclusive no Brasil (Fiori e Fristcher, 2001). Um estudo multicêntrico (International Study for Asthma and Allergies in Childhood – Isaac, 1998) realizado em 56 países mostrou uma variabilidade de asma ativa de 1.6% na Indonésia a 36.8% no Reino Unido. O Brasil está em oitavo lugar, com uma prevalência média de 20% (Figura 1).

A mortalidade por asma ainda é baixa, mas apresenta uma magnitude crescente em diversos países e regiões. Nos países em desenvolvimento, a mortalidade por asma vem aumentando nos últimos 10 anos, correspondendo a 5-10% das mortes por causa respiratória, com elevada proporção de óbitos domiciliares (Chatkin et al.; 1999).

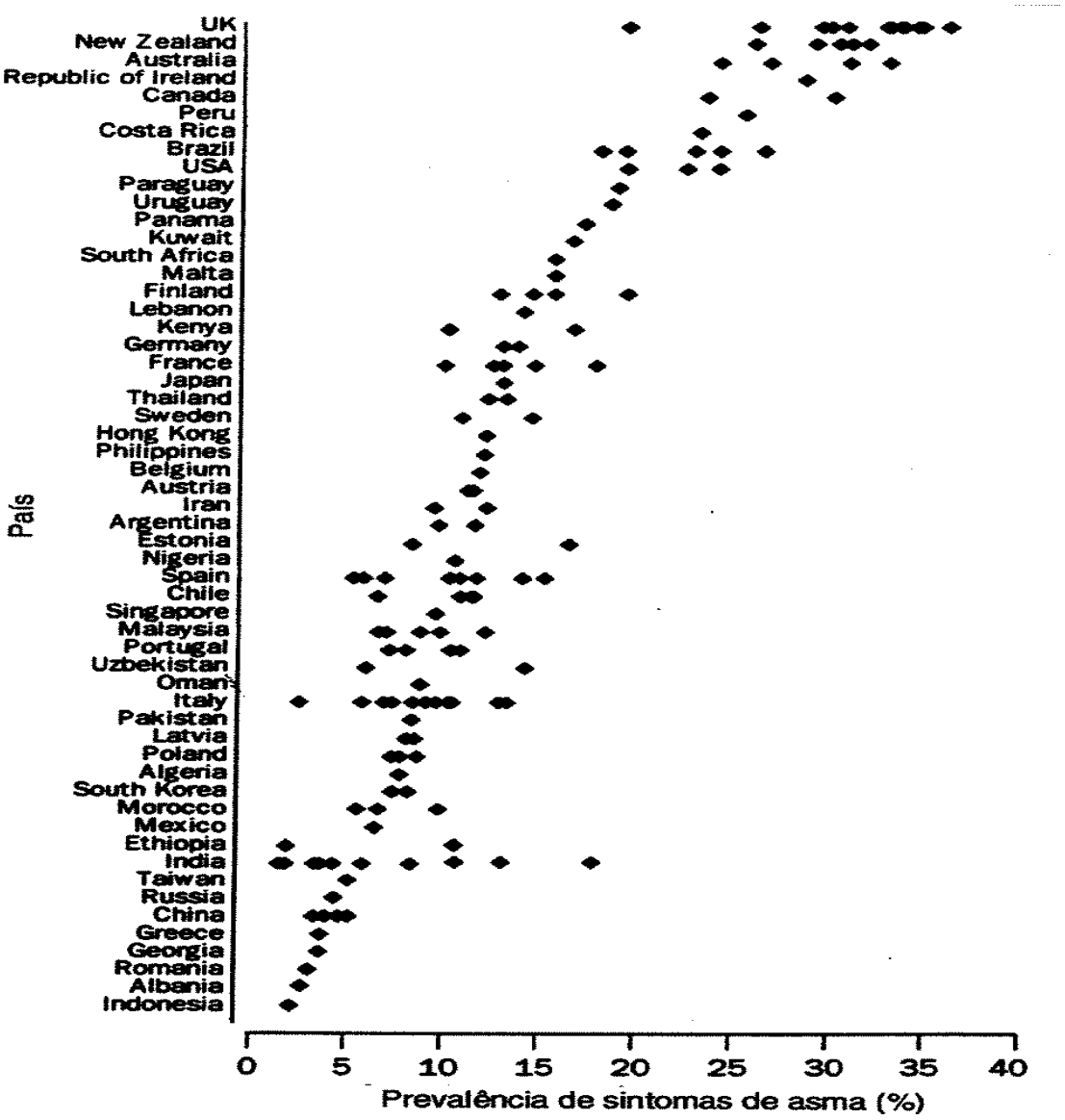

Fig 1- Prevalência de sintomas de asma no mundo, segundo Isaac (1998)

1.1.3- Patologia e Patogenia

A limitação do fluxo aéreo nas vias aéreas é causada por uma variedade de alterações que incluem:

1- Vasodilatação e congestão da microvascularização brônquica, com aumento na exsudação de plasma para o interstício e luz das vias aéreas e conseqüente edema. Mesmo quantidades pequenas de líquido intraluminal podem determinar aumento importante na resistência das vias aéreas. Ocorre ainda infiltração de células inflamatórias nos brônquios, principalmente por eosinófilos, linfócitos, mastócitos e macrófagos, descamação do epitélio brônquico e espessamento da membrana basal reticular (Naylor, 1992);

2- Hipersecreção mucosa, hipertrofia das glândulas mucosas, aumento das células caliciformes, com aumento de secreção intraluminal, e obstrução das vias aéreas por rolhas de muco. A presença de rolhas de muco indica deficiência crônica no sistema secretor de muco ou no "clearance" mucociliar, ou em ambos. Elas são especialmente viscosas e auxiliam na limitação ao fluxo aéreo (Djukanovic et al.; 1990);

3- Contração e encurtamento da musculatura lisa espiral, que envolve a via aérea, com aumento da massa muscular, hipertrofia e hiperplasia muscular (Bousquet et al.; 1990);

4- Remodelamento brônquico que são alterações estruturais na parede das vias aéreas que acompanham a inflamação intensa e de longa duração e que são responsáveis pela limitação ao fluxo aéreo, que pode ser irreversível mesmo com o tratamento, resultando em obstrução fixa irreversível (Bousquet et al; 1992).

A inflamação brônquica constitui o mais importante fator fisiopatogênico da asma . É resultante de interações complexas entre células inflamatórias , mediadores e de outras células residentes das vias aéreas.

Na asma atópica há uma predisposição genética para o desenvolvimento de resposta mediada pela IgE (imunoglobulina E) a alérgenos comuns. A inflamação, na asma, é caracterizada pela inflamação de eosinófilos. Há um aumento de linfócitos T-helper (Th2), que produzem e liberam linfocinas, interleucinas 4 (IL-4) e 5 (IL-5), que parecem orquestrar a inflamação de eosinófilos. Os anticorpos de IgE se ligam a receptores de alta afinidade, presentes em mastócitos, ocorrendo a degranulação de mastócitos com liberação

de mediadores (histamina, prostaglandinas, leucotrienos) (Barnes, 2000). Ocorrem ainda, várias interações complexas, envolvendo muitas células. Esses fatores vão desencadear a hiper-responsividade brônquica e a obstrução do fluxo aéreo, que caracterizam a asma.

A asma é uma doença crônica das vias aéreas, associada com o remodelamento da matriz extracelular (ECM) do pulmão (Bousquet et al.; 1992). As enzimas proteolíticas têm o potencial de destruir as estruturas do pulmão, quando suas atividades excedem a capacidade de seus inibidores naturais. Algumas células que participam da inflamação das vias aéreas, secretam enzimas capazes de degradar proteínas da ECM, incluindo a elastina (Senior et al., 1989).

Vários mediadores inflamatórios são liberados pelos mastócitos brônquicos (histamina, leucotrienos, triptase e prostaglandinas), pelos macrófagos (fator de necrose tumoral -TNFα, IL-6, óxido nítrico), pelos linfócitos T (IL-2. IL-3, IL-4, IL-5, fator alfa de colônia de granulócitos (GM-CSF), pelos eosinófilos (metabólitos pró-inflamatórios, mediadores lipídicos e citocinas), pelos neutrófilos (elastase) e pelas células epiteliais (endotelina-1, mediadores lipídicos e óxido nítrico). Através de seus mediadores as células causam lesões e alterações na integridade epitelial, anormalidades no tônus da via aérea, alterações na permeabilidade vascular, hipersecreção de muco, mudanças na função mucociliar e aumento da reatividade do músculo liso da via aérea (Kumar, 2001).

1.1.4- Classificação da Asma

A asma pode ser classificada quanto à gravidade em intermitente e persistente leve, moderada e grave.

Estima-se que 60% dos casos de asma sejam intermitentes ou persistentes leves, 25% a 30% moderados e 5% a 10% graves. Os asmáticos graves são a minoria, mas representam a parcela maior em utilização de recursos.

A avaliação usual da gravidade da asma pode ser feita pela análise da freqüência e intensidade dos sintomas e pela função pulmonar. A tolerância ao exercício, a medicação necessária para estabilização dos sintomas, o número anual de corticosteróide sistêmico, o número de hospitalizações por asma e a necessidade de ventilação mecânica

são aspectos também utilizados para classificar a gravidade de cada caso (Cockcroft e Swystum, 1996).

Na Tabela 1 são apresentados os principais parâmetros para a classificação da gravidade da asma.

Tabela 1- Classificação de gravidade clínica da asma, segundo GINA (Global Iniciative for asthma) reforçado pelo Guidelines for the diagnosis and management of Asthma

Classificação da asma	Sintomas	Sintomas Noturnos	Crises	Atividades	Função Pulmonar
Asma Leve Intermitente	- Sintomas diurnos menos de 1 vez por semana.	- Até duas vezes por mês.	- Exacerbações curtas (menos de 3 dias de duração).	- Em geral normais. Falta ocasional ao trabalho ou escola.	VEF1 maior ou igual a 80% do previsto.
Asma Leve Persistente	- Sintomas diurnos uma vez por semana ou mais, mas menos de uma vez ao dia.	- Mais de uma vez por mês.	- Exacerbações podem afetar a atividade ou o sono.	- Limitação para grandes esforços. Faltas ocasionais ao trabalho ou escola.	VEF1 maior ou igual a 80% do previsto.
Asma Moderada Persistente	- Sintomas diurnos diários, mas não contínuos.	- Mais de uma vez por semana.	- Exacerbações afetam a atividade diária e o sono.	Prejudicadas. Algumas faltas ao trabalho ou escola.	VEF1 maior que 60% e menor ou igual a 80% do previsto.
Asma Grave Persistente	- Sintomas diurnos diários e contínuos. Podem ocorrer várias vezes ao dia. - Necessidade de uso de β agonistas para controle dos sintomas.	- Mais de 2 vezes por semana.	- Exacerbações freqüentes, podendo até ser diárias.	Limitação diária. Falta freqüente ao trabalho e escola.	VEF1 menor ou igual a 60% do previsto.

VEF1= volume expiratório forçado no primeiro segundo

1.2- Asma e Genética

A asma é uma doença genética complexa e multifatorial (Marsh e Meyers, 1992; Morton, 1992). Estudos de ligação sugerem que múltiplos genes estejam envolvidos na patogenia da asma. Estudos de gêmeos têm mostrado que aproximadamente 50 a 60% da asma é hereditária (Laitinen et al.; 1998; Skadhauge et al.;1999). A natureza de fatores hereditários, as variações genéticas que influenciam a susceptibilidade da asma e sua severidade, tem sido o motivo de intensas pesquisas nos últimos 15 anos. Essas pesquisas têm induzido a significantes idéias da patofisiologia da asma. A identificação de genes da asma é, entretanto, somente o começo de um longo processo através do entendimento de suas funções na patogenia da doença (Holloway e Koppelman, 2007). A genética da susceptibilidade da asma é complexa, com o mesmo genótipo algumas vezes conferindo proteção ou risco dependendo da exposição ambiental relacionada. A susceptibilidade genética varia de acordo com a raça e fatores étnicos, os quais ressaltam a importância de estudos de replicação e funcionais (Holloway e Koppelman, 2007; Kiley et al.; 2007).

Os primeiros estudos de ligação identificaram os cromossomos (4q, 6p, 7p, 11q, 13q e 16q) relacionados com a asma (Daniels et al.; 1996). Em um estudo realizado em famílias americanas divididas por grupos raciais (africanos-americanos, caucasianos e hispânicos) foram encontradas seis novas regiões (2q33, 5p15, 11p15, 17p11, 19q13 e 21q21) e foram confirmados vários "loci" previamente identificados (5q23-31, 6p21-23, 12q14-24, 14q11-13) (Maddox e Schwartz, 2002). Em um estudo de famílias da Alemanha foram identificadas regiões de ligação com a asma nos cromossomos 2, 6, 9 e 12 (Wjst et al.; 1999). Em uma pesquisa no genoma de famílias dos Estados Unidos (Hutterites) foram identificadas cinco regiões 5q23-31, 12q15-24.1, 16p, 19q13 e 21q21 (Ober et al.; 1998).

As regiões mais comuns relacionadas com asma são: 2q14–q32, 5q31–q33, 6p21.3, 7q31, 11q13, 12q14.3–q24.31, 13q14, 14q11.2–q13, 16p21, 17q11.2, e 20p13. Vários genes de asma e atopia têm sido identificados por clonagem posicional incluindo o gene ADAM33 e numerosos outros genes têm sido investigados como genes candidatos baseado em suas funções (Castro-Giner et al.; 2006).

Uma série de genes têm sido analisados por terem polimorfismos que influenciam o desenvolvimento imune ou pulmonar e a resposta a fatores ambientais, talvez aumentando o risco de desenvolvimento da asma. No cromossomo 5q (5q31-33), há muitos genes relacionados à asma e alergia, como as interleucinas, o gene *CD14* e o *GM-CSF* (Maddox e Schwartz, 2002). A região 16p12.1, que contém o receptor de interleucina 4 (IL4RA), foi relacionada, em diferentes estudos, à asma e atopia (Hershey et al.; 1997, Kruse et al.; 2002). Há, no entanto, relatos que não demostraram essa associação (Kruse et al.; 1999). Polimorfismos no gene *IL-4* (5q31-33), também foram associados à asma e atopia (Beghé et al.; 2003). Outros estudos encontraram resultados controversos a esses relatos (Holloway et al.; 1999). Com relação aos polimorfismos no gene *CD14*, da mesma maneira, alguns autores encontraram associação com asma e atopia (Sharma et al.; 2004), enquanto outros não (Kedda et al.; 2005; Sengler et al.; 2003). O gene *TGF-β1* (fator de crescimento transformante β1) está localizado no cromossomo 19q13 e polimorfismos nesse gene estão relacionados em alguns estudos, com a gravidade da asma, mas em outros não houve essa associação (Mak et al., 2006). O gene *ADAM33* (desintegrina e metaloprotease 33) está localizado no cromossomo 20 e tem sido associado com asma (Jongepier et al.; 2004; Lee et al.; 2004; Poewell et al.; 2004). Entretanto, outros estudos não encontraram essa relação (Lind et al.; 2003).

Estudos sobre genética e asma irão proporcionar um entendimento maior da etiologia e patogenia da asma, contribuindo no futuro para uma terapêutica adequada. Como a asma é uma doença genética complexa, que não está totalmente elucidada e é muito freqüente em nosso meio, decidimos realizar esse estudo, identificando se polimorfismos em genes candidatos à asma, estão associados com a gravidade da doença. Sabendo quais polimorfismos em diferentes genes candidatos estão envolvidos com a asma, futuramente, poderemos saber como esses genes interagem e procurar estratégias para remediar seus efeitos. Portanto, esse tipo de pesquisa básica irá propiciar avanços até mesmo na terapêutica dessas anomalias. Sendo assim, apesar dos indivíduos que participaram da pesquisa não terem um benefício direto, o conhecimento gerado através desse projeto poderá trazer um ganho para todos os pacientes no futuro.

A seguir serão discutidos esses genes candidatos:

1.3- TGF-β (Fator de crescimento transformante - β)

O TGF-β é um membro da família de crescimento e fatores de diferenciação com múltiplas funções. É notável por sua capacidade de modular uma variedade de comportamentos de tipos celulares, incluindo a proliferação celular; diferenciação e apoptose. As isoformas de TGF-β têm sido mostradas serem essenciais para o desenvolvimento fetal e embrionário normal (Bartram e Speer, 2004).

1.3.1 Características estruturais de TGF-β e mecanismos de sinalização

Existem 3 isoformas de TGF-β (β1, β2, β3) que são estruturalmente relacionadas com 60 a 80% de seqüências homólogas. Os genes do *TGF-β1*, *TGF-β2* e *TGF-β3* foram mapeados nos cromossomos 19 (q13.1-q13.3), 1(q41) e 14 (q23-24), respectivamente (Bartram e Speer, 2004) .

Estes genes possuem bioatividades similares. Cada isoforma de TGF-β é sintetizada como parte de uma larga molécula precursora. Esta é clivada e sintetizada como uma proteína inativa contendo LAP (latency associated peptide). A ativação de TGF-β requer a dissociação de LAP (Miyazono, 1988; Wakefield, 1988). O TGF-β se liga a receptores 1 e 2 e sinalizadores intracelulares (moléculas Smad) que formam um complexo que é enviado para o núcleo, onde interagem com fatores transcricionais que regulam a ativação dos genes (Bartram e Speer, 2004) .

Em humanos, as células epiteliais dos brônquios contêm grandes quantidades da proteína TGF-β (Magnan et al.; 1994). As isoformas de TGF-β e seus receptores têm sido encontradas em macrófagos alveolares (Magnan et al.; 1994; Coker et al.; 1996; Khalil et al.; 1996), células mesenquimais (Coker et al.; 1996) , células do músculo liso das vias aéreas (Magnan et al.; 1994; Khalil et al.; 1996) e glândulas bronquiais (Jagirdar et al.; 1997). As células epiteliais alveolares contêm TGF-β 2 e 3 (Khalil et al.; 1996). Enquanto alguns estudos também detectaram TGF-β em epitélios normais (Cokeret al.; 1996; Jagirdar et al.; 1997), outros relataram a presença de TGF-β 1 em epitélios associados com fibrose (Khalil et al.; 1996).

A presença de TGF-β em pulmões normais sugere sua participação na regulação de processos fisiológicos normais para manter a homeostase do pulmão. Essas funções incluem uma imunomodulação local, a regulação da proliferação e diferenciação celular, como o controle do reparo do tecido normal (Bartram e Speer, 2004).

1.3.2- A função de TGF-β na patogenia de doenças pulmonares

Uma característica comum das várias formas de doenças pulmonares é um processo inflamatório com uma fase de lesão, seguida por uma fase de reparo do tecido (Magnan et al.; 1996; Elssner et al.; 2000). As lesões no tecido pulmonar por efeitos químicos, bacteriológicos ou imunológicos induzem a produção de TGF-β que limita algumas das reações inflamatórias e exercem função no remodelamento e reparo do tecido (Ahuja et al.; 1993). Se o processo de reparo for exagerado, induzirá a uma patologia pulmonar com fibrose, que está associada com um aumento do nível de TGF-β e seus receptores. A expressão aumentada de TGF- β tem sido mostrada por resultar em uma fibrose pulmonar grave (Sime et al.; 1998). Uma expressão aumentada de TGF-β tem sido relatada durante a fase do remodelamento do tecido em várias formas de doenças pulmonares como: asma (Vignola et al.; 1997), fibrose cística (Wojnarowski et al.; 1999), doenças pulmonares obstrutivas crônicas (De Boer et al.; 1998), bronquiolites (Magnan et al.; 1996) entre outras.

1.3.3- TGF-β1 (Fator de crescimento transformante -β1)

O TGF-β1 tem peso molecular de 25 kDa, e é derivado do processamento proteolítico de uma cadeia de 390 aminoácidos resultando em uma proteína madura de 112 aminoácidos (Massague, 1990).

É uma citocina multifuncional com numerosos efeitos biológicos como a indução de proliferação de fibroblastos e produção da matriz extracelular, diminuição da degradação de colágeno, quimiotaxia de macrófagos e mastócitos, e inibição do

crescimento de células epiteliais (De Boer et al.; 1998). O TGF-β1 está relacionado à patogenia da asma, sendo que níveis dessa citocina estão aumentados no lavado brônquico alveolar de asmáticos quando comparado com indivíduos não asmáticos (Redington et al.; 1997). O TGF-β1 é expresso por células epiteliais das vias aéreas, eosinófilos, linfócitos T helper tipo 2, macrófagos e fibroblastos e está relacionado a vários aspectos da fibrose, incluindo o depósito de proteínas da matriz extracelular como o colágeno e fibronectina (Roche et al.; 1989; Sime et al.; 1997). Uma das principais características do remodelamento é a fibrose subepitelial, que é aumentada em asmáticos graves (Minshall et al.; 1997).

Essa citocina é importante no crescimento, desenvolvimento, transformação, reparo de tecidos, fibrose e modulação da resposta imune inflamatória (Blobe et al.; 2000), mas sua função na asma não é clara. Estudos em modelos de roedores com asma, indicam que o TGF-β1 tenha ambos os efeitos, antiinflamatórios e pró-fibróticos (Sime et al.; 1997; Nakao, 2001). Os níveis do RNAm de TGF-β1 em eosinófilos são significantemente aumentados em pacientes com asma grave quando comparados com portadores de asma leve (Ohno e Nitta, 1996; Minshall et al.; 1997).

1.3.4- Possíveis funções de TGF-β1 nas vias aéreas de asmáticos

Os níveis de TGF-β1 têm sido demonstrados maiores nas vias aéreas de asmáticos do que em indivíduos normais (Redington et al.; 1997). As células inflamatórias, como os eosinófilos e células epiteliais bronquiais, são as principais fontes celulares de TGF-β1 em asmáticos.

Com base em estudos desenvolvidos em animais, os níveis elevados de TGF-β1 nas vias aéreas de asmáticos pode ser um resultado de compensação para inibir a ativação de vários tipos celulares que estão envolvidos na hiper-responsividade e inflamação das vias aéreas (Nakao, 2001).

Alternativamente, o TGF-β1 tem sido implicado no reparo de tecidos (Singer e Clark, 1999), níveis elevados de TGF-β1 nas vias aéreas de asmáticos podem estar envolvidos no processo de reparo de tecidos, que foram lesados pela inflamação.

Portanto, o TGF-β1 em asmáticos, pode ter a função de promover o processo de reparo nos tecidos e diminuir a hiper-responsividade e a inflamação das vias aéreas. Atividades persistentes de TGF-β1 induzidas pela inflamação crônica, as quais podem ser causadas por estimulações repetidas com alérgenos, podem induzir efeitos deterioráveis de TGF-β1, conhecidos como fibrose no tecido ou remodelamento das vias aéreas, os quais resultam na obstrução crônica do fluxo aéreo (Nakao, 2001).

1.3.5- Polimorfismos de *TGF-β1*

O gene de *TGF-β1* contém 7 éxons separados por 6 íntrons e está localizado no cromossomo 19, na região q13.1-q13.3 (Derynck et al.; 1987).

A expressão do TGF-β1 é influenciada por polimorfismos no gene e alguns desses polimorfismos podem estar associados com a asma e outras doenças (Grainger et al.; 1999). Estudos anteriores têm demonstrado que um polimorfismo de base única (SNP) na região promotora do gene *TGF-β1* (Fig 2), C-509T (C/T na posição -509) está relacionado a níveis elevados no plasma de TGF-β1 e IgE (Grainger et al.; 1999). Esse polimorfismo altera a ligação com o fator de transcrição Ying Yang1 (YY1), promovendo o aumento da transcrição do gene (Hobbs et al.; 1998). Entretanto, o efeito preciso do alelo T ou C na atividade de transcrição do gene *TGF-β1* ainda não é conhecido. Existem hipóteses de que o alelo T esteja relacionado com a asma (Silverman et al.; 2004), com a gravidade da asma (Pulleyn et al.; 2001) e com Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) (Celedon et al.; 2004). Grainger et al. (1999) mostraram que a concentração de TGF-β1 aumenta de acordo com os genótipos de C-509T: CC < CT < TT, sendo que a concentração de indivíduos com o genótipo TT é duas vezes maior do que os com genótipo CC.

Um outro polimorfismo T869C na posição +869 relativa ao sítio de iniciação da transcrição (posição +29 relativa ao sítio iniciador da tradução), o qual resulta na substituição do aminoácido leucina por uma prolina no códon 10, afeta os níveis de TGF-β1 (Awad et al.; 1998; Dunning et al.; 2003). Wu et al. (2004) mostraram que o alelo C é menos comum em indivíduos com DPOC (Doença pulmonar obstrutiva crônica) do que em

controles, sugerindo que a produção maior de TGF-β1 possa proteger contra o desenvolvimento de DPOC.

Mak et al. (2006) demostraram que esse polimorfismo está relacionado ao risco de asma em indivíduos com o genótipo CC e sugere que ambos os polimorfismos, C-509T e T869C, estão associados com a susceptibilidade à asma. Por outro lado outros estudos sugerem a ausência de associação entre esses dois polimorfismos e o risco de asma (Buckova, 2001; Heinzmann, 2005).

Com relação à freqüência dos polimorfismos e a população estudada; Suthanthiran et al. (2000) relataram que o alelo C do polimorfismo T869C era significantemente mais comum em Americanos Africanos do que em indivíduos brancos. A freqüência do alelo C na população chinesa de Hong Kong era alta, similar à da população Japonesa e de Taiwan (Chow et al.; 2004). A freqüência do alelo T e genótipo TT do polimorfismo C-509T na população branca e Indiana era baixa (Pulleyn et al.; 2001; Nagpal et al.; 2005). Já na população chinesa de Hong Kong era alta, similar à freqüência relatada na população Japonesa e de Taiwan (Chow et al.; 2004). No Brasil não há estudos desses polimorfismos relacionados com a asma.

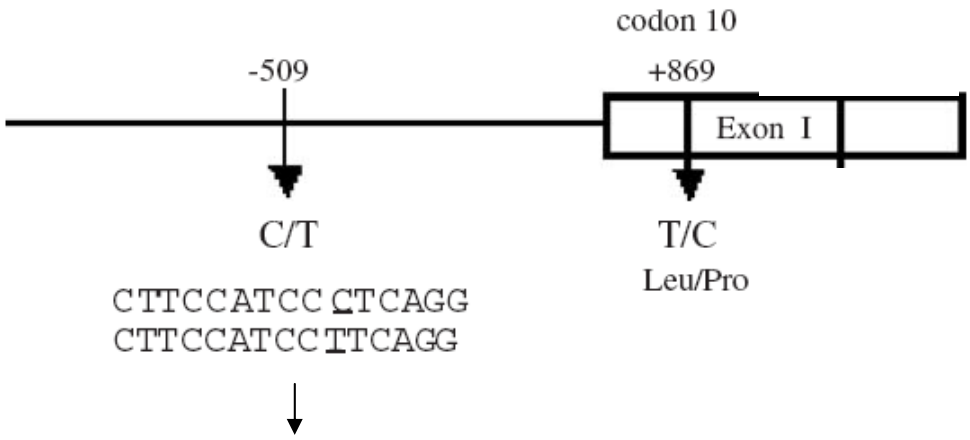

Fig 2- Representação da localização dos polimorfismos no gene *TGF-β1* (C-509T, T869C) (Ogawa et al.; 2006).

1.4- CD14

O CD14 é uma glicoproteína de 55 kDa, é um receptor multifuncional de componentes da parede celular de bactérias como os lipopolissacarídeos (LPS) ou endotoxinas inaladas. O LPS é o principal componente das endotoxinas e é formado por um fosfoglicolipídeo, o lipídeo A, que é covalentemente ligado a um heteropolissacarídeo hidrofílico. O Lipídeo A se conecta à cadeia de polissacarídeos e é responsável pela toxidade do LPS (Rietschel et al.; 1994). O CD14 apresenta duas formas de proteínas: a (mCD14) que é expressa primeiramente na superfície de monócitos, macrófagos, células dendríticas e neutrófilos e a forma solúvel de CD14 (sCD14), que é encontrada no soro (Ulevitch e Tobias, 1995).

Baseado em estudos epidemiológicos, a exposição precoce a bactérias parece proteger crianças do desenvolvimento de atopia ao longo da vida (Von Mutius et al.; 2000). Portanto genes envolvidos na defesa de bactérias hospedeiras são interessantes candidatos para o estudo da genética da atopia (Sengler et al.; 2003). É sugerido que o gene CD14 exerça função na polarização da resposta imune em células T helper do tipo I (TH1), que regula a resposta de células T helper do tipo 2 (TH2) e a produção de IgE em resposta à alergia. Na inflamação há a diferenciação de TH1 e/ou supressão de TH2. A ligação de CD14 à LPS está associada com uma forte resposta de IL-12, e este é considerado um sinal obrigatório para a maturação de células T em TH1. As respostas de IgE são reguladas por sinais de inibição de células TH1 e por sinais estimulantes de células TH2 (Romagnani, 1992). È proposto que expressões alteradas de CD14 possam alterar o balanço de células TH1-TH2, influenciando a resposta à IgE e a inflamação por doenças alérgicas como a asma (Kedda et al.; 2005).

É sugerido que os asmáticos sejam mais sensíveis aos efeitos de LPS do que os não asmáticos (Peden et al.; 1999) e tem sido demonstrado que indivíduos com asma alérgica têm expressão aumentada de CD14 depois da inalação por LPS (Alexis et al.; 2001).

1.4.1- Polimorfismo C-159T do gene *CD14*

No cromossomo 5q estão localizados vários genes candidatos à atopia (IL4, IL5, IL13), dentre eles o *CD14*, que está localizado na região q23-3.

O gene *CD14,* que consiste de 3.900 bp organizados em 2 éxons, codifica uma proteína de 375 aminoácidos (Ferrero e Goyert, 1988).

Baldini et al. (1999) identificaram um polimorfismo, C-159T, na região promotora do gene *CD14*, na posição -159 do início do sítio de transcrição do gene, resultando na troca de bases C-T (também conhecida como -260C/T relativa ao início da tradução do gene).

Variações genéticas no gene *CD14* poderiam influenciar sua expressão e, portanto exercer uma função importante na regulação da resposta imune à IgE. O polimorfismo C-159T tem sido associado com níveis elevados de CD14 solúvel, e à diminuição de IgE em crianças (Baldini et al., 1999). Esses resultados são consistentes com a relação de que a imunidade inata interfere, na expressão aumentada de CD14 no soro, nas células ou em ambos, aumentando a geração de células T para a proteção contra o desenvolvimento de alergias (Vercelli, 2003).

Vários estudos demonstraram uma função protetora do -159T. Por exemplo, em um estudo realizado em adultos holandeses homozigotos para o alelo C, encontrou-se aumento de IgE e maiores sintomas alérgicos (Koppelman et al.; 2001). Crianças chinesas atópicas homozigotas para o alelo C apresentavam um aumento de IgE, comparadas com as CT e TT (Leung et al.; 2003). O alelo T não foi associado com asma em crianças brancas do sudoeste da Alemanha (Heinzmann et al.; 2003) ou com dermatite atópica, rinite alérgica, níveis de IgE, na população alemã (Sengler et al.; 2003). Há estudos contrários à associação entre -159T e a proteção de alergia. Um estudo demonstrou que o alelo -159T está associado ao aumento de IgE e asma atópica em uma população Indiana (Sharma et al.; 2004)). Em outro estudo o alelo T era mais comum entre pacientes americanos com asma não atópica do que entre controles, particularmente entre indivíduos brancos (Woo et al.; 2003). No Brasil não há estudos desse polimorfismo com asma.

Segundo Leynarte et al. (2006) em indivíduos que estavam expostos ao ambiente de fazendas, em contato direto com a criação de animais, e tinham o genótipo *CD14*-159TT, a prevalência de atopia era bem menor do que naqueles que não têm contato com a vida rural. Como esses indivíduos têm uma maior quantidade de CD14 solúvel, e são mais sensíveis às endotoxinas, esses resultados são consistentes com a hipótese de que o efeito de proteção a essa exposição, pode ser explicado pelas endotoxinas que estimulam a maturação da resposta imune de Th1 cedo na vida, resultando no desenvolvimento de tolerância imune a potenciais alérgenos. De acordo com Vercelli (2003), a hipótese da mudança de endotoxinas sugere que as exposições a certas concentrações de antígenos podem resultar em repostas opostas, dependendo do contexto do meio ambiente. De acordo com essa hipótese o polimorfismo C-159T pode ter efeitos diferentes na resposta da citocina Th em relação aos níveis intermediários de exposição. Eder et al. (2005) mostrou recentemente que homozigotos para o alelo T (C-159T) do gene *CD14* quando eram expostos a níveis baixos de endotoxinas, eram menos prováveis a terem asma ou níveis altos de IgE. Entretanto quando homozigotos para o alelo T viviam em ambientes com altas concentrações de endotoxinas, eles tinham uma probabilidade maior de terem asma ou níveis altos de IgE. Entretanto uma explicação clara para o mecanismo molecular envolvido não é disponível.

1.5- IL-4 e IL-4Ra

A interleucina 4 é uma citocina pleiotrópica, que exerce função crucial em doenças ligadas à atopia, com aumento de IgE (Fig 3) . Sendo produzida por células T ativadas, e por basófilos e mastócitos, é responsável pela produção de anticorpos IgE por linfócitos B e pela maturação de linfócitos T em células T helper 2, que produzem IL-4 e medeiam doenças alérgicas (Postma et al.; 1995). A IL-4 controla a mudança de classes de imunoglobulinas, determinando que células B humanas mudem a expressão de IgM para IgE (Gauchat et al.; 1990). Portanto IL-4 parece ser um participante direto na geração de níveis altos de IgE observados em indivíduos atópicos (Noguchi et al.; 1998). A IL-4 tem uma variedade de outros efeitos: em tecidos hematopoiéticos, aumenta a expressão de moléculas do MHC da classe II em células B (Noelle et al.; 1984), aumenta a expressão de

CD23 (Defrance et al.; 1987), regula a expressão do receptor de IL-4 (Ohara e Paul, 1988), e com a associação de lipopolissacarídeos, permite que células B expressem Thy1 (Snaper et al.; 1988). Essa citocina também tem uma importante função na adesão do tecido e inflamação e ela atua com o TNF para induzir a expressão de moléculas de adesão das células vasculares (VCAM-1) em células endoteliais vasculares (Thornhill et al.; 1991), e isso desregula a expressão das selectinas. Essa mudança no balanço de expressão das moléculas de adesão por IL-4, favorece o recrutamento de células T e eosinófilos, preferencialmente em relação aos granulócitos, dentro do sítio de inflamação (Bennett et al.; 1997).

Os efeitos biológicos proeminentes da IL-4 na asma são exercidos através de sua ligação aos seus receptores (IL-4R) expressos na superfície de várias células. O receptor de IL-4 é um heterodímero constituído por 2 subunidades: a cadeia alfa do receptor IL-4 (IL-4Ra) que se liga à IL-4, a qual tem 140 kDa e é compartilhada com IL-13. A IL-4 e IL-13 exercem atividades biológicas similares, incluindo a mudança de isotipo para a síntese de IgE. Ambas interleucinas ligam-se aos seus respectivos receptores de superfície, compartilhando a cadeia alfa do receptor IL-4, IL4-Ra (Morton, 1992; Ober et al.; 1998) e uma segunda cadeia que é a γc compartilhada em comum com os receptores para IL-2, IL-7, IL-9, IL-15 ou o IL-13Ra e modifica as sinalizações da cadeia alfa. (De Vríes et al.; 1998; Nelms et al.; 1999).

O receptor de IL4 está presente em fibroblastos, hepatócitos, tecidos hematopoiéticos, endoteliais, epiteliais, musculares e cerebrais. São geralmente expressados em 100 a 5000 sítios por células (Ohara e Paul; 1987), mantendo ampla a escala de ação dessa citocina. È um componente essencial para a indução do fenótipo de TH2 e produção de IgE. Em camundongos nocauteados para o gene IL-4 e para o gene que codifica o seu ligante (IL-4R), não ocorre indução específica de IgE e nem uma hiper-responsividade brônquica, características da asma, demonstrando papel relevante da via IL-4/IL-4R no aparecimento destes sintomas (Brussele et al.; 1995).

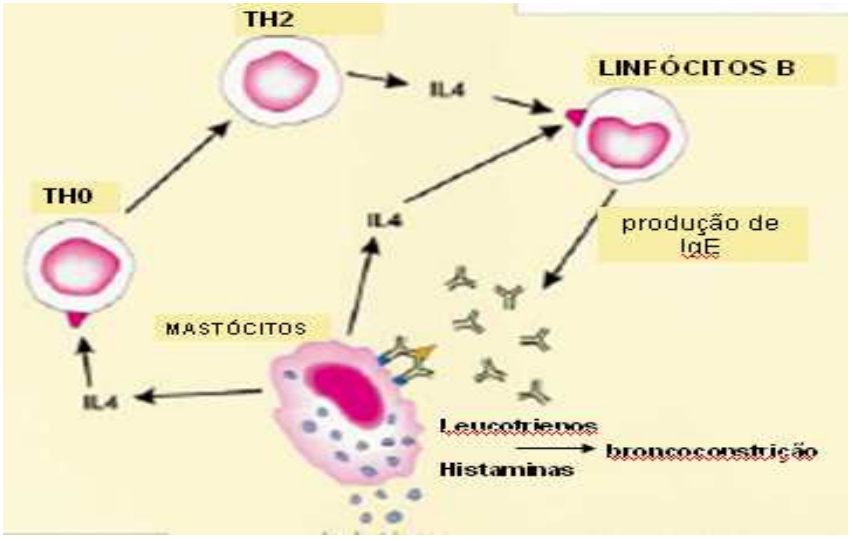

Fig 3- Relação da IL4 na patogenia da asma (Sandford et al.; 1996).

1.5.1- Polimorfismos C-590T do gene da *IL-4* e Ile50val do gene *IL-4Ra*

O gene que codifica IL-4 está localizado no cromossomo 5q na região (q31-33), tem 4 éxons e aproximadamente 10 kb de tamanho (Arai et al.; 1989). Essa região tem sido associada com asma e atopia em vários estudos (Holloway et al.; 1999).

Rosenwasser et al. (1995) relataram um polimorfismo na região promotora do gene, com a mudança de base de C para T, na posição -590 do gene da *IL-4* (C-590T). Esse polimorfismo parece ser funcional, com a atividade transcricional aumentada atribuída ao alelo variante. Estudos desse polimorfismo têm sido associados à asma e atopia (Zhu et al.; 2000; Beghe et al.; 2003), entretanto alguns estudos são controversos a essa associação (Walley e Cookson, 1996). Noguchi et al. (1998) demonstraram que esse polimorfismo pode estar associado com o desenvolvimento de asma em crianças Japonesas, mas não através dos níveis séricos de IgE.

O gene que codifica a cadeia IL-4Rα (IL4RA), está localizado no cromossomo 16 (p12.1-p11.2), contém 12 éxons e foi relacionado com atopia em diferentes populações (Deichmann et al.; 1998; Ober et al.; 2000). O *IL4-Ra* exerce uma função importante na produção e regulação da IgE e é um gene candidato à asma e alergia (Lee et al.; 2004).

Gallizi et al. (1990) relataram uma variante de *IL4-Ra* que consiste na troca de adenina por guanina (A-G), resultando na substituição de isoleucina por valina na posição 50 e tem sido associada com asma e atopia. Entretanto, alguns relatos são controversos (Liu et al.; 2003; Migliaccio et al.; 2003). Mitsuyasu et al. (1998) demostraram que a variante Ile50 aumentou STAT6 (sinal transdutor e ativador da transcrição 6), 1.8 vezes mais quando comparada com a variante Val50 em células humanas e de camundongos. Esses dados sugerem que a variante Ile50 regula a resposta do receptor para IL4, resultando no aumento da ativação de STAT6, aumentando a proliferação de células e a produção de IgE. Caggana et al. (1999) estudando a freqüência desse polimorfismo na população de Nova York verificou que a variante Ile50 era mais prevalente na população branca (87%). No Brasil não há estudos desses polimorfismos dos genes IL-4 e IL-4Ra com a asma.

1.6- ADAM33

Van Eerdewegh et al. (2002) identificaram recentemente um novo gene associado à asma, o ADAM33 (desintegrina e metaloprotease 33), localizado no cromossomo 20 (p13), sendo expresso por fibroblastos pulmonares e células do músculo liso bronquiais. Devido a sua estrutura e ao perfil de expressão celular, foi sugerido que o ADAM33 está associado com o remodelamento das vias aéreas em pacientes com asma.

Polimorfismos no gene *ADAM33* podem acelerar a proliferação de células do músculo liso e fibroblastos, induzindo a hiper-responsividade brônquica e fibrose subepitelial.

O gene *ADAM33* é altamente polimórfico e possui aproximadamente 100 SNPs, contendo 22 éxons que codificam uma molécula de 812 aminoácidos com 7 domínios, o prodomíneo, o catalítico, a desintegrina, o domínio rico em cisteína, o fator de crescimento epidermal, o de transmembrana, e o citoplasmático; tendo funções de ativação, proteólise, adesão, fusão e sinalização intracelular (Fig 4 a e b) (Holgate et al.; 2005). A proteína ADAM33 pertence a uma família de 40 proteínas ADAMs; sendo uma metaloprotease, o domínio catalítico tem uma ligação com zinco. O RNA m é preferencialmente expresso em músculo liso, fibroblastos e miofibroblastos, mas não no epitélio bronquial ou em células imunes ou inflamatórias (Van Eerdewegh et al.; 2002; Howard et al.; 2003). O domínio

catalítico de ADAM33 tem sido recentemente cristalizado e a estrutura tridimensional determinada usando um inibidor MMP, não específico para auxiliar na geração de cristal (Fig 5). O sítio catalítico compartilha características típicas de outras MMPs com a ligação de zinco, mas difere na estrutura de entrada do sítio ativo, sugerindo grande discriminação na especificidade dos substratos (Orth et al.; 2004). A análise de ADAM33 em fibroblastos das vias aéreas tem identificado ao menos 6 variantes alternativas de "splicing" (Fig 6), nenhuma contendo o domínio catalítico (Holgate et al.; 2005). Esse domínio está presente em menos de 2% dos transcritos. A análise das variantes de ADAM33 por "splicing", em biópsias dos brônquios de indivíduos normais e asmáticos tem mostrado que moléculas completas contendo o domínio catalítico são a minoria, com a presença de variantes alternativas dominando, e não é clara em biópsias a expressão de cada variante (Holgate et al.; 2006).

1.6.1- Associações de ADAM33 com Asma

É reconhecido que em pacientes com asma persistente crônica, a função pulmonar declina mais rapidamente no tempo excedente, quando comparada com indivíduos normais (Dijkstra et al.; 2006). Jongepier et al. (2004) investigaram fatores genéticos e ambientais, que possam ter contribuído para esse declíneo acelerado em 200 pacientes com asma crônica estudados anualmente por 25 anos. Eles mostraram que a variante do polimorfismo do alelo S_2 era significantemente associado com o declíneo em excesso de VEF1 e concluíram que esta variante de *ADAM33*, não era somente importante no desenvolvimento da asma, mas também na progressão da doença, possibilidade relacionada ao aumento do remodelamento das vias aéreas. Van Diemen et al. (2005) investigaram 8 SNPs de *ADAM33* em 1390 sujeitos da população geral, que tiveram a função pulmonar medida durante 25 anos. Os indivíduos homozigotos para a variante S_2 e Q_1 e homozigotos para S_1, tinham um acelerado declíneo em VEF1. Análises adicionais demonstraram uma prevalência elevada dos SNPs F+1, S_1, S_2, e T_2 em sujeitos com DPOC. Com base nesses relatos, as variações genéticas de *ADAM33*, além da asma podem influenciar a razão do declíneo da função pulmonar na população geral e mais especificamente na DPOC (Holgate et al.; 2006).

Estudos de associação entre SNPs de ADAM33 e asma tem sido realizados em diversas populações: americanos africanos, hispânicos, americanos caucasóides, holandeses (Howard et al.; 2003), alemães (Werner et al.; 2004) e koreanos (Lee et al.; 2004). Entretanto, em um estudo realizado por Lind et al. (2003) não foi encontrada essa associação com a asma na população americana de Porto Rico e mexicana. Recentemente um estudo amplo de meta-análise envolvendo estudos publicados com resultados positivos e negativos tem confirmado a associação positiva entre SNPs de *ADAM33* com asma (Blakey et al.; 2005). No Brasil, não há estudos de polimorfismos de ADAM33 e asma.

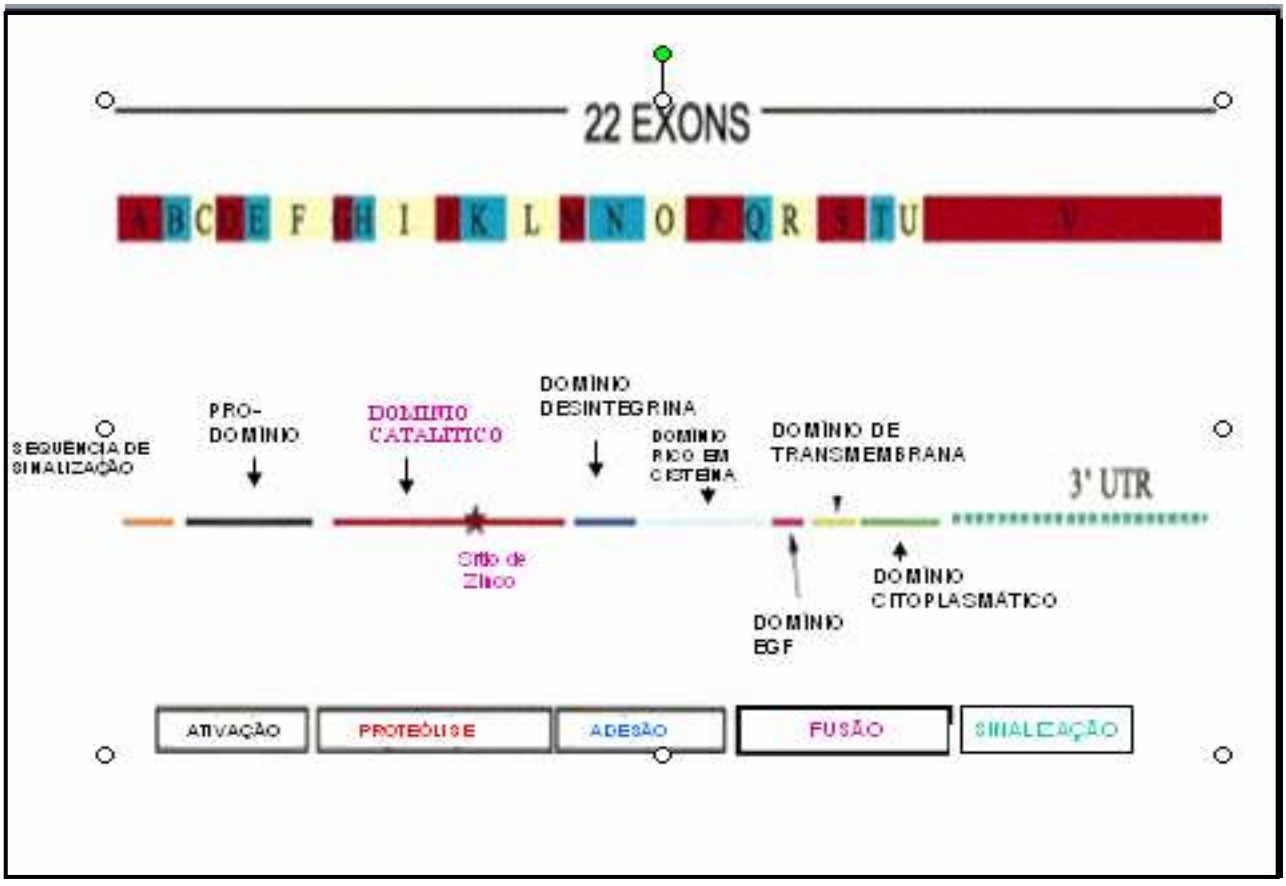

Fig 4a- Estrutura dos domínios de ADAM33 em relação a suas funções. Cada éxon do gene representado por letras de A até V (Van Eerdewegh et al.; 2002).

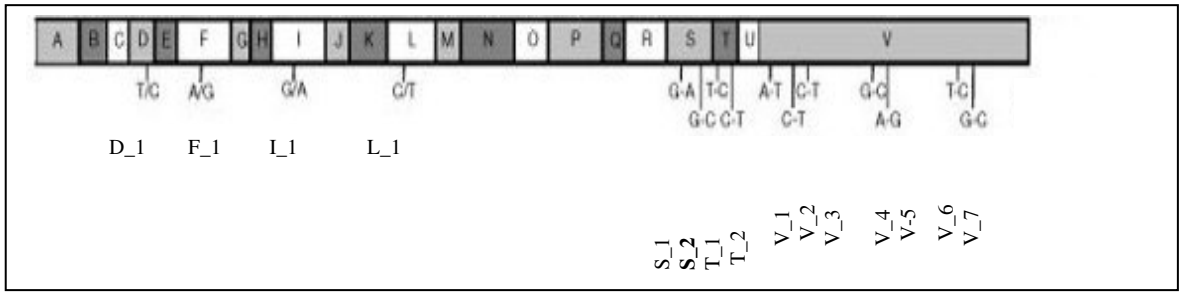

Fig 4b- Localização de SNPs no gene *ADAM33* (Van Eerdewegh et al.; 2002).

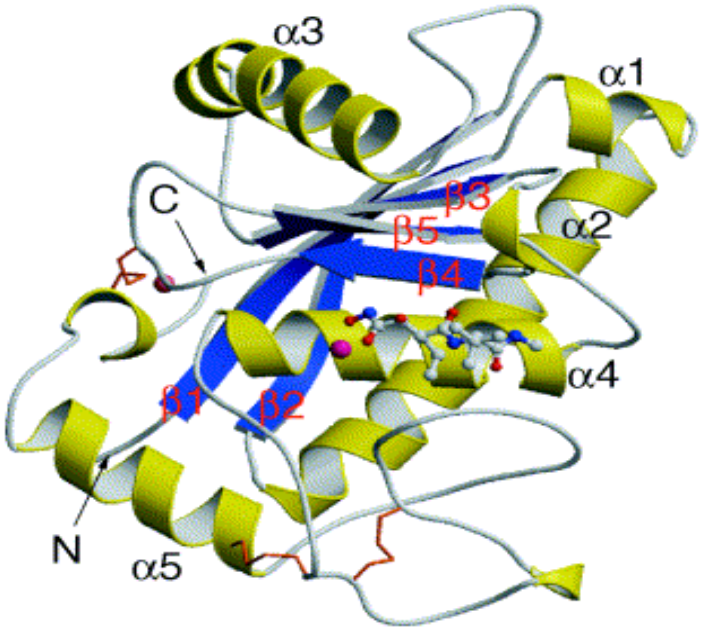

Fig 5- Representação da estrutura tridimensional da proteína ADAM33 (Orth et al.; 2004).

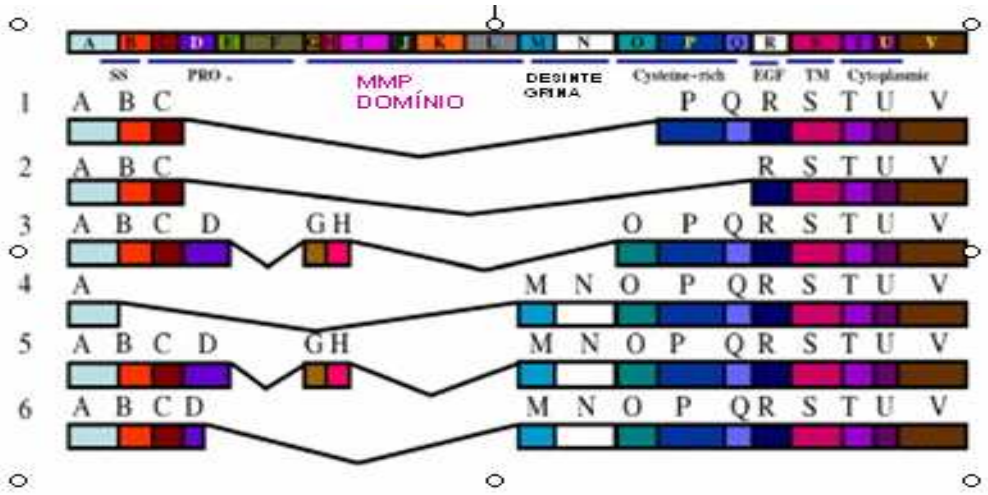

Fig 6- Representação das variantes presentes no gene ADAM33 em splicing alternativos em fibroblastos (Powell et al.; 2004).

2 - OBJETIVOS

Verificar em uma amostra de pacientes com asma leve, moderada e grave, uma possível associação da prevalência dos polimorfismos: T869C e C-509T no gene *TGF*-β1; C-159T no gene *CD14*; C-590T no gene *IL-4*; Ile50Val no gene *IL-4Ra* e S_2 no gene *ADAM33* com a gravidade da asma.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Material

Foram analisados 88 escolares e adolescentes, de 7 a 18 anos de idade (média = 10,3 anos, desvio-padrão = 2,79 anos), pacientes do Ambulatório de Imunologia, Alergia e Pneumologia do Departamento de Pediatria da FCM-UNICAMP, bem como um grupo de 202 controles (média = 34 anos, desvio-padrão = 11,3 anos), doadores de sangue da UNICAMP, constituído por população saudável triada por ficha padrão.

Foram excluídos do estudo pacientes asmáticos portadores de Fibrose Cística (Mucoviscidose), pacientes portadores de doenças crônicas conhecidas (Diabetes, Febre Reumática, Tuberculose, AIDS e neoplasias) e recusa em participar da pesquisa.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa - Unicamp (Anexo1). Os pacientes só foram incluídos no estudo após ciência e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelo responsável legal da criança ou adolescente (Anexo 2).

3.2- Métodos

3.2.1- Avaliação clínica da asma atópica (AA):

Foram utilizados os seguintes critérios para asma:

1) Episódios de obstrução das vias aéreas associadas à sibilância redicivante;

2) Evidência espirométrica de resposta ao uso de medicamentos beta agonistas;

3) Testes cutâneos de hipersensibilidade imediata para antígenos;

4) Aumento dos níveis séricos de IgE.

Os conceitos de asma atópica leve, moderada e grave foram descritos anteriomente. O conceito de gravidade obedeceram aos critérios da "American Thoracic Society" e "Global Iniciative for Asthma". Todos os pacientes foram consultados e são acompanhados, periodicamente, pelo Dr. José Dirceu Ribeiro.

Todos os pacientes foram submetidos aos seguintes procedimentos:

3.2.2- Extração de DNA de leucócitos

O DNA foi extraído de células de sangue periférico, segundo o método clássico com fenol/clorofórmio (Sambrook et al; 1989) com algumas modificações.

Foram coletados 10 a 20 ml de sangue total em tubo estéril do tipo "vacutainer" contendo EDTA 10% como anticoagulante. O sangue foi centrifugado a 2000 rpm por 10 min, desprezando-se o plasma. Transferiu-se 5 ml da papa de hemácias para um tubo de centrífuga (Falcon) e adicionou-se 5 ml do tampão TKMI (10 mM Tris HCL pH 7.6; 10mM Kcl; 10 mM $MgCl_2$; 0,2 M EDTA) e 125 ul de Triton 100X (Nonidet P40) para lisar as hemácias. Misturou-se várias vezes por inversão. Centrifugou-se a 2.200 rpm por 10 min a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e, em seguida, lavou-se o creme leucocitário em 5 ml de TKM1e centrifugou-se a 2200 rpm por 10 min. O sobrenadante foi descartado e os leucócitos foram ressuspensos em 800ul de tampão TKM2 (10 mM Tris Hcl PH 7.6; 10 mM Kcl; 10 mM $MgCl_2$ e 0.4 M de NaCl) e adicionou-se 50 ul de SDS 10%, seguido por incubação $55^{\underline{0}}$C por 15 min. Após essa etapa, adicionou-se 300ul de NaCl 5M, misturando-se bem para promover um aumento na molaridade que irá desnaturar as pontes e precipitar as proteínas. Em seguida, a amostra total foi dividida para cerca de 5 tubos de microcentrífuga (eppendorf) e, a cada um, foi adicionado: 250ul da mistura de clorofórmio e álcool isoamílico, como também 250 ul de fenol (1 amostra: 1 clorofórmio + álcool isoamílico e fenol). As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 12.000 rpm por 5 min em microcentrífuga. O sobrenadante que contém o DNA foi transferido para outro *eppendorf* e adicionou-se à solução de clorofórmio + álcool isoamílico 1X o volume da amostra. Novamente as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 12.000 rpm por 5 min e o sobrenadante foi transferido para outro eppendorf, adicionou-se em seguida 2X o volume da amostra de etanol 100 % gelado e acetato de sódio 3 M (10% do volume total). As amostras foram mantidas no "*freezer"* a $-20^{\underline{0}}$ C por 30 min ou *"overnight"* para precipitar o DNA. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 12.000 rpm por 5 min, desprezou-se o sobrenadante e adicionou-se ao DNA 1 ml de etanol 70 % gelado. Após centrifugação a 12.000 rpm por

5 min, o sobrenadante foi descartado e o DNA foi ressuspenso em 200ul de água e incubado a 37^{0} C "*overnight*" para que o DNA entre em solução.

Após a extração de DNA foram analisados os polimorfismos descritos a seguir:

3.2.3- TGF – β1

T869C

Após a extração de DNA, identificamos o polimorfismo no gene *TGF- β1* no códon 10 na posição + 869, através da técnica de ARMS (Sistema de amplificação de mutação refratária). Mutações conhecidas podem ser identificadas pelo desenho de três primers, um específico para o alelo mutante, o outro específico para o alelo selvagem e o terceiro é específico da região flanqueadora (conservada) do éxon e que será o primer que vai encaminhar a amplificação da fita no sentido direto. O desenho é realizado de maneira que o primer específico para o alelo mutante termina com a base mutada na extremidade 3' e o primer específico para o alelo selvagem termina com a base normal em sua extremidade 3´, funcionando como uma sonda alelo específica.

Os primers utilizados na reação segundo Perrey et al. (1999) foram:

TGF – β1 **Códon 10**

Primer Geral (sense): 5´- tccgtgggatactgagacac- 3´

Primer C (antisense): 5´- gcagcggtagcagcagcg- 3´

Primer T (antisense): 5´- agcagcggtagcagcagca- 3´

(Produto do PCR = 241bp)

Primer 1 (controle interno): 5´- gccttcccaaccattccctta- 3´

Primer 2 (controle interno) : 5´- tcacggatttctgttgtgtttc - 3´

(Produto do PCR = 429bp)

Os primers controle amplificam o gene do hormônio de crescimento.

O DNA foi amplificado em um volume final de 50 µl de reação. A concentração final dos reagentes foi: 30 pmol de cada primer (primer geral, um dos dois primers específicos, primers de controle interno) 200 uM de cada nucleotídeo (dATP, dCTP, dTTP e dGTP),; 1U Taq DNA polimerase; tampão da enzima (50 mM Tris-HCl pH 8,3; 1,5 mM Kcl e 1,5 mM MgCl) e 1 ug de DNA genômico.

O programa do termociclador de PCR consistiu numa desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida pelos seguintes passos:

1- 95°C 1 min

2- 63°C 1 min ⇒ aleloT

3- 72°C 2 min

4- 35 X passos 1 2 e 3

5- 72°C 1 min

Onde para o alelo C, a temperatura utilizada para o pareamento dos primers foi de 61°C.

O produto amplificado foi analisado em gel de agarose a 1.5% (Fig 7).

Análise de T869C (TGF-β1)

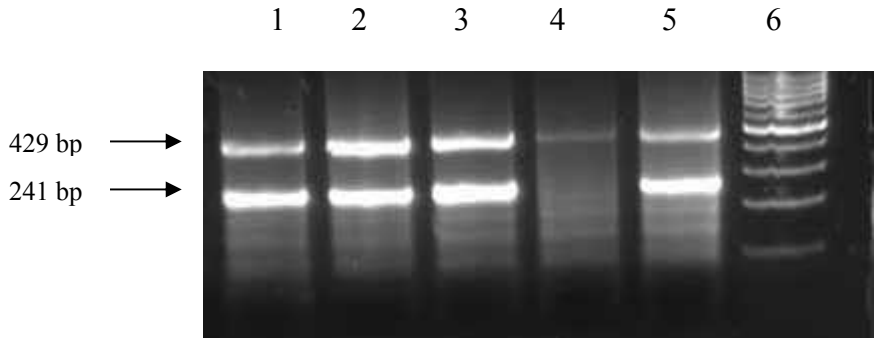

Figura 7- Análise do polimorfismo T869C

Colunas 1 e 2 análise do alelo C , 3, 4 e 5 análise do alelo T

Colunas 1, 3 – é o mesmo indivíduo e apresenta o genótipo CT

Colunas 2, 4 – é o mesmo indivíduo e apresenta o genótipo CC

Coluna 6 – ladder de 100 bp

C-509T

A análise desse polimorfismo foi realizada pelo método de PCR + digestão enzimática (Silverman et al.; 2004). Um fragmento de 406 bp foi produzido por 35 ciclos de PCR, com os seguintes primers:

5'-CCGCTTCTGTCCTTTCTAGG- 3' sense

5'-AAAGCGGGTGATCCAGATG- 3' antisense

Os componentes da reação de amplificação foram 30 pmol de cada primer, 200 uM de cada nucleotídeo (dATP, dCTP, dTTP e dGTP), 1U Taq DNA polimerase; tampão da enzima (50 mM Tris-HCl pH 8,3; 1,5 mM Kcl e 1,5 mM MgCl) e 1 ug de DNA genômico. Após a PCR, 15ul do produto amplificado foi digerido com a enzima *Eco* 81I (*Sau*I) a 37 ^{0}C por três horas. Após a digestão, a amostra foi submetida a eletroforese em gel de acrilamida a 12% e corada com brometo de etídeo para a visualização das bandas. Indivíduos com o genótipo CC produzem fragmentos de 223bp, 183bp. Os homozigotos TT produzem fragmentos de 406 bp e os heterozigotos CT produzem os três fragmentos (Fig 8).

O programa do termociclador de PCR consistiu numa desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida pelos seguintes passos:

1- 95°C 1 min

2- 55°C 1 min

3- 72°C 2 min

4- 35 X passos 1 2 e 3

5- 72°C 1 min

Análise de C509T (TGF-β1)

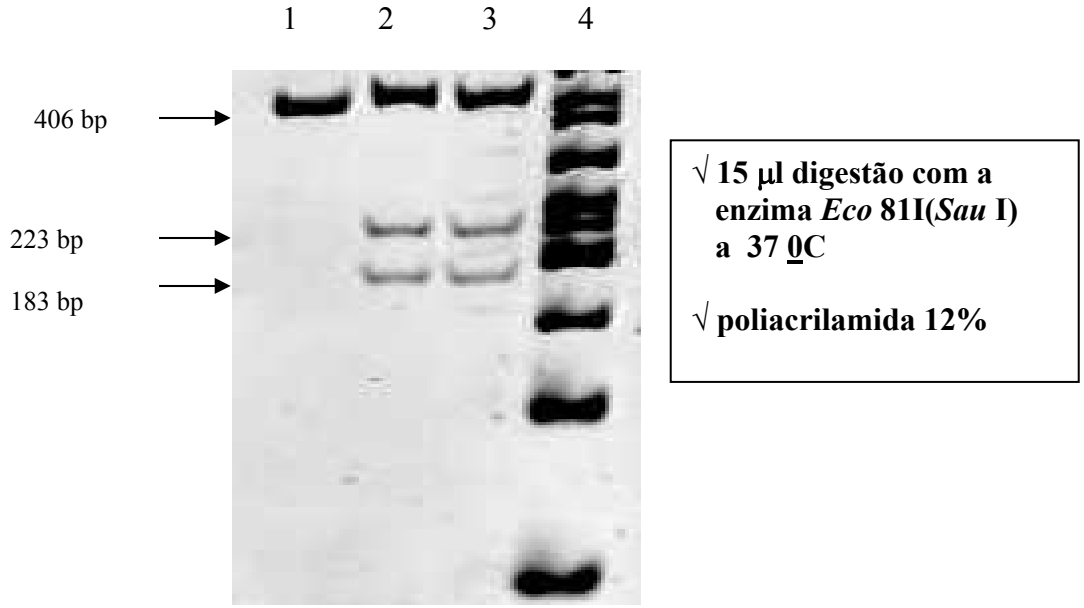

Figura 8- Análise do polimorfismo C509T

Coluna 1- indivíduo com genótipo TT

Colunas 2,3- indivíduos com o genótipo CT

Coluna 4- ladder de 50 bp

3.2.4- CD14

C-159T

Após a extração de DNA, a genotipagem desse polimorfismo foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Kedda et al. (2005). A reação em cadeia da polimerase foi realizada utilizando-se 200 μM dNTP, 2 mM MgCl2, tampão de PCR 1X, 1U de Taq DNA polimerase, 20 pmol do primer sense 5´- GCCTCTGACAGTTTATGTAATC-3´ e do primer antisense 5´- GTGCCAACAGATGAGGTTCAC -3´.

Após a PCR, usamos uma enzima de restrição para digerir o fragmento amplificado com a enzima *AvaII* que reconhece a seqüência GGTCC, presente somente nos fragmentos amplificados contendo o alelo T. O produto foi analisado em gel de agarose a 1,5%. O produto não digerido apresentou um fragmento de 497bp (alelo C). E os produtos digeridos (alelo T) apresentaram fragmentos de 144 e 353bp (Fig 9).

O programa do termociclador de PCR consistiu numa desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida pelos seguintes passos:

1- 95°C 1 min

2- 58°C 1 min

3- 72°C 2 min

4- 35 X passos 1 2 e 3

5- 72°C 1 min

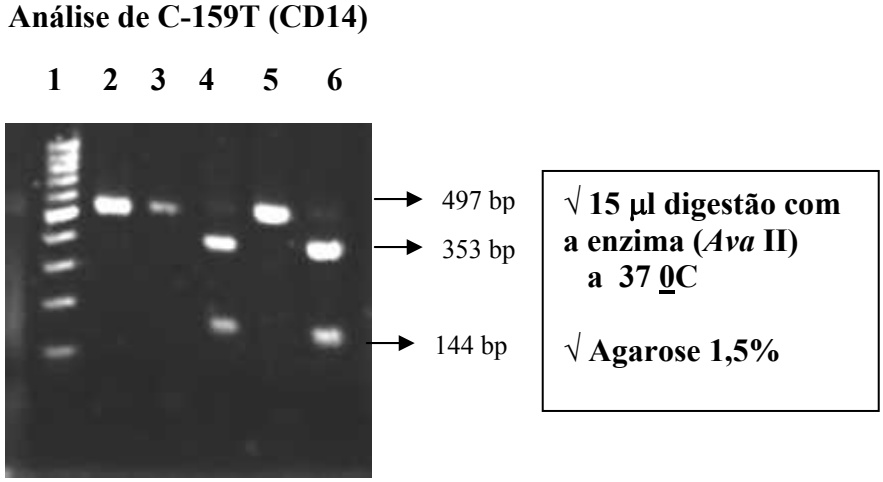

Figura 9- Análise do polimorfismo C-159T

Coluna 1- ladder de 100bp

Coluna 2- controle não digerido (PCR)

Colunas 3, 5- indivíduos com o genótipo CC

Colunas 4, 6- indivíduos com o genótipo TT

3.2.5- IL-4

C-590T

A análise desse polimorfismo foi realizada por PCR + digestão enzimática (Hoebee et al.; 2003). Os componentes da reação de amplificação foram 30 pmol de cada primer, 200 uM de cada nucleotídeo (dATP, dCTP, dTTP e dGTP), 1U Taq DNA polimerase; tampão da enzima (50 mM Tris-HCl pH 8,3; 1,5 mM Kcl e 1,5 mM MgCl) e 1 ug de DNA genômico.

Os primers utilizados foram:

5'-TAAACTTGGGAGAACATGGT- 3'

5'- TGGGGAAAGATAGAGTAATA - 3'

Após a PCR de 195 bp, foi realizada a digestão enzimática com 15 ul da PCR, utilizando-se a enzima *Ava*II, que digeriu o alelo -590C em fragmentos de 177 e 19 bp. O produto da digestão foi testado em gel de poliacrilamida a 7% (Fig 10).

O programa do termociclador de PCR consistiu numa desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida pelos seguintes passos:

1- 95°C 1 min

2- 51°C 1 min

3- 72°C 2 min

4- 35 X passos 1 2 e 3

5- 72°C 1 min

Análise de C-590T (IL4)

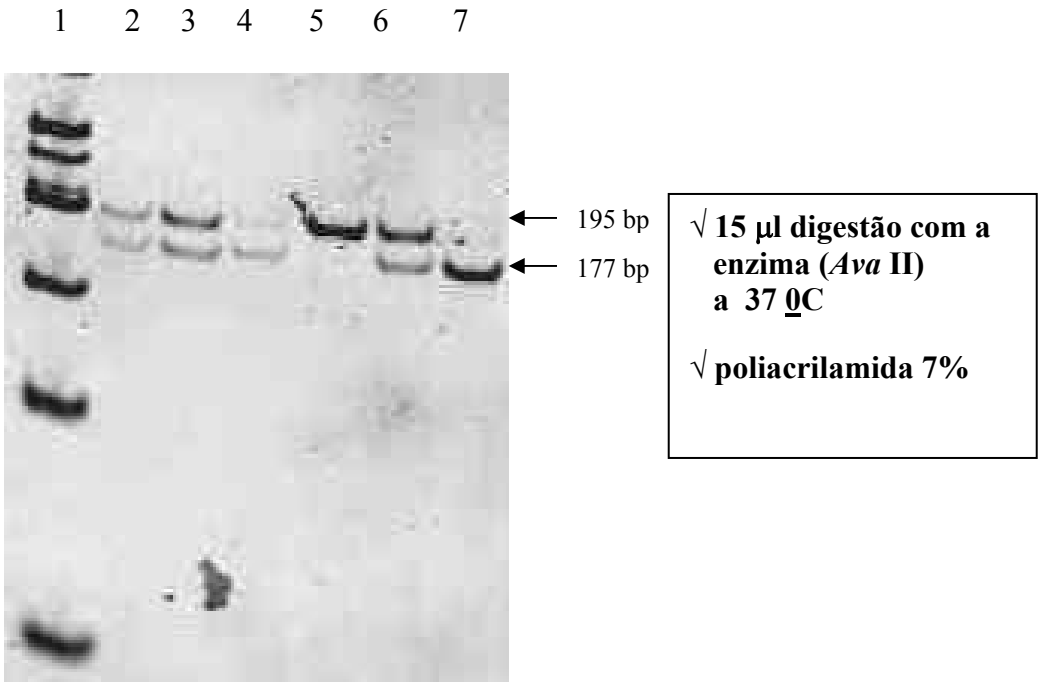

Figura 10- Análise do polimorfismo C-590T

Coluna 1 - ladder de 50 bp

Coluna 2, 3, 4, 6- indivíduo com o genótipo CT

Coluna 5- indivíduo que apresenta o genótipo TT

Coluna 7- indivíduo que apresenta o genótipo CC

3.2.6- IL-4Ra

Ile50Val

Para esse polimorfismo (A-G) foi utilizada a mesma reação de PCR do polimorfismo C-590T, alterando-se somente a temperatura de pareamento dos primers para 62^0C. Os primers utilizados foram:

5'- GGCAGGTGTGAGGAGCATCC- 3'

5'- GCCTCCGTTGTTCTCAGGTA - 3'

Após a PCR de 273 bp foi realizada a digestão enzimática com 15 ul da amostra, utilizando-se a enzima *Rsa*I, que digeriu o alelo 50Val em fragmentos de 254 e 19 bp. O produto da digestão foi testado em gel de poliacrilamida a 7% (Fig 11).

Análise de ILe50Val (IL-4Ra)

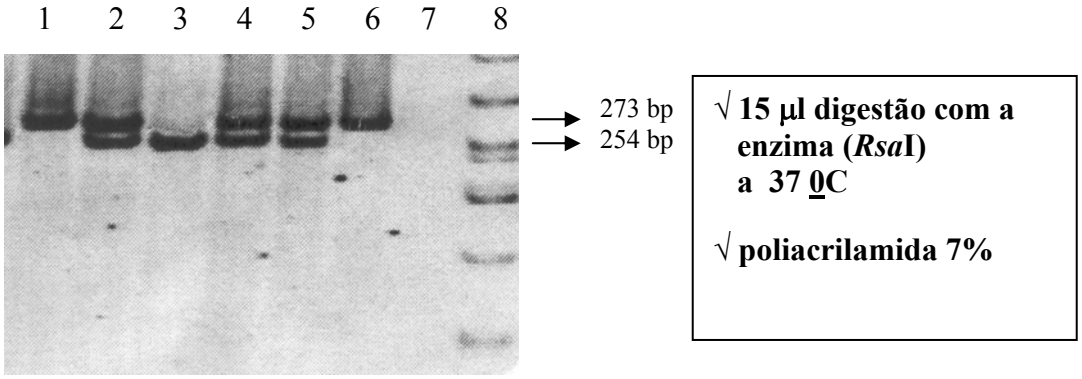

Figura 11- Análise do polimorfismo ILe50Val

Coluna 1- Controle não digerido

Coluna 2, 4, 5- indivíduo com o genótipo Ile/Val

Coluna 3- indivíduo que apresenta o genótipo Val/Val

Coluna 6- indivíduo que apresenta o genótipo Ile/Ile

Coluna 8 - ladder de 50 bp

3.2.7- ADAM33

S_2

A identificação desse polimorfismo foi realizada por PCR+ digestão enzimática. Os componentes da reação de amplificação foram 30 pmol de cada primer, 200 uM de cada nucleotídeo (dATP, dCTP, dTTP e dGTP), 1U Taq DNA polimerase; tampão da enzima (50 mM Tris-HCl pH 8,3; 1,5 mM Kcl e 1,5 mM MgCl) e 1 ug de DNA genômico.

Os primers utilizados segundo, Diemen et al. (2005) foram:

5'- CGCAGACCATGACACCTTCCT - 3'

5'-GCACGCAGGGTCCCTTCT - 3'

Após a PCR com a formação de fragmentos de 148 bp foi realizada a digestão enzimática utilizando-se15 ul da amostra e a enzima *Hinp* I, que reconhece o alelo C e digere os fragmentos em 63 e 85 bp. O produto da digestão foi testado em gel de acrilamida a 12% (Fig 12).

O programa do termociclador de PCR consistiu numa desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida pelos seguintes passos:

1- 95°C 1 min

2- 58°C 1 min

3- 72°C 2 min

4- 35 X passos 1 2 e 3

5- 72°C 1 min

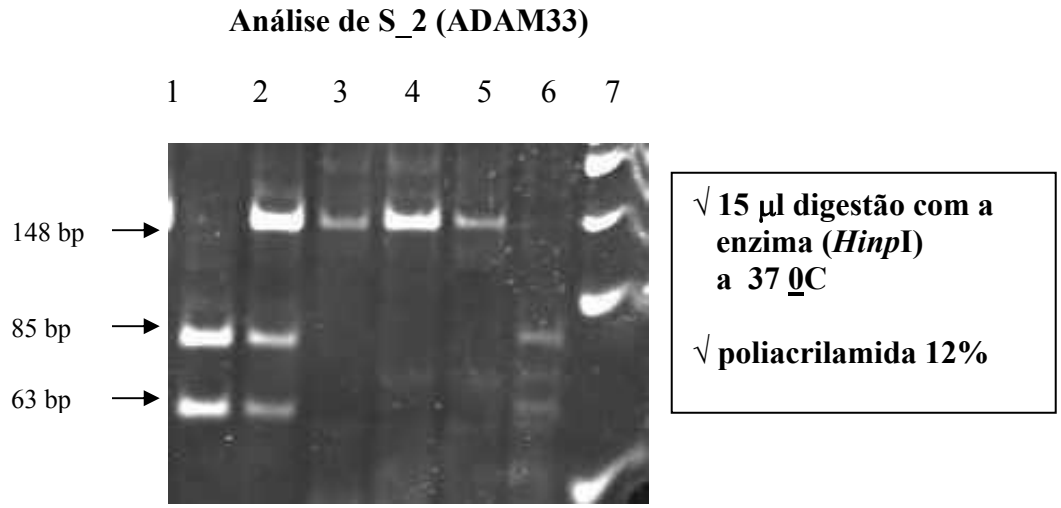

Figura 12- Análise do polimorfismo S_2

Colunas 1 e 6- indivíduos com o genótipo CC

Coluna 2- indivíduo que apresenta o genótipo CG

Colunas 3, 4, 5- indivíduos com o genótipo GG

Coluna 7-ladder de 50 bp

3.2.8- Análise dos dados

A análise da associação das variações entre os pacientes asmáticos e o grupo controle foram feitas através do teste Qui-Quadrado e o cálculo de OR ("Odds Ratio"). A diferença entre os grupos foi estatisticamente significativa quando o valor de p do teste aplicado foi $< 0,05$.

4 - RESULTADOS

4.1- Caracterização da amostra

Foram analisados 88 pacientes asmáticos, sendo 27 com asma leve, 23 com asma moderada e 38 com asma grave (Tabela 2), assim como 202 controles. Com relação ao grupo étnico, 92% dos pacientes foram brancos, 7% pardos e 1% negros (Gráfico 1). O grupo de pacientes foi constituído por 47 % homens e 53 % mulheres (Gráfico2). Com relação ao grupo controle, 79.2% foram brancos, 20.3% negros e 0.5% amarelos (Gráfico 3). Quanto ao gênero, o grupo controle foi constituído por 58% homens e 42% mulheres (Gráfico 4).

Tabela 2- Distribuição de pacientes asmáticos leves, moderados e graves quanto ao gênero e idade, provenientes do Ambulatório de Imunologia, Alergia e Pneumologia do Departamento de Pediatria da FCM - UNICAMP (G-Asma Grave, M - Asma Moderada e L - Asma Leve)

Paciente no.	Nome	Gênero	Idade	Tipo de Asma
01	FVM	M	13	G
02	DBM	M	15	G
03	RAC	M	12	G
04	ARM	M	12	G
05	FCM	M	13	G
06	JACA	F	14	G
07	CBA	F	18	G
08	AAC	F	13	G
09	GIA	M	9	G
10	TRNB	F	11	G
11	SRF	M	10	G
12	AAL	F	11	G
13	EGA	M	18	G
14	KBP	F	15	G
15	KMBP	F	7	G

16	SMG	M	7	G
17	JFA	F	15	G
18	MMS	M	10	G
19	MDV	M	7	G
20	LGV	M	15	G
21	TGV	F	12	G
22	DGV	F	10	G
23	FAGP	M	19	G
24	KBP	F	9	G
25	KABP	F	12	G
26	DNF	M	10	G
27	GVN	F	11	G
28	ALC	F	7	G
29	AAM	M	11	G
30	BBC	F	10	G
31	AMS	F	7	G
32	BLF	M	9	G
33	RADM	F	11	G
34	LLOC	F	7	M
35	LPS	F	13	M
36	TAS	F	11	M
37	PJGS	M	7	L
38	RPC	M	10	M
39	AM	F	8	M
40	LRLJ	M	14	M
41	ASS	M	11	M
42	JCP	M	8	L

43	DG	F	12	G
44	DAG	F	10	G
45	LFSB	M	7	L
46	EPT	F	7	M
47	IFB	F	7	L
48	ES	M	9	M
49	JRCT	M	10	G
50	EA	M	10	L
51	ACF	F	7	L
52	FSC	F	9	L
53	LMS	M	10	L
54	BFN	M	12	G
55	JHSN	M	10	M
56	DVP	F	7	M
57	CC	F	10	L
58	KVAL	M	7	L
59	DCS	M	14	L
60	ASF	F	10	M
61	KGP	F	10	L
62	AV	F	7	M
63	LMAN	M	7	G
64	GM	F	12	M
65	BHFP	M	7	M
66	LNR	M	11	M
67	CGS	M	12	M
68	FDS	F	12	L
69	ACC	F	12	M

70	AC	M	7	M
71	IRG	F	7	L
72	GLBR	F	7	L
73	GSB	F	11	L
74	LEG	M	10	L
75	JVO	M	8	L
76	JHR	M	10	L
77	YCN	F	10	L
78	BPL	F	7	L
79	RAO	F	9	L
80	PMR	F	13	M
81	LCB	F	13	M
82	FAR	M	10	L
83	TRN	F	7	M
84	RFO	F	13	L
85	BCS	M	10	M
86	MAF	F	8	L
87	MMR	F	8	L
88	FML	M	9	L

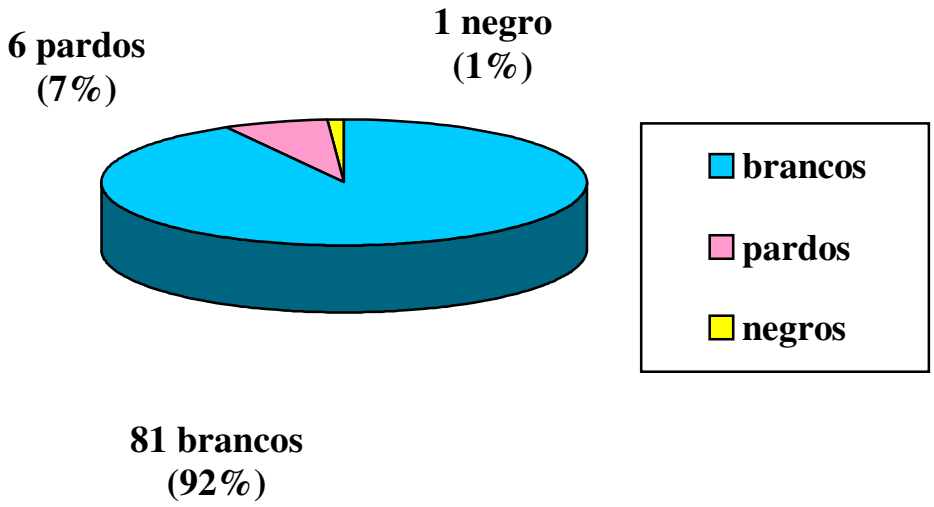

Gráfico 1- Distribuição dos pacientes asmáticos, provenientes do Ambulatório de Imunologia, Alergia e Pneumologia do Departamento de Pediatria da FCM-UNICAMP, quanto à raça.

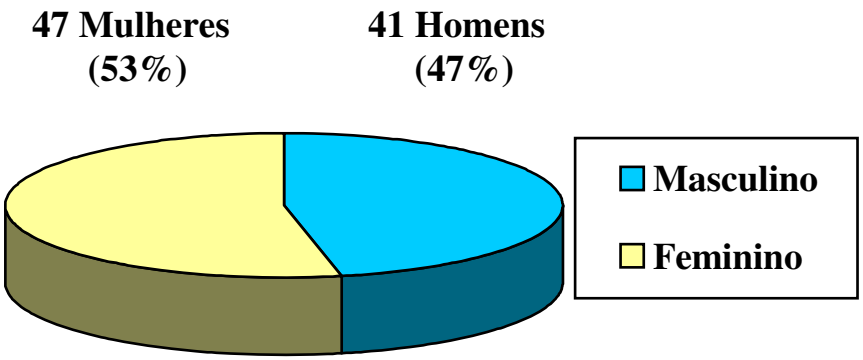

Gráfico 2- Distribuição dos pacientes asmáticos, provenientes do Ambulatório de Imunologia, Alergia e Pneumologia do Departamento de Pediatria da FCM-UNICAMP, quanto ao gênero.

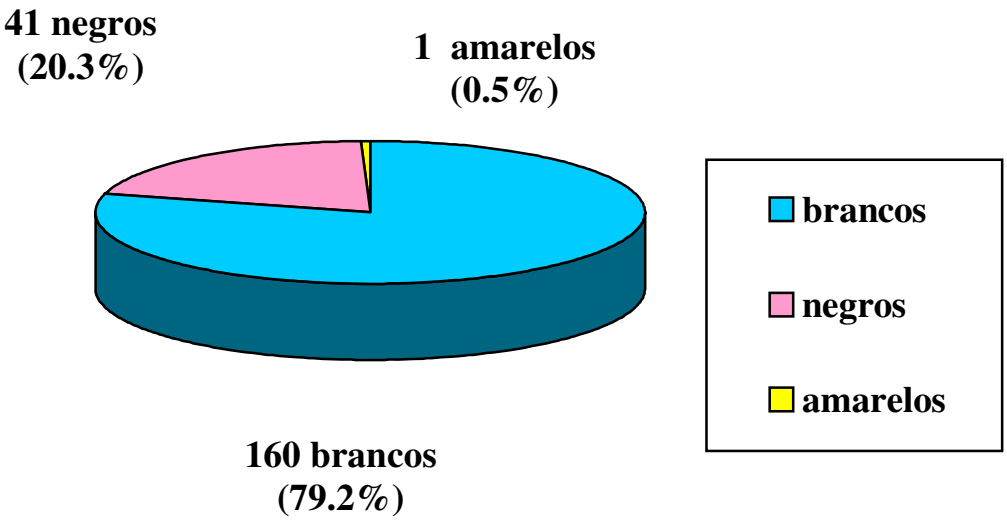

Gráfico 3- Distribuição do grupo controle quanto à raça

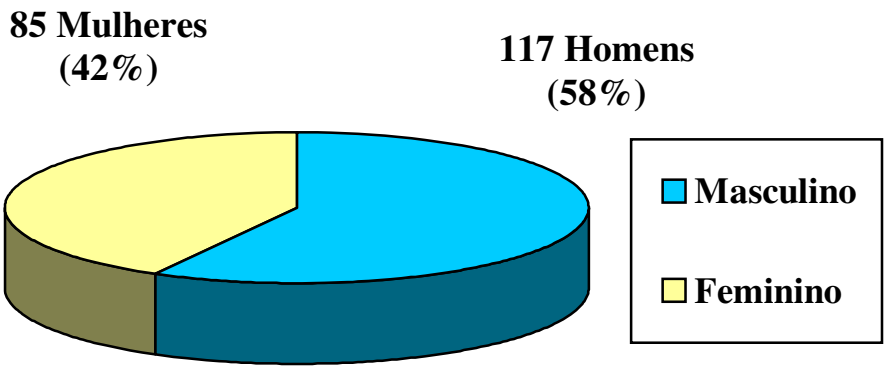

Gráfico 4- Distribuição do grupo controle quanto ao gênero

4.2- Análise das mutações

4.2.1- TGF-β1 - T869C

Com relação ao polimorfismo T869C do gene *TGF-β1,* a amostra de pacientes asmáticos estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) ($X_{(2)}^2$= 2,83 P=0,24). A amostra controle não está em EHW ($X_{(2)}^2$ =10,58 P=0,005). Quando se comparou a freqüência alélica e genotípica dos pacientes asmáticos com o grupo controle, não se observou uma diferença significativa (Tabelas 3 e 4). Quanto à distribuição alélica por gravidade da asma em relação ao grupo controle não encontramos diferença significativa (Tabela 5). Quando se comparou a distribuição da freqüência genotípica quanto à gravidade da asma com o grupo controle se observou uma diferença significativa em relação à asma grave e o grupo controle (p= 0,007) e constatamos diferença significativa ao comparar a asma moderada com asma grave (p= 0,012) e a asma leve com a asma grave (p= 0,012) (Tabela 6). Ao comparar a distribuição da freqüência genotípica da asma grave com o grupo controle se observou uma diferença significativa em relação aos genótipos TC e CC, sendo o genótipo CC um fator de risco para a asma grave (p= 0,005; OR= 2,99(1,25-7,09)) (Tabela 7). Na Tabela 8, foi comparada à distribuição da freqüência genotípica por gravidade da asma somente nos pacientes e foi observada uma diferença significativa entre os genótipos TC e CC.

Tabela 3- Comparação da freqüência alélica do polimorfismo T869C do gene *TGF-β1* entre pacientes asmáticos e o grupo controle

Alelo	Pacientes	Controle
T	91 (51.7%)	218 (53.9%)
C	85 (48.3%)	186 (46%)
Total	176	404

$X_{(1)}^2$ = 0,25 P=0,61 OR=0,91 (0,63-1,32)

Tabela 4- Comparação da freqüência genotípica do polimorfismo T869C do gene *TGF-β1* entre pacientes asmáticos e o grupo controle

Genótipo	Amostra	Controle
TT	18 (20.4%)	43 (21.3%)
TC	55 (62.5%)	132 (65.3%)
CC	15 (17%)	27 (13.3%)
Total	88	202

$X_{(2)}^2$ =0,67 P=0,71

Tabela 5- Distribuição da freqüência alélica por gravidade da asma quanto ao polimorfismo T869C do gene *TGF-β1*

Alelo	Asma leve	Asma moderada	Asma grave	Controle
T	29 (53.7%)	26 (56.5%)	36 (47.3%)	218 (54%)
C	25 (46.3%)	20 (43.5%)	40 (52.6%)	186 (46%)
Total	54	46	76	404

$X_{(3)}^2$ =1,34 P=0,719

Tabela 6- Distribuição da freqüência genotípica por gravidade da asma quanto ao polimorfismo T869C do gene *TGF-β1*

Genótipo	Asma leve	Asma moderada	Asma grave	Controle
TT	4 (14.8%)	4 (17.4%)	10 (26.3%)	43 (21.3%)
TC	21 (77.7%)	18 (78.2%)	16 (42.1%)	132 (65.3%)
CC	2 (7.4%)	1 (4.3%)	12 (31.6%)	27 (13.4%)
Total	27	23	38	202

L x C = $X_{(2)}^2$ =1,70 P=0,42

M x C = $X_{(2)}^2$ =2,02 P=0,36

G x C = $X_{(2)}^2$ =9,70 P=0,007

L x M = $X_{(2)}^2$ =0,25 P=0,88

M x G = $X_{(2)}^2$ =8,84 P=0,012

L x G = $X_{(2)}^2$ =8,78 P=0,012

Tabela 7- Comparação da distribuição da freqüência genotípica da asma grave com o grupo controle quanto ao polimorfismo T869C do gene *TGF-β1*

Genótipo	Asma grave	Controle	X2	P	OR(IC)
TT	10 (26,3%)	43 (21.3%)	0,47	0,49	1,32 (0,55-3,11)
TC	16 (42.1%)	132 (65.3%)	7,31	0,006	0,39 (0,18-0,82)
CC	12 (31.5%)	27 (13.3%)	7,80	0,005	2,99 (1,25-7,09)
Total	38	202	-	-	-

Tabela 8- Distribuição da freqüência genotípica por gravidade da asma II quanto ao polimorfismo T869C do gene *TGF-β1*

Genótipo	Leve/moderada	Grave	X2	P	OR (IC)
TT	8 (16%)	10 (26.3%)	1,41	0,23	0,53 (0,16-1,72)
TC	39 (78%)	16 (42.1%)	11,07	0,0005	4,88 (1,76-13,76)
CC	3 (6%)	12 (31.6%)	9,99	0,0015	0,14 (0,002-0,59)
Total	50	38	-	-	-

$X_{(2)}^2$ =13,86 P=0,00097

4.2.1.1- C509T (TGF-β1)

Com relação ao polimorfismo C509T do gene *TGF-β1*, a amostra de pacientes asmáticos estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) ($X_{(2)}^2$= 0 P=1), bem como a amostra controle ($X_{(2)}^2$ =1,79 P=0,41). Quando se comparou a freqüência alélica e genotípica dos pacientes asmáticos com o grupo controle, não se observou uma diferença significativa (Tabelas 9 e10). Quanto à distribuição das freqüências alélica e genotípica por gravidade da asma em relação ao grupo controle e entre os grupos de gravidade, não encontramos diferença significativa (Tabelas 11 a 13).

Tabela 9- Comparação da freqüência alélica do polimorfismo C509T do gene *TGF-β1* entre pacientes asmáticos e o grupo controle

Alelo	Pacientes	Controle
C	106 (60.2%)	228 (56.4%)
T	70 (39.8%)	176 (43.5%)
Total	176	404

$X_{(1)}^2$ = 0,72 P=0,39 OR=1,17 (0,8-1,71)

Tabela 10- Comparação da freqüência genotípica do polimorfismo C509T do gene *TGF-β1* entre pacientes asmáticos e o grupo controle

Genótipo	Amostra	Controle
CC	32 (36.4%)	58 (28.7%)
CT	42 (47.7%)	112 (55.4%)
TT	14 (16%)	32 (15.8%)
Total	88	202

$X_{(2)}^2$ =1,84 P=0,39

Tabela 11- Distribuição da freqüência alélica por gravidade da asma quanto ao polimorfismo C509T do gene *TGF-β1*

Alelo	Asma leve	Asma moderada	Asma grave	Controle
C	37 (68.5%)	24 (52.1%)	45 (59.2%)	228 (56.4%)
T	17 (31.5%)	22 (47.8%)	31 (40.8%)	176 (43.6%)
Total	54	46	76	404

$X_{(3)}^2$ =3,50 P=0,32

Tabela 12- Distribuição da freqüência genotípica por gravidade da asma quanto ao polimorfismo C509T do gene *TGF-β1*

Genótipo	Asma leve	Asma moderada	Asma grave	Controle
CC	12 (44.4%)	6 (26%)	14 (36.9%)	58 (28.7%)
CT	13 (48.1%)	12 (52.2%)	17 (44.7%)	112 (55.4%)
TT	2 (7.4%)	5 (21.7%)	7 (30.4%)	32 (15.8%)
Total	27	23	38	202

L x C = $X_{(2)}^2$ =3,30 P=0,19

M x C = $X_{(2)}^2$ =0,53 P=0,76

G x C = $X_{(2)}^2$ =1,52 P=0,46

L x M = $X_{(2)}^2$ =3,03 P=0,22

M x G = $X_{(2)}^2$ =0,75 P=0,68

L x G = $X_{(2)}^2$ =1,65 P=0,43

Tabela 13- Distribuição da freqüência genotípica por gravidade da asma II quanto ao polimorfismo C-509T do gene *TGF-β1*

Genótipo	Leve/moderada	Grave
CC	18 (36%)	14 (36.9%)
CT	25 (50%)	17 (44.7%)
TT	7 (14%)	7 (30.4%)
Total	50	38

$X_{(2)}^2$ =0,39 P=0,82

4.2.2- C-159T (CD14)

Com relação ao polimorfismo C-159T do gene *CD14*, a amostra de pacientes estava em EHW ($X_{(2)}^2$= 0,21 P=0,90). A amostra controle não estava em EHW ($X_{(2)}^2$ =18,72 P=0,00008). Foi observada uma diferença significativa, ao comparar a freqüência alélica dos pacientes asmáticos com o grupo controle (p=0,028; OR=1,49 (1,02-2,17)), com um aumento do alelo T na amostra de pacientes (Tabela 14), com relação à freqüência genotípica, os genótipos CT e TT foram estatisticamente significantes, sendo que o genótipo TT apresentou um fator de risco na asma (p=0,0000007 OR= 7,13

(2,81-18,59)) (Tabela 15). Na Tabela 16, quando se fez a comparação da distribuição da freqüência alélica por gravidade em pacientes com asma e o grupo controle, não se observou um resultado significativo, mas ao se realizar a distribuição da freqüência genotípica por gravidade, houve uma diferença estatística em relação à asma moderada e grave com o grupo controle (Tabela 17). Quando se comparou a distribuição da freqüência genotípica da asma grave com o grupo controle foi observado um resultado significativo com genótipos TT e CT em relação à asma grave, constatamos que o genótipo TT representou um fator de risco para a asma grave (p= 0,000; OR=11,19 (3,74-34,24)) (Tabela18). Na Tabela 19, ao fazer a distribuição da freqüência genotípica por gravidade da asma, somente entre asmáticos, não foi observada uma diferença significativa.

Tabela 14- Comparação da freqüência alélica do polimorfismo C-159T do gene *CD14* entre pacientes asmáticos e o grupo controle

Alelo	Pacientes	Controle
T	81 (46%)	147 (36.4%)
C	95 (54%)	257 (63.6%)
Total	176	404

$X_{(1)}^2 = 4,77$ P=0,028 OR=1,49 (1,02-2,17)

Tabela 15- Comparação da freqüência genotípica do polimorfismo C-159T do gene *CD14* entre pacientes asmáticos e o grupo controle

Genótipo	Amostra	Controle	X2	P	OR (IC)
TT	20 (22.7%)	8 (4%)	24,75	0,0000007	7,13 (2,81-18,59)
CT	41 (46.6%)	131 (64.8%)	8,47	0,0036	0,47 (0,28-0,81)
CC	27 (30.7%)	63 (31.2%)	0,01	0,9317	0,98 (0,55-1,74)
Total	88	202	-	-	-

$X_{(2)}^2 = 25,81$ P=0,0000024

Tabela 16- Distribuição da freqüência alélica por gravidade da asma quanto ao polimorfismo C-159T do gene *CD14*

Alelo	Asma leve	Asma moderada	Asma grave	Controle
T	24 (44.4%)	19 (41.3%)	38 (50%)	147 (36.4%)
C	30 (55.5%)	27 (58.7%)	38 (50%)	257 (63.6%)
Total	54	46	76	404

$X_{(3)}^2$ =5,76 P=0,12

Tabela 17- Distribuição da freqüência genotípica por gravidade da asma quanto ao polimorfismo C-159T do gene *CD14*

Genótipo	Asma leve	Asma moderada	Asma grave	Controle
TT	4 (14.8%)	4 (17.4%)	12 (31.6%)	8 (4%)
CT	16 (59.2%)	11 (47.8%)	14 (36.8%)	131 (64.8%)
CC	7 (26%)	8 (34.8%)	12 (31.6%)	63 (31.2%)
Total	27	23	38	202

L x C = $X_{(2)}^2$ =5,69 P=0,05

M x C = $X_{(2)}^2$ =8,02 P=0,01

G x C = $X_{(2)}^2$ =33,43 P=0,00000006

L x M = $X_{(2)}^2$ =0,68 P=0,71

M x G = $X_{(2)}^2$ =1,57 P=0,45

L x G = $X_{(2)}^2$ =3,69 P=0,15

Tabela 18- Comparação da distribuição da freqüência genotípica da asma grave com o grupo controle quanto ao polimorfismo C-159T do gene *CD14*

Genótipo	Asma grave	Controle	X2	P	OR (IC)
TT	12 (31.6%)	8 (4%)	31,94	0,000	11,19 (3,74-34,24)
CT	14 (36.8%)	131 (64.8%)	10,49	0,001	0,32 (0,14-0,69)
CC	12 (31.6%)	63 (31.2%)	0,02	0,88	1,02 (0,45-2,27)
Total	38	202	-	-	-

Tabela 19- Distribuição da freqüência genotípica por gravidade da asma II quanto ao polimorfismo C-159T do gene *CD14*

Genótipo	Leve/moderada	Grave	X2	P	OR (IC)
TT	8 (16%)	12 (31.6%)	2,98	0,08	0,41 (0,13-1,27)
CT	27 (54%)	14 (36.8%)	2,55	0,10	2,01 (0,78-5,24)
CC	15 (30%)	12 (31.6%)	0,03	0,87	0,93 (0,34-2,55)
Total	50	38	-	-	-

$X_{(2)}^2$ =3,69 P=0,15

4.2.3- Ile50Val (IL4R)

Com relação ao polimorfismo Ile50Val do gene *IL4R*, a amostra de pacientes ($X_{(2)}^2$= 1,47 P=0,47) e controle ($X_{(2)}^2$ =0,11 P=0,94) estavam em EHW. Ao comparar a freqüência alélica e genotípica entre os pacientes asmáticos e grupo controle não foi observada diferença estatística significativa (Tabelas 20 e 21). Ao analisar a distribuição da freqüência alélica por gravidade, não foi observado um resultado significante (Tabela 22), mas quando foi realizada a distribuição da freqüência genotípica por gravidade da asma, ao comparar a asma leve com a asma grave foi observada diferença estatística significante com o genótipo Val/Val em relação à asma leve, constatamos que o genótipo Val/Val representou um fator de risco para a asma leve (p=0,003; OR=9,0(1,54-90,89)) (Tabelas 23, 24). Com relação à distribuição da freqüência genotípica somente entre os grupos de gravidade, não se observou resultado significativo (Tabela 25).

Tabela 20- Comparação da freqüência alélica do polimorfismo Ile50Val do gene *IL4R* entre pacientes asmáticos e o grupo controle

Alelo	Pacientes	Controle
Val	84 (47.7%)	174 (43%)
Ile	92 (52.3%)	230 (57%)
Total	176	404

$X_{(1)}^2$ = 1,08 P=0,29 OR=1,21 (0,83-1,75)

Tabela 21- Comparação da freqüência genotípica do polimorfismo Ile50Val do gene *IL4R* entre pacientes asmáticos e o grupo controle

Genótipo	Amostra	Controle
Val/Val	16 (18.2%)	39 (19.3%)
Val/Ile	52 (59%)	96 (47.5%)
Ile/Ile	20 (22.7%)	67 (33.2%)
Total	88	202

$X_{(2)}^2$ =3,88 P=0,14

Tabela 22- Distribuição da freqüência alélica por gravidade da asma quanto ao polimorfismo Ile50Val do gene *IL4R*

Alelo	Asma leve	Asma moderada	Asma grave	Controle
Val	32 (59.3%)	23 (50%)	29 (38.2%)	174 (43%)
Ile	22 (40.7%)	23 (50%)	47 (61.8%)	230 (57%)
Total	54	46	76	404

$X_{(3)}^2$ =6,90 P=0,07

Tabela 23- Distribuição da freqüência genotípica por gravidade da asma quanto ao polimorfismo Ile50Val do gene *IL4R*

Genótipo	Asma leve	Asma moderada	Asma grave	Controle
Val/Val	9 (33.3%)	5 (21.7%)	2 (5.2%)	39 (19.3%)
Val/Ile	14 (51.9%)	13 (56.5%)	25 (65.8%)	96 (47.5%)
Ile/Ile	4 (14.8%)	5 (21.7%)	11 (29%)	67 (33.2%)
Total	27	23	38	202

L x C = $X_{(2)}^2$ =4,92 P=0,085

M x C = $X_{(2)}^2$ =1,25 P=0,53

G x C = $X_{(2)}^2$ =5,98 P=0,05

L x M = $X_{(2)}^2$ =0,98 P=0,61

M x G = $X_{(2)}^2$ =3,87 P=0,14

L x G = $X_{(2)}^2$ =9,25 P=0,009

Tabela 24- Comparação da distribuição da freqüência genotípica da asma leve com a asma grave quanto ao polimorfismo Ile50Val do gene *IL4R*

Genótipo	Asma leve	Asma grave	X2	P	OR (IC)
Val/Val	9 (33.3%)	2 (5.2%)	8,85	0,003	9,0 (1,54-90,89)
Val/Ile	14 (51.9%)	25 (65.8%)	1,28	0,25	0,56 (0,18-1,73)
Ile/Ile	4 (14.8%)	11 (29%)	1,78	0,18	0,43 (0,09-1,72)
Total	27	38	-	-	-

Tabela 25- Distribuição da freqüência genotípica por gravidade da asma II quanto ao polimorfismo Ile50Val do gene *IL4R*

Genótipo	Leve/moderada	Grave	X2	P	OR (IC)
Val/Val	14 (28%)	2 (5.2%)	7,50	0,06	7,0 (1,42-66,61)
Val/Ile	27 (54%)	25 (65.8%)	1,24	0,26	0,61 (0,23-1,59)
IleIle	9 (18%)	11 (29%)	1,47	0,22	0,54 (0,18-1,64)
Total	50	38	-	-	-

$X_{(2)}^2$ =7,79 P=0,02

4.2.4- C-590T (IL4)

Em relação ao polimorfismo C-590T do gene *IL4*, a amostra de pacientes ($X_{(2)}^2$= 0,06 P=0,96) e controle ($X_{(2)}^2$ =1,27 P=0,53) estavam em EHW. Nas Tabelas 26 e 27 ao fazer a distribuição das freqüências alélica e genotípica de asmáticos e comparar com controles, não houve resultado significativo. Ao fazer a análise da distribuição das freqüências alélicas e genotípicas por gravidade entre os pacientes asmáticos em relação ao grupo controle, não houve uma diferença significativa (28 29). Na tabela 30, não houve significância ao fazer a comparação da distribuição da freqüência genotípica entre os grupos de gravidade da asma.

Tabela 26- Comparação da freqüência alélica do polimorfismo C-590T do gene *IL4* entre pacientes asmáticos e o grupo controle

Alelo	Pacientes	Controle
C	117 (66.5%)	242 (60%)
T	59 (33.5%)	162 (40%)
Total	176	404

$X_{(1)}^2$ = 2,25 P=0,13 OR=1,33 (0,90-1,96)

Tabela 27- Comparação da freqüência genotípica do polimorfismo C-590T do gene *IL4* entre pacientes asmáticos e o grupo controle

Genótipo	Amostra	Controle
CC	38 (43.1%)	67 (33.1%)
CT	41 (46.6%)	108 (53.5%)
TT	09 (10.2%)	27 (13.4%)
Total	88	202

$X_{(2)}^2$ =2,75 P=0,25

Tabela 28- Distribuição da freqüência alélica por gravidade da asma quanto ao polimorfismo C-590T do gene *IL4*

Alelo	Asma leve	Asma moderada	Asma grave	Controle
C	31 (57.4%)	31 (67.4%)	55 (72.3%)	242 (60%)
T	23 (42.6%)	15 (32.6%)	21 (27.6%)	162 (40%)
Total	54	46	76	404

$X_{(3)}^2$ =5,27 P=0,15

Tabela 29- Distribuição da freqüência genotípica por gravidade da asma quanto ao polimorfismo C-590T do gene *IL4*

Genótipo	Asma leve	Asma moderada	Asma grave	Controle
CC	9 (33.3%)	10 (43.5%)	19 (50%)	67 (33.1%)
CT	13 (48.1%)	11 (47.8%)	17 (44.7%)	108 (53.5%)
TT	5 (18.5%)	2 (8.7%)	2 (5.3%)	27 (13.4%)
Total	27	23	38	202

L x C = $X_{(2)}^2$ =0,58 P=0,74
M x C = $X_{(2)}^2$ =1,12 P=0,57
G x C = $X_{(2)}^2$ =4,73 P=0,09
L x M = $X_{(2)}^2$ =1,19 P=0,55
M x G = $X_{(2)}^2$ =0,42 P=0,81
L x G = $X_{(2)}^2$ =3,63 P=0,16

Tabela 30- Distribuição da freqüência genotípica por gravidade da asma II quanto ao polimorfismo C-590T do gene *IL4*

Genótipo	Leve/moderada	Grave
CC	19 (38%)	19 (50%)
CT	24 (48%)	17 (44.7%)
TT	7 (14%)	2 (5.3%)
Total	50	38

$X_{(2)}^2$ =2,38 P=0,30

4.2.5- S_2 (ADAM33)

Em relação ao polimorfismo S-2 do gene *ADAM33*, a amostra de pacientes estava em EHW ($X_{(2)}^2$= 0,11 P=0,94). A amostra controle não estava em EHW ($X_{(2)}^2$ =19,50 P=0,000058). Ao realizarmos a comparação da freqüência alélica entre pacientes asmáticos e o grupo controle, não se observou um resultado significativo (Tabela 31). Na tabela 32 ao realizar a comparação da freqüência genotípica entre pacientes asmáticos e o grupo controle foi observado um valor significativo em relação aos genótipos GG, GC e CC. Na distribuição da freqüência alélica por gravidade de asma em relação ao grupo controle, não se teve um resultado significativo (Tabela 33), mas quando foi realizada a análise da distribuição da freqüência genotípica por gravidade da asma, foi observado um resultado significativo em relação à asma leve e a asma grave com o grupo controle (Tabela 34). Na tabela 35, quando foi comparada a distribuição genotípica da asma leve com o grupo controle, foi observado um resultado significativo em relação aos genótipos GG, GC e CC. Constatamos que o genótipo CC representou um fator de risco para a asma leve (p=0,01; OR= 3,95(1,08-13,47)). Na tabela 36 quando se comparou a distribuição genotípica da asma grave com o grupo controle foi observado um resultado significativo em relação ao genótipo GC. Na tabela 37 quando foi realizada a distribuição genotípica somente entre os asmáticos, não houve resultado significativo.

Tabela 31- Comparação da freqüência alélica do polimorfismo S_2 do gene *ADAM33* entre pacientes asmáticos e o grupo controle

Alelo	Pacientes	Controle
G	116 (66%)	246 (60%)
C	60 (34%)	158 (40%)
Total	176	404

$X_{(1)}^2$ = 1,32 P=0,25 OR=0,81 (0,55-1,19)

Tabela 32- Comparação da freqüência genotípica do polimorfismo S_2 do gene *ADAM33* entre pacientes asmáticos e o grupo controle

Genótipo	Amostra	Controle	X2	P	OR (IC)
GG	39 (44.3%)	55 (27.2%)	8,17	0,004	3,13 (1,22-3,71)
GC	38 (43.1%)	136 (67.3%)	14,89	0,0001	0,37 (0,21-0,64)
CC	11 (12.5%)	11 (5.4%)	4,35	0,03	2,48 (0,95-6,46)
Total	88	202	-	-	-

$X_{(2)}^2$ =15,50 P=0,0004

Tabela 33- Distribuição da freqüência alélica por gravidade da asma quanto ao polimorfismo S_2 do gene *ADAM33*

Alelo	Asma leve	Asma moderada	Asma grave	Controle
G	35 (64.8%)	32 (69.5%)	49 (64.5%)	246 (60%)
C	19 (35.1%)	14 (30.4%)	27 (35.5%)	158 (40%)
Total	54	46	76	404

$X_{(3)}^2$ =1,67 P=0,64

Tabela 34- Distribuição da freqüência genotípica por gravidade da asma quanto ao polimorfismo S_2 do gene *ADAM33*

Genótipo	Asma leve	Asma moderada	Asma grave	Controle
GG	13 (48.1%)	10 (43.5%)	16 (42.1%)	55 (27.2%)
GC	9 (33.3%)	12 (52.1%)	17 (44.7%)	136 (67.3%)
CC	5 (18.5%)	1 (4.3%)	5 (13.2%)	11 (5.4%)
Total	27	23	38	202

L x C = $X_{(2)}^2$ =13,68 P=0,001

M x C = $X_{(2)}^2$ =2,65 P=0,26

G x C = $X_{(2)}^2$ =7,81 P=0,02

L x M = $X_{(2)}^2$ =3,19 P=0,20

M x G = $X_{(2)}^2$ =1,30 P=0,52

L x G = $X_{(2)}^2$ =0,94 P=0,62

Tabela 35- Comparação da distribuição da freqüência genotípica da asma leve com o grupo controle quanto ao polimorfismo S_2 do gene *ADAM33*

Genótipo	Asma leve	Controle	X2	P	OR (IC)
GG	13 (48.1%)	55 (27.2%)	4,99	0,025	2,48 (1.02-6,04)
GC	9 (33.3%)	136 (67.3%)	11,85	0,0005	0,24 (0,09-0,61)
CC	5 (18.5%)	11 (5.4%)	6,26	0,01	3,95 (1,08-13,47)
Total	27	202	-	-	-

Tabela 36- Comparação da distribuição da freqüência genotípica da asma grave com o grupo controle quanto ao polimorfismo S_2 do gene *ADAM33*

Genótipo	Asma grave	Controle	X^2	P	OR (IC)
GG	16 (42.1%)	55 (27.2%)	3,40	0,06	1,94 (0,90-4,20)
GC	17 (44.7%)	136 (67.3%)	7,06	0,007	0,39 (0,18-0,84)
CC	5 (13.2%)	11 (5.4%)	3,06	0,08	2,63 (0,74-8,84)
Total	38	202	-	-	-

Tabela 37- Distribuição da freqüência genotípica por gravidade da asma II quanto ao polimorfismo S_2 do gene *ADAM33*

Genótipo	Leve/moderada	Grave
GG	23 (46%)	16 (42.1%)
GC	21 (42%)	17 (44.7%)
CC	6 (12%)	5 (13.2%)
Total	50	38

$X_{(2)}^2$ =0,13 P=0,93

A distribuição genotípica de todos os polimorfismos analisados dos pacientes foi representada no anexo 3.

5 - DISCUSSÃO

A asma pode ser denominada como uma doença genética complexa em que há múltiplos efeitos genéticos que interagem com o ambiente para modificar a susceptibilidade e a severidade da doença (Holloway et al.; 1999).

Nos polimorfismos em que a amostra controle não se encontrava em equilíbrio de Hardy – Weinberg, acredita-se que se deva ao fato de que na Lei de Hardy - Weinberg preconiza-se uma população ideal, sem pressão seletiva. Nos casos dos polimorfismos estudados, por interferirem em mecanismos relacionados com a inflamação, com certeza determinados genótipos devam sofrer uma pressão seletiva e com isso, a distribuição genotípica não siga a lei de Hardy-Weinberg.

O polimorfismo T869C do gene *TGF-β1* em nossa amostra mostrou uma associação entre o genótipo CC e os pacientes portadores de asma grave (p= 0,005; OR= 2,99(1,25-7,09)). Não houve diferença significativa entre asmáticos de maneira geral e o controle normal com relação ao genótipo CC. No entanto, Mak et al. (2006) estudando 250 chineses portadores de asma demonstraram que os indivíduos com genótipo CC teriam uma maior susceptibilidade a asma (OR= 2,58 IC-1,17-5,66).

Com relação ao polimorfismo C-509T em nosso estudo nenhuma associação foi encontrada, diferindo dos poucos estudos realizados. Pulleyn et al. (2001), estudando asmáticos ingleses, encontraram associação entre homozigotos TT do polimorfismo C-509T do gene *TGFβ-1* e a asma grave. Quase duas vezes mais (1.8 vezes) asmáticos graves tinham o genótipo TT, comparado a asmáticos do grupo leve, e esta diferença era aumentada 5.6 vezes relativa aos controles. Outro detalhe interessante é que esses pacientes também eram homozigotos para outros polimorfismos como o 72C, 869C e 915G. Silverman et al. (2004) estudando 527 asmáticos caucasóides, também encontraram associação com o genótipo TT (OR 2,98-IC 1,45-6,25). Mak et al. (2006) encontraram associação do polimorfismo C-509T (heterozigoto) com o risco de asma (OR=4,00-IC 1,06-15,08). Já Heinzmann et al. (2005) investigando 231 crianças asmáticas alemãs não encontraram associação desse polimorfismo com asma.

Como o TGFβ-1 deve ser prejudicial nas vias aéreas de indivíduos com asma, é sustentado que seu aumento possa estimular o remodelamento das vias aéreas. Sobre este paradigma, variantes genéticas que estão associadas a níveis elevados de TGFβ-1, como o

alelo T do polimorfismo C-509T e o alelo C do polimorfismo T869C, deveriam ser esperados estarem associados à prevalência elevada ou o aumento da gravidade da asma (Mak et al.; 2006).

O polimorfismo C-159T da região promotora do gene *CD14* tem sido associado ao aumento da expressão de CD14 "in vitro" (Le Van et al.; 2001) e no soro de crianças (Baldini et al.; 1999), e com níveis séricos alterados de IgE e testes alérgicos positivos em diferentes populações (Baldini et al.; 1999, Koppelman et al.; 2001, Vercelli et al.; 2001). Kedda et al. (2005) confirmaram associações entre C-159T e atopia, mas não encontraram associação entre este polimorfismo e asma ou a gravidade da asma em uma população Australiana.

Dentre os polimorfismos do gene *CD14,* o C-159T tem sido mais extensamente estudado em doenças atópicas. Em estudos clínicos o genótipo TT tem sido associado com quantidades elevadas de CD14 no soro, com número diminuído de testes alérgicos positivos, e níveis séricos diminuído de IgE no soro em Britânicos e Americanos (Baldini et al.; 1999, Vercelli et al.; 2001) e tem sido associado com a asma não atópica em vários grupos étnicos (Woo et al.; 2003). Inversamente, o genótipo CC tem sido associado a níveis elevados de IgE e um número elevado de testes alérgicos positivos na população de países baixos (Koopelman et al.; 1999, Vercelli et al.; 2001). Entretanto, associações entre o polimorfismo C-159T e doenças atópicas não têm sido consistentes e, em contraste com esses relatos, o alelo -159T foi mais comum em adultos atópicos (Kedda et al.; 2005).

Segundo Kedda et al (2005) é possível que o polimorfismo C-159T, tenha uma influência relacionada à idade no desenvolvimento de atopia. Este polimorfismo tem sido associado à expressão aumentada de CD14 no soro de crianças (Baldini et al.; 1999), e não há diferenças nos níveis de CD14 no soro, em amostras de doadores adultos de sangue com diferentes genótipos para *CD14* (Heesen et al.; 2001). Adicionalmente, um estudo longitudinal em indivíduos brancos da Austrália com a idade de 8-25 anos, foi encontrado que os com genótipo CC eram provavelmente os que tinham atopia mais cedo, sugerindo que a influência do polimorfismo -159C na atopia pode ser específico da idade (O´ Donnell et al.; 2003). Existem evidências que atopia e asma são entidades próximas e

estão relacionadas à associação positiva entre o número de IgE e testes alérgicos positivos, hiperresponsividade, e desenvolvimento de asma (Burrows et al.; 1989, Sears et al.; 1993). Então alelos que estão associados com atopia devem ser esperados serem representativos em indivíduos com asma, em relação à população geral (Koppelman et al.; 2001). Entretanto Kedda et al. (2005) não encontraram associação entre o polimorfismo C-159T e asma atópica. Sharma et al. (2004) encontraram associação entre este polimorfismo com asma atópica na população Indiana. Não há publicações mostrando associação entre o polimorfismo C-159T e a gravidade da asma, embora tenha sido sugerido que este polimorfismo modifique a gravidade da obstrução do fluxo aéreo em asmáticos .

No presente estudo, quando se comparou a distribuição genotípica do polimorfismo C-159T na asma grave com o grupo controle foi observado um resultado significativo com genótipos TT e CT em relação à asma grave. Constatamos que o genótipo TT representou um fator de risco para a asma grave (p= 0,000; OR=11,19 (3,74-34,24)).

A IL-4 é conhecida por aumentar a produção de imunoglobulinas (principalmente IgG1 e IgE) através de células B ativadas (Gauchat et al.; 1990), e então é considerada por exercer função importante no desenvolvimento de doenças alérgicas. A IL-4 tem também outras funções, como atividade mitogênica para células T (Grabstein et al.; 1987) e a de aumentar a expressão do receptor Fcε em células B, que é importante para a resposta alérgica (Hudak et al.; 1987).

No polimorfismo C-590T do gene da *IL-4*, sua variante está relacionada com o aumento da transcrição do gene. A incidência deste polimorfismo em um estudo de Americanos foi de 40% e o alelo T foi associado ao aumento da produção de IgE, testes alérgicos positivos, e asma (Rosenwasser et al.; 1995). Essa associação não foi encontrada em Australianos e Britânicos (Walley e Cookson, 1996). Estudos em Japoneses confirmaram a associação deste polimorfismo com asma (Noguchi et al.; 1998) e dermatite atópica (Rosenwasser, 1998). Esse polimorfismo também foi relacionado com atopia (Rosenwasser et al.; 1995) e o decréscimo da função pulmonar (Burchard et al.; 1999).

No presente estudo, não encontramos associação entre esse polimorfismo e asma. È possível que resultados diferentes possam ser encontrados em outras populações ou grupos raciais. Como diferenças étnicas e raciais são comuns em sistemas polimórficos,

alelos variantes ou grupos de genes interagindo, induzem a expressão do fenótipo clínico em diferentes populações. Talvez esse conceito possa explicar os resultados diferentes do polimorfismo C-590T e a susceptibilidade a asma.

A interleucina 4 exerce suas funções através da ligação com seu receptor a IL4-Ra. No polimorfismo Ile50Val do gene da *IL4-Ra*, a variante Ile50 estava associada com asma atópica e não tinha associação com a não atópica em Japoneses (Mitsuyasu et al.; 1998). Inversamente, Noguchi et al. (1998) verificaram que a variante Ile50 do polimorfismo Ile50Val não exerce função na predisposição genética da etiologia da atopia ou asma em outra população Japonesa. Outros estudos não encontraram associação entre este polimorfismo e asma em outros grupos étnicos (Liu et al.; 2003; Migliaccio et al.; 2003). Zhang et al. (2007) ao investigarem uma associação entre o polimorfismo Ile50Val com a asma e níveis altos de IgE, em 3 populações asiáticas provenientes da China, Malásia e Índia, verificaram que na China a prevalência do genótipo Ile50/Ile50 era significantemente menor que na Malásia, e este genótipo está relacionado com o aumento de IgE somente na Malásia. Este estudo mostrou que a associação entre este polimorfismo e a asma difere nesses grupos étnicos

No presente estudo, quando se comparou a asma leve com a asma grave foi observada uma diferença estatística significante quanto ao genótipo Val/Val do polimorfismo Ile50Val em relação à asma leve. Constatamos que o genótipo Val/Val representou um fator de risco para a asma leve (p=0,003; OR=9,0(1,54-90,89)).

Com relação ao gene *ADAM33*, Hirota et al. (2006) encontraram associação significante com a susceptibilidade de asma em uma população Japonesa para 3 SNPs (S_2, T_1, T_2), sendo esses resultados consistentes com outro estudo em uma população caucasóide Americana (Howard et al.; 2003). Jongepier et al. (2004) investigaram 9 SNPs em asmáticos e mostraram que 2 SNPs (S_2 e Q_1), foram significantemente associados com o declíneo progressivo de VEF1, quando comparado com controles normais. Recentes relatos têm sugerido que mutações em *ADAM33* podem predispor as alteradas funções pulmonares na infância e é um fator de risco para o desenvolvimento de hiper-responsividade brônquica e asma (Holgate et al.; 2006). Simpson et al. (2005) verificaram recentemente, que polimorfismos em *ADAM33* poderiam influenciar a função

pulmonar na infância e concluíram que a função pulmonar no início da vida é geneticamente determinada, podendo aumentar o risco de asma. Neste estudo nenhuma associação foi encontrada em relação ao ADAM33 e a alergia.

Explicações adicionais para diferenças nos resultados de estudos de associação entre as variações de ADAM33 e asma, pode ser em relação à definição de asma que varia entre os estudos. ADAM33 pode afetar o remodelamento do pulmão, o impacto das variações genéticas em ADAM33 pode ser variável em diferentes formas de asma, podendo a genética de ADAM33 ter impacto maior nas formas de asma que são menos associadas com atopia e mais relacionadas com mecanismos específicos do pulmão (Schedel et al.; 2006).

No presente estudo quando se comparou a distribuição genotípica da asma leve e o grupo controle, foi observado um resultado significativo em relação aos genótipos GC e CC. Constatamos que o genótipo CC representou um fator de risco para a asma leve (p=0,01; OR= 3,95(1,08-13,47)). Quando foi comparada a asma grave e o grupo controle foi observado um resultado significativo em relação ao genótipo GC.

CONCLUSÃO

- Com relação ao gene TGF-β1, em nossa amostra o polimorfismo T869C mostrou associação com o quadro grave de asma, podendo ser um modulador de gravidade, o mesmo não ocorrendo com o polimorfismo C-509T;

- Com relação ao polimorfismo C-159T do gene CD14, o genótipo TT representou um fator de risco para a asma grave, confirmando em nossa amostra, que esse polimorfismo também poderia ser considerado um modulador de gravidade da asma;

- Com relação aos polimorfismos C-590T do gene IL-4, nenhuma associação foi encontrada;

- Com relação ao polimorfismo Ile50Val do gene IL-4Ra, uma associação do homozigoto Val com a asma leve foi encontrada, sendo esse genótipo um fator de risco para asma leve;

- E finalmente uma associação entre o homozigoto CC do polimorfismo S_2 do gene ADAM33 com a asma leve foi evidenciada em nossa amostra, sendo esse genótipo um fator de risco para a asma leve, podendo estar relacionado com a patogenia da asma.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aderson GG, Morrison JFJ. Molecular biology and genetics of allergy and asthma. Arch Dis Child 1998; 78:488-96.

Ahuja S, Paliogianni F, Yamada H. Effect of transforming growth factor β on early and late activation events in human T cells. J Immunol 1993; 130: 3109-3118.

Alexis N, Eldriadge M, Reed W. CD14-dependent airway neutrophil response to inhaled LPS: role of atopy. J Allergy Clin Immunol 2001; 107:31-35.

Arai N, Nomura D, Villaret D, DeWaal Malefijt R, Seiki M, Yoshida M, et al. Complete nucleotide sequence of the chromosomal gene for human IL-4 and its expression. J. Immun 1989; 142: 274-82.

Aubert D, Dalal BI, Bai TR, Roberts CR, Hayashi S, Hogg JC. Transforming growth factor b1 gene expression in human airways. Thorax 1994;49: 225–32.

Awad MR, El Gamel A, Haleston P, Turner DM, Sinnot PJ, Hutchinson IV. Genotypic variation in the transforming growth factor beta 1 gene: association with transforming growth factor beta 1 production, fibrotic lung disease, and graft fibrosis after lung transplantation. Transplantation 1998; 66: 1014-20.

Baldini M, Lahman IC, Halonen MA. Polymorphism in the 5 flanking region of the CD14 gene is associated with circulating soluble CD14 levels and with total serum immunoglobulin E. Am J Resp Cell Mol Biol 1999; 20: 976-83.

Barnes, PJ. Mechanisms in COPD. Differences from asthma. Chest 2000;117:105-45.

Bartram U, Speer CP. The role of transforming growth factor B in lung development and disease. Chest 2004; 125:754-65.

Beghé B, Barton S, Rorke S, Peng Q, Sayers I, Gaunt T, et al. Polymorphisms in the interleukin-4 and interleukin-4 receptor α chain genes confer Susceptibility to asthma and atopy in a Caucasian population. Clin Exp Allergy 2003; 33: 1111-17.

Bennett BL, Cruz R, Lacson RG, Maning AM. Interleukin-4 supression of tumor necrosis factor alpha stimulated E selectin gene transcription is mediated by STAT-6 antagonism of NF kappa B. J Bio Chem 1997; 272:10212-19.

Blakey JD, Halapi E, Bjornsdottir U, Wheatley A, Kristinsson S, Upmanyu R, et al. The contribution of ADAM33 polymorphisms to the population risk of asthma. Thorax 2005; 60 (4): 274-6.

Blobe GC, Shiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor β in human disease. N Engl J Med 2000; 342: 1350-58.

Bousquet J, Chanez P, Lacoste JY. Assesment and clinical relevance of eosinophil inflammation in asthma. N Engl J Med 1990; 323:1086-93.

Bousquet J, Chanez P, Lacoste JY, White R, Vic P, Godard P, Michel FB. Asthma: a disease remodeling the airways. Allergy 1992; 47:3-11.

Brusselle G, Kips J, Joos G, Bluethmann H, Pauwels R. Allergen-induced airway inflammation and bronchial responsiveness in wild-type and interleukin-4-deficient mice. Am J Respir Cell Mol Biol 1995; 12:254–59.

Buckova D, Lzakovicova HL, Benes P, Znojil V, Vacha J. TGFB1 gene polymorphisms. Allergy 2001; 56: 1236-7.

Burchard EG, Silverman EK, Rosenwasser LJ. Associations between a sequence variant in the IL-4 gene promoter and FEV(1) in asthma. Am J Resp Crit Care Med 1999; 160: 919-22.

Burrows B, Martinez FD, Hlolonen M. Association of asthma with serum IgE levels and ski-test reactivity to allergns. N Engl J Med 1989; 320: 271-7.

Caggana M, Walker K, Reilly AA, Conroy JM, Duva S, Walsh AC. Population-based studies reveal differences in the allelic frequencies of two functionally significant human interleukin-4 receptor polymorphisms in several ethnic groups. Genet. Med 1999;1: 267-71.

Castro-Giner F, Kauffmann F, Cid RD, Kogevinas M. Gene environment interactions in Asthma. Occup Eviron Med 2006; 63: 776-786.

Celedon JC, Lange C, Raby BA. The transforming growth factor beta 1 (TGFB1) gene is associated with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Hum Mol Genet 2004; 13: 1649-56.

Chatkin JM, Menna Barreto S, Fonseca N. Trends in asthma mortality in young people in Southern Brazil. Ann Allergy Asthma Immunol 1999; 82: 287- 92.

Cheng L, Enomoto T, Hirota T, Shimizu M, Takahashi N, Akahoshi M. Polymorphisms in *ADAM33* are associated with allergic rhinitis due to Japanese cedar pollen. Clin Exp Allergy 2004; 34(8) : 1192-201.

Chow HT, Chen CH, Tsai CH, Tsai FJ. Association between transforming growth factor 1 gene C-509T and T869C polymorphisms and rheumatic heart disease .Am Heart J 2004; 148: 181-6.

Cockcroft DW, Swystum VA. Asthma control versus asthma severity. J Allergy Clin Immunol 1996; 98:1016-8.

Coker RK, Laurent GJ, Shahzeidi S. Diverse Cellular TGFβ1and TGFβ3 gene expression in normal human and murine lung. Eur Resp J 1996; 9: 2501-07.

Coker, RK, Laurent, GJ, Shahzeidei, S, et al Transforming growth factors-ß1, -ß2, and -ß3 stimulate fibroblast procollagen production *in vitro* but are differentially expressed during bleomycin-induced lung fibrosis. Am J Pathol 1997;150 : 981-91.

Cookson, WOC. Asthma Genetics. Chest 2002; 121:S7-13.

Daniels SE, Bhattacharrya S, JAMES, A. A genome-wide search for quantitative trait loci underlyng asthma. Nature 1996; 383:247-50.

De Boer WI, Van Schadewijik A, SONT JK. Transforming growth factor B1 and recruitment of macrophages and mast cells in airways in chcronic obstructive pulmonary disease 1998; 158: 1951-7.

Defrance T, Aubry JP, Rousset F, Vanbervliet B, Bonnefoy JY, Arai N, et al. Human recombinant interleukin 4 induces Fc epsilon receptors (CD23) on normal human B lymphocytes. J Exp Med 1987; 165:1459-67.

Derynck, R.; RHEE, L.; CHEN, E. Y.; VAN TILBURG, A. Intron-exon structure of the human transforming growth factor-beta precursor gene**.** Nucleic Acids Res 1987;15: 3188-89.

De Vríes IJ, Langeveld- Wildshut, EG, Van Reijsen FC. Adhesion molecule expression on skin endothelia in atopic dermatitis: effects of TNF-alpha and IL-4. J Allergy Clin Immunol 1998; 102(3):461-8.

Deichmann KA, Heinzmann A, Foster J. Linkage and allelic association of Atopy and markers flanking the IL-4 receptor gene. Clin Exp Allergy 1998; 28: 151-5.

Diemen CC, Postma DS, Vonk JM, Bruinenberg M, Schouton JP, Boezen HM. A Desintegrin and metalloprotease 33 polymorphisms and lung function decline in the general population. Am J Resp Crit Care Med 2005; 172: 329-333.

Dijkstra A, Vonk JM, Jongepier H, Ampleford EJ, Lange LA, Bleecker ER.et al. Lung function decline in asthma: association with inhaled corticosteroids, smoking and sex. Thorax 2006; 61: 105-10.

Djukanovic R, Roche WR, Wilson JW. - Mucosal inflammation in asthma. Am Rev Respir Dis 1990; 142:434-57.

Doull IJ, Lawrence S, Watson M, Degishvili T, Beasly RW, Lampe F, et al. Allelic association of gene markers on chromosomes 5q and 11q with atopy and bronchial hiperresponsiveness. Am J Resp Crit Care Med 1996;153:1280-84.

Duffy DL, Martin NG, Basttitutta D, Hopper JL, Mathews JD. Genetics of asthma and hay fever in Australian twins. Am Rev Respir Dis1990; 142:1351-8.

Dunning AM, Ellis PD, McBride S, Kirschenlohr HL, Healy CS, Kemp PR, et al. A transforming growth factor beta 1 signal peptide variant increases secretion in vitro and is associates with increased incidence of invasive breast cancer 2003; 63: 2610-15.

Eder W, Klimecki W, Yu L. Opposite effects of CD14/-260 on serum IgE levels in children raised in different environments. Allergy Clin Immunol 2005; 116: 601-607.

Elssner A, Jaumman F, Dobmman S. Elevated levels of interleukin 8 and transforming growth factor β in bronchioalveolar lavage fluid from patients with bronchiolitis obliterans syndrome: proinflamatory role of bronchial epithelial cells. Transplantation 2000; 70: 362-67.

Expert Panel Report II. Guidelines for the Diagnosis and Managment of Asthma. National Asthma Education and Prevention Program, Feb. 1997.

Fabry B, Fredberg JJ. Remodeling of airway smooth muscle cell: are we built of glass? Respir Physiol Neurobiol 2003; 137:109-24.

Ferrero E, Goyert SM. Nucleotide sequence of the gene encoding the monocyte differentiation antigen, CD14. Nucleic Acids Res 1988;16:4173.

Fiori R, Fristcher CC. Variação na prevalência de asma e atopia em um grupo de escolares de Porto Alegre/RS. J Pneumol 2001; 27: 237-42.

Galizzi JP, Zuber CE, Harada N, Gorman DM, Kastelein R, Banchereau J, et al. Molecular cloning of a cDNA encoding the human interleukin 4 receptor. Int. Immun.1990; 2: 669-75.

Gauchat JF, Lebman DA, Coffman RL, de Gascan HVJ. Structure and expression of germline epsilon transcripts in human B cells induced by interleukin 4 to switch to IgE production. J Exp Allergy 1990; 172: 463-73.

Grabstein KH, Park LS, Morissey PJ. Regulation od murine T cell proliferation by B cell stimulatory factor -1. J Immunol 1987; 139: 1148-53.

Grainger DJ, Heathcote K, Chiano M. Genetic control of circulating concentration of transforming growth factor type β1. Human Mol Genet 1999; 8: 93-7.

Hakonarson H, Bjornsdoltir US, Osterman E. Allelic frequencies and Patterns of single –nucleotide polymorphisms in candidate genes for asthma and atopy in Iceland. Am Resp Crit Care Med 2001; 164: 2036-44.

Hansen G, McIntire JJ, Yeung VP, Berry G, Thorbecke GJ, Chen L, et al. CD4 T helper cells engineered to produce latent TGF-beta1 reverse allergen-induced airway hyperreactivity and inflammation. J Clin Invest 2000; 105: 61–70.

Heesen M, Blomeke B, Schluter B. Lack of association between the -260C >T promoter polymorphism of the endotoxin receptor CD14 gene and the CD14 density of unstimulated human monocytes and soluble CD14 plasma levels. Intensive Care Med 2001; 27:1770-5.

Heinzmann A, Mao XQ, Akaiwa M, Kreomer RT, Gao PS, ohshima K, et al. Genetic Variants of IL-13 signalling and human asthma and atopy 2000; Human Mol Gen 9: 549-59.

Heinzmann A, Dietrich H, Jerkic S. Promoter polymorphisms of the CD14 gene are not associated with bronchial asthma in Caucasian children. Eur J Immunogenet 2003; 30: 345-8.

Heinzmann A. Bauer E, Ganter K, Kurz T, Deichamann KA. Polymorphisms of the TGFB1 gene are not associated with bronchial asthma in Caucasian Children. Pediatr Allergy Immunol 2005; 16: 310-4.

Hershey GKK, Friedrich MF, Esswein LA, Thomas M, Chatila TA. The association of atopy with a gain-of-function mutation in the alpha subunit of the Interleukin-4 receptor. N Engl J Med 1997; 337:1720-5.

Hirota T, Hasegawa K, Obara K, Matsuda A, Akahoshi M, Nakashima K. Association between ADAM33 polymorphisms and adult asthma in the Japonese population. Clinical Experimental Allergy 2006; 36:884-91.

Hoebee B, Rietveld E, Bont L, Oosten MV, Hodemaekrs HM, Nagelkerke NJD. Association of Severe Respiratory Syncytial Virus Bronchiolitis with Interleukin-4 and Interleukin-4 Receptor α Polymorphisms. The Journal of Infectious Diseases 2003; 187: 2-11.

Hobbs K, Negri J, Klinnert M. Interleukin 10 and transforming growth factor β promoter polymorphisms in allergies and asthma. Am J Respir Crit Care M edical 1998; 158: 1958-62.

Holgate ST, Davies DE, Powell RM, Holloway JW. ADAM33: a newly identified gene in the pathogenesis of asthma. Immunol Allergy Clin North Am 2005; 25: 665-68.

Holgate ST, Yang Y, Haitchi HM, Powell RM, Holloway JW, Yoshisue H. The genetics of asthma: Adam33 as an example of a susceptibility gene. Proc Am Thorac Soc 2006; 3: 440-43.

Holloway JW, Beghe B, Holgate ST. The genetic basis of atopic asthma. Clin Exp Allergy 1999; 29: 1023-32.

Holloway JW, Koppelman GH. Identifying novel genes contributing to asthma pathogenesis. Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology 2007; 7: 69-74.

Howard TD, Postma DS, Jongepier H, Moore WC. Koppelman GH, Zheng SL, et al. Association of a disintegrin ans metalloprotease 33 (ADAM33) gene with asthma in ethnically diverse populations. J Allergy Clin Immunol 2003; 112:717-22.

Hudak SA, Gollnick SO, Conrad DH, Kehry MR. Murine B-cell stimulatory factor 1 (interleukin 4) increases expression of the Fc receptor fot IgE on mouse B cells . Pro Natl Acad Sci USA 1987; 84: 4606-10.

International Study for Asthma and Allergy in Childhood (Issac). Steering Committee. Worldwide variation in prevalence of asthma symptoms : The International Study of Asthma and Allergy in childhood (Issac). Eur Resp J 1998; 12:314-35.

Jagirdar J, Lee TC, Reibman J. Immunohistochemical localization of transforming growth factor beta isoforms in asbestos-related diseases. Environ Health Perspect 1997; 5: 1197-1203.

Jenkins MA, Hopper JL, Giles GG. Regressive logistic modeling of familial aggregation for asthma in 7,394 population-based nuclear families. Genet Epidemiol 1997; 14(3): 317-32.

Jongepier H, Boezen HM, Dijkstra A, Howard TD, Vonk JM, Koppelman GH. Polymorphisms of the ADAM 33 gene are associated with accelerated lung function decline in asthma. Clin Exp Allergy 2004; 34: 757-60.

Khalil N, O´Connor RN, Flanders KC. TGFβ1, but no TGFβ2 or TGFβ3, is differentially present in epithelial cells is advanced pulmonary fibrosis : an immunhistochemical study. Am J Resp Cell Mol Biol 1996; 14:131-38.

Kedda MA, Lose F, Duffy D, Bell E, Thompson PJ, Upham, J. The CD14C-159T polymorphisms is not associated with asthma or asthma severity in an Australian adult population. Thorax 2005; 60: 211-14.

Kiley J, Smith R, Noel P. Asthma phenotypes. Curr Opinion Pulm Med 2007; 13: 19-23.

Koppelman GH, Reijmerink NE, Stine CO. Association of promoter polymorphism of the CD14 gene and atopy.Am J Resp Crit Care Med 2001**;** 163: 965-9.

Kruse S, Japha T, Tender M. The polymorphisms S503P and Q576R in the interleukin-4 receptor alpha chain are associated with and influences the signal transduction. Immunology 1999; 96 : 365-71.

Kruse S, Braun S, Deichmann KA. Distinct signal transduction processes by IL-4 and IL-13 and influences from the Q551R variant of the human IL-4 receptor alpha Chain. Respir Res 2002; 3: 24.

Kumar RK. Understanding airway wall remodeling in asthma: a basis for improvements in therapy. Pharmacol Ther 2001; 91: 93-104.

Laitinen T, Rasanen M, Kaprio J, et al. Importance of genetic factors in adolescent asthma – a population- based twin-family study. Am J Respir Crit Care Med 1998; 157:1073–1078.

Lee JH, Park HS, Park SW, Jang AS, Uh ST, Rhim T. ADAM33 polymorphisms: association with bronchial hyper-responsiveness in Korean asthmatics. Clin Exp Allergy 2004; 34: 860-65.

Le Van TD, Bloom JW, Bailey TJ. A common single nucleotide polymorphism in the CD14 promoter decreases the affinity of Sp protein binding and enhances transcriptional activity. J Immunol 2001; 167:5838-44.

Lind, DL, Choudhry S, Ung N, Ziv E, Avila PC, Salari KH. ADAM 33 is not associated with asthma in Puerto Rican or Mexican populations. Am J Respir Crit Care Med 2003; 168: 1312-16.

Liu X, Beaty TH, Deindl P. Associations between total serum IgE levels and the 6 potencially functional variants within the genes IL-4, IL-13,and IL-4RA in German children: The German Multicenter Atopy Study. J Allergy Clin Immunol 2003; 112: 382-8.

Los H, Koppelman G.H, Postma DS. – The importance of genetic influences in asthma. Eur Resp J 1999; 14(5):1210-27.

Maddox L, Schwartz DA. - The pathophysiology of asthma. Ann Rev Med 2002; 53:477-98.

Magnan A, Frachon I, Rain B. Transforming growth factor β in normal human lung: preferential location in bronchial epithelial cells. Thorax 1994; 49: 789-92.

Magnan A, Mege JL, Escallier JC. Balance between alveolar macrophage IL-6 and TGFβ in lung transplant recipients .Am Resp Crit Care Med 1996; 153: 1431-36.

Mak JCW, Leung HCM, Ho SP, Law BKW, Ho ASS, Lam WK. Analysis of TGFB-1 gene polymorphisms in Hong Kong Chinese patients with asthma. J Allergy Clin Immunol 2006;117(1):92-6.

Massague, J. The Transforming Growth factor-β family. Annu Rev Cell Biol 1990; 6:597-641.

Marsh DG, Meyers DA. – A major gene for asthma fact or fancy? Nat Genet, 1992; 2:252-54.

March DG, Neely JD, Breazeale DR. Linkage analysis of Il4 and other chromosome 5q31.1 markers and total serum immunoglobulin E concentrations. Science 1994; 264: 1152-6.

Migliaccio C, Patuzzo C, Malerba G. No linkage or association of five polymorphisms in the interleukin-4 receptor α gene with atopic asthma in Italian families. Eur J Immunogenet 2003; 30:349-53.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Ações Básicas de Saúde, Estatísticas de Mortalidade. Brasília (DF); 2000.

Minshall EM, Leung D Y, Martin RJ, Song YL, Cameron L, Ernst P. TGFβ1 mRNA expression and airways fibrosis in bronchial asthma. Am J Respir Cell Mol Biol 1997**;** 17: 326-33.

Mitsuyasu H, Izuhara K, Mao XQ. Ile50Val variant of IL4Rα upregulates IgE synthesis and associates with atopic asthma. Nat Genet 1998; 19: 119-20.

Miyazono K, Hellman U, Wernstedt C, Heldin CH. Lattent high molecular weight complex of transforming growth factor β1: Purification from human plateletsand structural characterization. J Biol Chem 1988; 263: 6407-15.

Morton NE. Major loci for atopy? Clin Exp Allergy 1992;22:1041-43.

Nagpal K, Sharma S, B-Rao C, Nahid S, Niphadkar PV, Sharma SK. TGF-β1 haplotypes and asthma in Indian populations 2005; 115: 527-33.

Nakao A. Is TGF β1 the key to suppression of human asthma? Trends Immunol 2001**;** 22: 115-8.

National Heart, Lung and Blood Institute / World Health Organization Workshop. Global Initiative for Asthma (GINA). USA; 1995.p 95- 3659.

Naylor B. - The shedding of the mucosa of the bronchial tree asthma. Thorax 1992; 17:69.

Nelms K, Keegan AD, Zamorano J, Ryan JJ, Paull W. E.The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. Annu Rev Immunol 1999;17:701-38.

Noelle R, Kramme RP, Ohara J, Uhr JW, Vitetta ES. Increased expression of Ia antigens on resting B cells : an additional role for B –cell growth factor. Proc Natl. Acad. Sci. USA 1984; 81: 6149-53.

Noguchi E, Shibasaki M, Arinami T, Takeda K, Yokouchi Y, Kawashima, T et al. Association of Asthma an the interleukin-4 promoter gene in Japanese. Clinical and Experimental Allergy 1998; 28:449-53.

Ober C, Cox N.J, Abney M. – Genome-wide search for asthma susceptibility loci in a founder population: the Collaborative Study on the Genetics of Asthma. Hum Mol Genet 1998; 7:1393-98.

Ober C, Tsalenko A, Parry R, Cox N.J. A second generation genomewide screen for asthma susceptibility alleles in a founder population. Am J Hum Genet 2000; 67: 1154-62.

O´Donnell AR, Taelle BG, Marks GB. Age-specific relationship between CD14 and atopy in a cohort assessed from age eight to twenty-five. Am Resp Crit Care Med 2003; 169: 615-22.

Ogawa E, Ruan J, Connett JE, Anthonisen NR, Pare PD, Sandford AJ. Transforming growth factor -β1 polymorphisms, airway responsiveness and lung finction decline in smokers. Respiratory Medicine 2006; *in press*.

Ohara J, Paul WE. UP-regulation of interleukin 4/B-cell stimulatory factor 1 receptor expression. Proc Natl Acad Sci USA 1988; 85: 8221-25.

Ohara J, Paul WE. Receptors for B cell stimulatory factor 1 expressed on cells of haematopoietic lineage. Nature 1987; 325:537-40.

ohno I, Nitta Y. Transforming growth factor -β1 gene expression by eosinophils in asthmatic airway inflammation. Am J Respir Cell Mol Biol 1996; 15: 404-9.

Orth P, Reichert P, Wang W, Prosise WW, Yarosh-Tomaine T, Hammond G. Crystal structure of the catalytic domain of human ADAM33. J Mol Biol 2004; 335(1): 129-37.

Palmer LI, Daniels SE, Rye PJ. Linkage of chromosome 5q and 11q gene markers to asthma-associated quantitative traits in Australian children. Am J Resp Crit Care Med 1998; 158: 1825-30.

Peden DB, Tucker K, Murphy P. Eosinophil influx to the nasal airway after local, law-level LPS challenge in humans. J Allergy Clin Immunol 1999; 104: 388-94.

Perrey C, Pravica V, Sinnott PJ, Hutchinson IV. Genotyping for polymorphisms in interferon-gamma, interleukin10, transforming growth factor beta 1 and tumor necrosis factor alpha genes: a technical report.Transpl Immunol 1998; 6: 193-7.

Perrey C, Turner SJ, Pravica V, Howell WM, Hutchinson IV. ARMS-PCR methodologies to determine IL-10, TNF-alpha, TNF-beta, and TGF-beta 1gene polymorphisms. Transpl Immunol 1999; 7(2) : 27-8.

Postma DS, Bleecker ER. Genetic susceptibility o asthma bronchial hyperresponsiveness coinherited with a marjor gene for atopy. N Engl J Med 1995; 333: 894-900.

Powell R.M, Wicks J. Holloway J.W, Holgate ST, Davies DE. The splicing and fate of ADAM 33 transcripts in primary human airways fibroblasts. Am J Respir Cell Mol Biol 2004; 31: 13-21.

Pulleyn LJ, Newton R, Adcock IM, Barnes PJ. TGF beta 1 allele association with asthma severity. Human Genet 2001; 109:623-7.

Redington AE, Madden J, Frew AJ. Transforming growth factor β1 in asthma : measurement in bronchoalveolar lavage fluid. Am J Resp Crit Care Med 1997;156 : 642-7.

Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, Mamat U, Schimidt G, Loppnow H, et al.Bacterial endotoxin: molecular retationships and structure to activity and function.FASEB1994; 8: 217-25

Roche WR, Beasley R, Williams JH, Holgate ST. Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. Lancet 1989; 1: 520-4.

Romagnani S. Induction of TH1 and TH2 responses a key role for the natural immune response? Immunol Today 1992; 13: 379-81.

Rosenwasser LJ, Klemm DJ, Dresback JK. Promoter polymorphisms in the crommossome 5 gene cluster in asthma and atopy. Clin Exp Allergy 1995; 2:74-8.

Rosenwasser LJ.The genetics of atopy. Allergy 1998; 53(Suppl. 46):8-11.

Sagara H, Okada T, Okumura K, Ogawa H, Ra C, Fukuda T, et al. Activation of TGF-beta/Smad2 signaling is associated with airway remodeling in asthma. J Allergy Clin Immunol 2002; 110: 249–54.

Sandford A, Weir T, Paré P. The genetics of asthma. Am J Resp Crit Care Med 1996; 153: 1749-65.

Sandford A.J, Paré PD. - The genetics of asthma. Am Resp Crit Care Med 2000; 161 (3): S202-3.

Sears M. R. – The definition and diagnosis of asthma. Allergy 1993; 48:12-16.

Sengler C, Haider A, Sommerfeld C, Lau S, Baldini M, Martinez F. Evaluation of the CD14C-159T polymorphisms in the German Multicenter Allergy Study cohort. Clin Exp Allergy 2003; 33: 166-69.

Senior RM, Connolly NL, Cury JD, Welgus HG, Campbell, EJ. Elastin degradation by human alveolar macrophages: a prominent role of metalloproteinase activity. Am Rev Resp Dis 1989;139 : 1251-56.

Sharma M, Batra J, Mabalirajan U, Goswami S, Ganguly D, Lahkar B. Suggestive evidence of association of C-159T functional polymorphism of the CD14 gene with atopic asthma in northern and northwestern Indian populations. Immunogenetics 2004; 56: 544-47.

Shedel M, Depner M, Schoen C, Weiland SK, Vogelberg C, Niggemann B. The role of polymorphisms in ADAM33, a desintegrin and metalloprotease 33, in childhood asthma and lung function in two German populations. Respiratory Research 2006; 7:91.

Silverman ES, Palmer LJ, Subramaniam V, Hallock A, Mathew S, Vallone J. Transforming growth factor β1 promoter polymorphisms C-509T is associated with asthma. Am J Resp Crit Care Med 2004; 169: 214-19.

Sime PI, Xing Z. Adenovector mediated gene transfer of active transforming growth factor β1induces prolonged severe fibrosis in rat lung. J Clin Invest 1997;100: 768-76.

Sime, PJ, Marr, RA, Gauldie, D, et al Transfer of tumor necrosis factor-α to rat lung induces severe pulmonary inflammation and patchy interstitial fibrogenesis with induction of transforming growth factor-beta1 and myofibroblasts. Am J Pathol 1998**;**153:825-32.

Simpson A, Maniatis N, Jury F, Cakebread JA, Lowe LA, Holgate ST. Polymorphisms in a desintegrin and metalloprotease 33 (ADAM33) predict impaired early-life lung function. Am J Resp Crit care Med 2005; 172:55-60.

Singer AJ, Clark RAF. Cutaneous wound healing. New Engl. J. Med 1999; 341: 738–46.

Skadhauge LR, Christensen K, Kyvik KO, et al. Genetic and environmental influence on asthma: a population-based study of 11 688 Danish twin pairs. Eur Respir J 1999; 13:8–14.

Snapper CM, Hornbeck PV, Atosy U, Pereira GM, Paul WE. Interleukin 4 induces membrane Thy-1 expression on normal murine B cells. Proc Natl Sci USA 1988; 85: 6107-11.

Sociedade Brasileira de Alergia e Imunopatologia, Sociedade Brasileira de Pediatria, Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisologia, Sociedade Brasileira de Clínica Médica. III Consenso Brasileiro no manejo da Asma. J Pneumol 2002; 28(11): S6-S13.

Suthanthiran M, Li B, Song JO et al. Transforming growth factor β1 hyperexpression in African-American hypertensives: a novel mediator of hypertension and/or target organ damage 2000. Proc Natl Acad Sci USA; 97: 3479-84.

Thomas N.S, Wilkinson J, Holgate ST The candidate region approach to the genetics of asthma and allergy. Am J Resp Crit Care Med**,** 1997; 156 (4):S144-51.

Thornhill MH, Wellicoms SM, Mahiouz DL, Lanchbury JS, Kyan-Aung U, Haskard DO, et al. Tumor necrosis factor combines with IL-4 or IFNgamma to selectively ehance endothelial cell adhesives fopr T cells.The contribuition of vascular cell adhesion molecular 1 dependent and independent binding mechanisms. J Immunol 1991; 146:592-98.

Ulevitch RJ, Tobias PS. Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. Ann Rev Immunol 1995; 13: 437-57.

Van Diemen CC, Postma DS, Vonk JM, Bruinenberg M, Schouten JP, Boezen HM. A desintegrin and metalloprotease 33 polymorphisms and lung function decline in the general population. Am J Resp Crit Care Med 2005;172: 329-33.

Van Eerdewegh P, Little RD, Dupuis J, Mastro RG, Falls K, Simon J. et al. Association of the ADAM 33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness. Nature 2002;418 : 426-30.

Vercelli D, Baldini M, Stern D. CD14: a bridge between innate immunity and adaptive IgE responses. J Endotoxin Res 2001; 7:45-8.

Vercelli, D. Innate immunity: sensing the environment and regulating the regulators. Curr Opin Allergy Clin Immunol 2003; 3: 343-6.

Vignola AM, Chanez P, Chiappara G .Transforming growth factor-ß expression in mucosal biopsies in asthma and chronic bronchitis. Am J Respir Crit Care Med 1997;156 : 591-99.

Von Mutius E, Braun-Fahrlander C, Schierl R. Exposure to endotoxin or other bacterial components might protect against the development of atopy. Clin Exp Allergy 2000; 30: 1230-4.

Wakefield LM, Smith DM, Flanders KC, Sporn MB. Latent transforming growth factor-β from human platelets : A high molecular weight complex containing precursor sequences. J Bio Chem 1988; 263: 7646-54.

Walley A, Cookson W. Investigation of an interleukin -4 promoter polymorphism for associations with asthma and atopy. J Med Genet 1996; 33: 689-92.

Werner M, Herbon N, Gohlke H, Altmuller J, Knapp M, Heinrich J, et al. Asthma is associated with single-nucleotide polymorphisms in ADAM33. Clin Exp Allergy 2004; 34(1): 26-31.

Woo J, Assaad A, Heizer A, Bernstein J, Hershey G. The -159 C-T polymorphisms in CD14 is associated with nonatopic asthma and food allergy. J Allergy Clin Immunol 2003; 112: 438-44.

Wjst M, Fischer G, Immervoll T. A genome-wide search for linkage to asthma: German Asthma Genetics Group. Genomics 1999; 58:1-8.

Wojnarowski C, Frischer T, Hofbauer E. Cytokine expression in bronchial biopsies of cystic fibrosis patients with and without acute exacerbation. Eur Respir J 1999;14:1136-44.

Wu L, Chau J, Young R P, Pokorny V, Mills GD, Hopkins R, et al. Transforming growth factor β1 genotype and susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease 2004; 59: 126-9.

Yamada Y, Miyauchi A, Goto J, Takagi Y, Okuizumi H, Kanematsu M, et al. Association of a polymorphism of the transforming growth factor beta 1 gene with genetic susceptibility to osteoporosis in postmenopausal Japanese women. J Bone Miner Res1998; 13: 1569- 76.

Yuyama N, Davies DE, Akaiwaia M, et al. Analysis of novel disease- related genes in bronchial asthma. Cytokine 2000; 19(6):287-96.

Zhang W, Zhang X, Diwen Q, Sandford A , Tan WC. IL-4 receptor genetic polymorphisms and asthma in Asian populations. Respiratory Medicine 2007; 101: 186-90.

Zhao, Y, Shah, DU Expression of transforming growth factor-ß type I and type II receptors is altered in rat lungs undergoing bleomycin-induced pulmonary fibrosis. Exp Mol Pathol 2000; 69: 67-78.

Zhu S, Chan-Yeung M, Becker AB. Polymorphisms of the IL-4, TNF-α and FceRIβ genes and risk of allergic disorders in at risk infants. Am J Respir Crit Care Med 2000; 161: 1655-9.

ANEXOS

CEP, 23/05/06
(Grupo II)

PARECER PROJETO: N° 172/2006 (Este n° deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0119.0.146.000-06

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: **"INVESTIGAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS DOS GENES TGFBETA1, CD14, IL-4, ADAM33 COM A GRAVIDADE DA ASMA ATÓPICA EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES"**
PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Isabel Cristina Jacinto de Faria
INSTITUIÇÃO: Hospital das Clínicas/UNICAMP
APRESENTAÇÃO AO CEP: 10/04/2006
APRESENTAR RELATÓRIO EM: 23/05/07 (O formulário encontra-se no *site* acima)

II - OBJETIVOS

Verificar em uma amostra de pacientes com asma leve, moderada e grave, uma possível associação entre os polimorfismos dos genes TGFbeta1, CD14, IL-4, IL-4Ra, ADAMM33 e a gravidade da asma.

III - SUMÁRIO

Serão analisados 150 pacientes de 7 a 20 anos de idade, do ambulatório de imunologia, alergia e pneumologia da Pediatria/HC. Serão coletados de 10 a 20 ml de sangue para os exames e a pesquisadora fará uso de um questionário de perguntas sobre antecedentes médicos e com relação a família.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

O presente projeto tem metodologia bem definida pelo pesquisador. Os critérios de inclusão e exclusão dos pacientes estão claros e os métodos de avaliação dos diferentes parâmetros a serem analisados estão de acordo com os objetivos do trabalho. As condições de aplicabilidade da metodologia proposta parecem adequadas. Os pacientes incluídos não parecem estar sujeitos a nenhum risco ou dano moral. O Termo de Consentimento está de acordo com os termos da resolução CNS- MS- 196/96 e complementares.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13084-971 Campinas – SP

FONE (019) 3788-8936
FAX (019) 3788-7187
cep@fcm.unicamp.br

restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuizo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na V Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 23 de maio de 2006.

Prof. Dr. Sebastião Araújo
VICE-PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13084-971 Campinas - SP

FONE (019) 3788-8936
FAX (019) 3788-7187
cep@fcm.unicamp.br

Universidade Estadual de Campinas
Departamento de Genética Médica

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLAREIDO

Título do projeto: **Investigação da associação entre os polimorfismos dos genes: TGFβ1, CD14, IL-4, IL-4Ra e ADAM33 com a gravidade da Asma Atópica em crianças e adolescentes.**

OBJETIVO DA PESQUISA:

Eu entendo que fui convidada a participar em um projeto de pesquisa envolvendo indivíduos com asma alérgica. O objetivo geral do estudo é o de estudar o que as pessoas com asma têm de diferente em relação às pessoas que não tem asma.

PROCEDIMENTO:

Eu entendo que se concordar em participar desse estudo, os pesquisadores participantes farão perguntas a respeito dos meus antecedentes médicos e com relação a minha família. Uma amostra de sangue será colhida (10 ml, o equivalente a duas colheres de sopa).

RISCO E DESCONFORTO:

Os riscos e desconforto associados a coleta de sangue são mínimos, podendo ocorrer dor e manchas roxas no local da coleta do sangue. A coleta de sangue geralmente da veia do braço, será realizado por profissional treinado e devidamente habilitado para realizar esse procedimento.

VANTAGENS:

Eu entendo que não obterei nenhuma vantagem direta com a minha participação nesse estudo, mas essa pesquisa auxiliará no aumento de conhecimento a respeito da asma alérgica, doença que afeta 10 a 20% da crianças no mundo.

SIGILO:

O sigilo será mantido em todo o estudo através da utilização de um número de código para a identificação dos indivíduos participantes. Se os resultados ou informações fornecidas forem utilizados para fins de publicação científica, nenhum nome será utilizado.

FORNECIMENTO DE INFORMAÇÃO ADICIONAL:

Qualquer dúvida ou informação poderá contatar a UNICAMP no tel. (19) 3521-8907 (Profa.Dra.Carmen).

Dúvidas ou reclamações deverão ser encaminhadas a secretaria do Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas-UNICAMP, tel. (19) 3521-8936.

RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO:

Eu entendo que a minha participação é **voluntária** e que eu posso me recusar a participar ou sair da pesquisa a qualquer momento sem comprometer os cuidados médicos que recebo atualmente ou receberei no futuro no HC-UNICAMP.

Eu confirmo que o (a) Dr. (a)_____ explicou-me o objetivo do estudo, os procedimentos aos quais serei submetido e os riscos, desconforto advindas desse projeto de pesquisa. Eu li e/ou me foi explicado, assim como compreendi esse formulário de consentimento e estou de pleno acordo em participar desse estudo.

Nome e Rg do participante ou responsável

_____ _____

Assinatura do participante ou responsável Data

RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR:

Eu expliquei a _____

o objetivo do estudo, os procedimentos requeridos e os possíveis riscos que poderão advir do estudo, usando o melhor do meu conhecimento. Eu me comprometo a fornecer uma cópia desse formulário de consentimento ao participante ou responsável.

Nome e RG do pesquisador

_____ _____

Assinatura do pesquisador Data

ARMAZENAMENTO DE DADOS

1. eu concordo com o armazenamento do meu DNA no Banco do Laboratório de Genética Molecular para estudos futuros aprovados pelo CEP da FCM.
2. eu não concordo

_____

Assinatura do participante

Tabela- Caracterização genotípica da amostra dos pacientes

Tipo de Asma	TGFB1 (T869C)	TGFB1 (C-509T)	CD14 (C-159T)	IL4 (C-590T)	IL4Ra (Ile50Val)	ADAM33 (S_2)
G	CC	CT	TT	CT	VAL/VAL	CG
G	CT	CC	CC	CT	VAL/VAL	CG
G	TT	CC	CC	CC	ILE/ILE	GG
G	CC	CT	TT	CC	ILE/VAL	GG
G	CT	CT	CT	CC	ILE/ILE	GG
G	CC	TT	TT	CC	ILE/ILE	GG
G	CT	CT	CT	TT	ILE/VAL	CG
G	TT	CT	CC	TT	ILE/VAL	GG
G	CC	TT	TT	CC	ILE/VAL	GG
G	CC	CC	CC	CC	ILE/ILE	CG
G	CT	CC	CT	CT	ILE/VAL	GG
G	CC	TT	CT	CC	ILE/VAL	GG
G	TT	CC	CC	CT	ILE/VAL	GG
G	CC	CT	CC	CT	ILE/ILE	GG
G	CC	CT	CT	CC	ILE/VAL	CG
G	CC	CT	CT	CC	ILE/VAL	CG
G	TT	CT	CC	CC	ILE/VAL	CG
G	CC	CT	CC	CT	ILE/VAL	GG
G	CT	CC	TT	CT	ILE/VAL	GG
G	TT	CT	TT	CC	ILE/VAL	CC
G	CT	CT	CT	CT	ILE/VAL	CC
G	CC	TT	TT	CT	ILE/VAL	CC
G	CC	TT	CC	CC	ILE/VAL	CG
G	CT	CT	CT	CC	ILE/VAL	CG
G	CT	CT	CT	CC	ILE/VAL	CG
G	TT	CC	CT	CT	ILE/ILE	CC
G	CT	CC	TT	CC	ILE/VAL	GG
G	CT	TT	CC	CC	ILE/VAL	CG

G	TT	CT	TT	CT	ILE/VAL	GG
G	CT	CC	TT	CT	ILE/ILE	CG
G	TT	CC	CT	CT	ILE/ILE	GG
G	CT	CC	CC	CC	ILE/VAL	CC
G	CT	CT	TT	CC	ILE/ILE	CG
M	CT	CC	CC	CT	ILE/VAL	GG
M	CT	CT	CT	CT	ILE/VAL	GG
M	CT	CT	CT	CT	ILE/VAL	CG
L	CT	CT	CT	CC	VAL/VAL	CG
M	TT	CC	CC	CC	ILE/ILE	CG
M	CT	TT	CT	CT	VAL/VAL	CG
M	TT	CT	CT	CT	ILE/ILE	CG
M	TT	TT	TT	CT	VAL/VAL	CG
L	CT	TT	CC	CT	ILE/VAL	CG
G	TT	CC	CT	CT	ILE/VAL	CG
G	TT	CC	CC	CT	ILE/ILE	CG
L	CT	CT	CT	CC	ILE/ILE	CC
M	TT	CT	TT	CC	ILE/VAL	GG
L	CT	CC	TT	CT	VAL/VAL	GG
M	CC	CT	CC	CT	ILE/ILE	CC
G	CT	CC	CT	CC	ILE/VAL	CG
L	CT	CT	CC	CT	ILE/ILE	GG
L	TT	CC	CT	CT	ILE/ILE	CG
L	TT	CC	CT	CC	ILE/VAL	GG
L	CT	CC	CT	CT	ILE/VAL	CC
G	CT	TT	CT	CT	ILE/ILE	CG
M	CT	TT	CT	CC	ILE/VAL	CG
M	CT	CC	TT	CC	ILE/VAL	CG
L	CT	TT	CC	CC	ILE/VAL	CG
L	CT	CC	TT	TT	VAL/VAL	CC
L	CT	CT	CT	CT	VAL/VAL	GG
M	CT	CT	CT	CT	ILE/VAL	CG

L	CT	CC	CC	TT	ILE/VAL	GG
M	CT	CT	TT	CT	ILE/ILE	GG
G	CT	CT	TT	CT	ILE/VAL	GG
M	CT	TT	CT	CT	ILE/VAL	GG
M	CT	TT	CC	TT	VAL/VAL	CG
M	CT	CT	CC	CC	VAL/VAL	CG
M	CT	CT	CC	CC	ILE/VAL	GG
L	CT	CT	CT	CC	ILE/VAL	GG
M	CT	CC	CT	TT	VAL/VAL	GG
M	CT	CC	CT	CC	ILE/VAL	GG
L	CC	CT	TT	CT	VAL/VAL	CG
L	CT	CC	CT	CT	ILE/VAL	GG
L	CT	CC	CT	CC	ILE/VAL	GG
L	CC	CC	CT	CC	ILE/VAL	CG
L	CT	CC	CC	CC	ILE/VAL	GG
L	CT	CT	CC	TT	VAL/VAL	CC
L	TT	CT	CT	TT	VAL/VAL	CC
L	CT	CC	TT	CC	ILE/VAL	CG
L	TT	CT	CT	CT	VAL/VAL	GG
M	CT	CT	CC	CC	ILE/VAL	CG
M	CT	CT	CT	CC	ILE/ILE	GG
L	CT	CT	CT	CT	ILE/VAL	GG
M	CT	CC	CC	CT	ILE/VAL	GG
L	CT	CC	CT	TT	ILE/ILE	CG
M	CT	CT	CT	CC	ILE/VAL	CG
L	CT	CT	CT	CT	VAL/VAL	GG
L	CT	CT	CT	CT	ILE/VAL	CG
L	CT	CT	CC	CT	ILE/VAL	GG

As distribuições genotípicas iguais entre os pacientes tiveram um destaque semelhante.