



**Universidade Federal da Bahia**  
**Instituto de Ciências da Saúde**  
**Programa de Pós-graduação em Imunologia**



**HÉLLEN FREITAS FONSECA**

**IMPACTO DE POLIMORFISMOS NO GENE DA IL-10 EM  
DIFERENTES FENÓTIPOS DE ASMA E ATOPIA**

Salvador, BA

2017

**HÉLLEN FREITAS FONSECA**

**IMPACTO DE POLIMORFISMOS NO GENE DA IL-10 EM  
DIFERENTES FENÓTIPOS DE ASMA E ATOPIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em  
Imunologia, da Universidade Federal da Bahia como requisito  
parcial para obtenção do título de Mestre em Imunologia.

Orientadora: Profa. Dra. Camila Alexandrina Figueiredo.

Co-orientador: Prof. Dra. Ryan dos Santos Costa.

Salvador, BA

2017

Dedico este trabalho a Deus e a minha família, que sempre me deu forças e incentivo para buscar os meus sonhos através dos estudos.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela dádiva da vida, pelas grandes oportunidades e caminhos que ele tem me guiado; por me fazer persistir na busca dos meus objetivos mesmo diante das dificuldades; por sempre se fazer presente mesmo quando eu pensava estar sozinha;

A minha amada mãe, pelos ensinamentos sobre a vida, pelo amor e incentivo que sempre tem me dado; a toda minha família pelo carinho e motivação principalmente nesses últimos dois anos;

À Universidade Federal da Bahia pela oportunidade de crescimento acadêmico;

Ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia pelo aperfeiçoamento acadêmico; aos mestres e doutores pelo conhecimento compartilhado;

A minha orientadora Dr<sup>a</sup> Camila Alexandrina Figueiredo por quem tenho grande respeito e admiração, agradeço por ter confiado em mim e na minha capacidade no andamento deste trabalho; pela dedicação com a pesquisa, pelo comprometimento e atenção que tem dado a mim e seus alunos;

A meu co-orientador Dr<sup>a</sup> Ryan dos S. Costa pelo exemplo de profissional e ser humano, pela generosidade em compartilhar conhecimentos durante esses anos e pela grande contribuição neste trabalho.

Ao projeto ProAR, bem como professores, colaboradores envolvidos, e a todos os pacientes sem os quais este trabalho não seria possível, em especial ao Prof.Dr. Álvaro Cruz.

Aos meus grandes amigos Anaque, Raimon, Gerson e Hugo pelo carinho e amizade nesses anos de convivência, pela troca de conhecimento e aprendizado sobre a vida;

As minhas amigas-irmãs, Norma e Tamires, com quem eu pude dividir a bancada e a vida; obrigada por se fazerem presentes em momentos difíceis, pelos inúmeros momentos de alegria e pela contribuição neste trabalho;

As colegas e amigas Bianca, Icanaã, Talita e Milca que colaboraram grandemente com parte da execução e elaboração deste trabalho e pela amizade;

A meu namorado, Túlio, pelo carinho e incentivo durante esses anos;

À Dilcea, Juci e Aline pela competência e disponibilidade em nos ajudar sempre;

À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado.

À FAPESB pelo suporte financeiro na aprovação e execução deste projeto.

## RESUMO

Evidências sugerem um potencial papel da citocina imunoreguladora IL-10 numa variedade de doenças humanas, incluindo a asma. Esta citocina exerce um papel importante na regulação da atividade dos principais subtipos celulares e citocinas diretamente envolvidas nas reações alérgicas. Nesta perspectiva, polimorfismos (SNPs) no gene da IL-10 podem afetar a produção desta citocina implicando na ocorrência de asma e atopia. O objetivo deste estudo foi investigar o impacto de polimorfismos no gene da IL-10 sobre os níveis de produção da citocina, e associá-los a atopia e aos diferentes fenótipos de asma em adultos asmáticos. Para isso, foi extraído DNA do sangue periférico de 1.406 indivíduos participantes de um estudo caso-controle do Núcleo de Excelência em Asma da Bahia e as amostras foram genotipadas por TaqMan®. Testamos possíveis associações entre SNPs da IL-10 com asma, citocina e teste cutâneo (SPT), utilizando, para tanto, regressões logísticas ou lineares quando apropriadas, ajustadas por sexo, idade, cor da pele e infecções helmínticas utilizando o software PLINK 1.9. Os níveis de IL-10 no plasma foi significativamente maior ( $p < 0.0001$ ) em asmáticos atópicos tratados com glicocorticóides e beta 2 adrenérgicos comparados a indivíduos saudáveis. As concentrações de IL-10 plasmáticas foram associadas positivamente com o alelo C para o SNP rs3024496 ( $\beta = 0.58$ ;  $p = 0,03$ ) em modelo aditivo assim como no modelo recessivo ( $\beta = 1.21$ ;  $p = 0,02$ ) e positivamente associado ao alelo C do SNP rs1878672 ( $\beta = 1,53$ ;  $p = 0,04$ ) e o alelo T do SNP rs3024491 ( $\beta = 1,55$ ;  $p = 0,03$ ). Nenhum dos marcadores avaliados foram associados com asma e atopia. Dessa forma, nossos dados mostraram uma forte associação de variantes genéticas em IL-10 com os níveis de IL-10 produzidos mas não com asma e marcadores de alergia em uma população brasileira.

**Palavras- chave:** Asma; atopia; polimorfismos; IL-10; SPT.

## ABSTRACT

Evidences in literature suggest a potential role of the IL-10 immune regulatory cytokine in a variety of human diseases, including asthma. It plays an important role in the activity of the major cellular subtypes and cytokines directly involved in allergic reactions. In this perspective, polymorphisms (SNPs) in *IL10* could affect the production of this cytokine leading to the occurrence of asthma and atopy. The aim of this study was to investigate the impact of polymorphisms in the IL-10 gene on cytokines production, and to associate them with atopy and different asthma phenotypes in asthmatic adults. To this end, DNA was extracted from peripheral blood of 1,406 individuals and the samples were genotyped by TaqMan®. We tested for associations between *IL10* SNPs with asthma, cytokines and skin test (SPT). Logistic or linear regressions were performed, when appropriated, adjusted by sex, age and skin color using PLINK 1.9 software. Plasma IL-10 levels were significantly higher ( $p < 0.0001$ ) in atopic asthmatics compared to healthy subjects. Plasma IL-10 concentrations were positively associated with the C allele for the SNP rs3024496 ( $\beta = 0.58$ ;  $p = 0.03$ ) in the additive model as well as for the recessive model ( $\beta = 1.21$ ;  $p = 0.02$ ) and positively associated with the C allele for the SNP rs1878672 ( $\beta = 1.53$ ,  $p = 0.04$ ) and the allele T for SNP rs3024491 ( $\beta = 1.55$ ,  $p = 0.03$ ). None of the markers evaluated were associated with asthma and allergy. Thus, our data showed a strong association of genetic variants in IL-10 with IL-10 levels produced but not with asthma and markers of allergy in a Brazilian population.

**Key words:** Asthma; atopy; polymorphisms; IL-10; SPT

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Prevalência de asma no mundo	15
Figura 2. Quadro de classificação da intensidade das exacerbações em crianças e adultos	19
Figura 3. Immunopatogênese da asma	25
Figura 4. Estrutura da IL-10 e seu receptor	27
Figura 5. Funções da interleucina-10 que são relevantes para alergia e asma	30
Figura 6. Quadro dos níveis de controle da asma	33
Figura 7. A via alérgica e potenciais pontos de intervenção	35
Figure 8. Expressão da IL-10 em sangue total para cada genótipo de IL-10 segundo o Gtex	48
Figura 9. Concentrações de IL-10 no plasma de acordo com os fenótipos de asma	49
Figura 10. Concentrações de IL-10 no plasma de acordo com atopia	50
Figura 11. Produção de IL-5 and IL-12 entre indivíduos saudáveis e pacientes com asma atópica em sobrenadante de cultura em sangue total	51
Figura 12. Razão entre os níveis de IL-5 /IL-10 produzidos em sobrenadante de cultura entre indivíduos saudáveis e pacientes atópicos	52
Figura 13. Razão entre os níveis de IL-12 /IL-10 produzidos em sobrenadante de cultura sem estímulo entre indivíduos saudáveis e pacientes asmáticos atópicos	52
Figura 14. Níveis de IL-10 no plasma entre os grupos de indivíduos saudáveis e pacientes asmáticos, de acordo com tratamento e status da asma	53
Figura 15. Representação do bloco de haplótipos formados pelos quatro SNPs, mostrando um alto desequilíbrio de ligação entre eles.	55

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Células inflamatórias em vias aéreas asmáticas	23
Tabela 2. Características da população segundo os fenótipos de asma e variáveis incluídas neste estudo	43
Tabela 3. Caracterização dos SNPs estudados no gene da IL-10	44
Tabela 4. Frequência dos genótipos para cada SNP na população estudada	45
Tabela 5. Associação entre SNPs da IL 10 e fenótipos de asma utilizando regressão logística ajustada por sexo, idade, cor da pele e infecções helmínticas	46
Tabela 6. Associação entre os SNPs da IL-10 e os níveis plasmáticos da citocina em modelo aditivo e recessivo. Regressão linear ajustada por sexo, idade, cor da pele e infecção helmíntica.	47



## LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

CI: Intervalo de confiança (confidence intervals)

DNA: Ácido desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic acid)

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

FcεRI: Receptor de alta afinidade para IgE

FcεRII: Receptor de baixa afinidade para IgE

FEV1: Volume expiratório forçado no primeiro segundo

GINA : Iniciativa Global Contra a Asma (Global Initiative for Asthma)

GWAS: Estudo de Associação Ampla do genoma (Genome Wide Association Studies)

ICS : Corticosteróides Inalatórios

Ig: Imunoglobulina (Immunoglobulin)

IL: Interleucina (Interleukin)

IL-10/ *IL10*: Interleucina 10

ILC2s: Células linfoides inatas tipo 2

LABA: Beta-2 agonistas de longa ação

LD: Desequilíbrio de ligação (Linkage disequilibrium)

MAF: Alelo de menor frequência (minor allele frequency)

MIF: Mediana da intensidade de fluorescência

OR: Razão de chances (Odds ratio)

ProAR: Programa para o controle da Asma e da Rinite Alérgica na Bahia (Program for Asthma and Allergic Rhinitis Control in Bahia)

SCAALA: Mudanças sociais asma e alergia na América Latina (Social Changes Asthma and Allergy in Latin America)

SNP: Polimorfismo de nucleotídeo único (single-nucleotide polymorphisms)

SPT: Teste cutâneo (Skin Prick Test)

Th: Células T auxiliares (T helper)

Treg: Células T regulatórias

WAO: Organização Mundial da Alergia (World Allergy Organization)

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b>	11
2	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	13
2.1	Epidemiologia da asma e doenças alérgicas	13
2.2	Fisiopatologia da asma e atopia	17
2.3	Mecanismos imunológicos envolvidos na asma e atopia	21
2.4	Importância da IL-10 na asma e atopia	25
2.5	Impacto dos Polimorfismos no gene da IL-10	31
2.6	Tratamentos e intervenções	32
3	<b>HIPÓTESE E OBJETIVOS</b>	38
3.1	Hipótese	38
3.2	Objetivo Geral	38
3.3	Objetivos Específicos	38
4	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	39
4.1	População de estudo	39
4.2	Coleta de sangue total	39
4.3	Aplicação do teste cutâneo	40
4.4	Mensuração de citocinas por ELISA	40
4.5	Extração de DNA e genotipagem	41
4.6	Análise de expressão <i>in silico</i> usando a plataforma GTEX	41
4.7	Análises estatísticas	42
5	<b>RESULTADOS</b>	43
6	<b>DISCUSSÃO</b>	54
7	<b>CONCLUSÃO</b>	59
8	<b>REFERÊNCIAS</b>	60

## 1 INTRODUÇÃO

As doenças alérgicas, tal como a asma alérgica representa um relevante problema global de saúde pública, sendo a doença inflamatória crônica mais prevalente em todo mundo afetando cerca de 300 milhões de pessoas em todo o mundo. As crises de asma constituem as causas mais frequentes de hospitalizações na infância e são responsáveis por altos gastos para os serviços públicos de saúde. As doenças alérgicas mostram uma complexa associação genética e um forte componente hereditário (Hawrylowicz and O'Garra 2005). Entretanto, o aumento na incidência dessas doenças reflete os efeitos das mudanças ambientais e a influência do estilo de vida ocidental.

A asma é uma síndrome ainda mais complexa com fenótipos variados, mecanismos biológicos diversos e múltiplas causas, envolvendo fatores ambientais e individuais (Wenzel 2006; Anderson 2008). A avaliação da influência dos fatores genéticos no desenvolvimento dos diferentes fenótipos da asma têm crescido nas últimas décadas. Estudos de varredura genômica (GWAS) e de genes candidatos têm demonstrado que a presença de alguns fenótipos possa ser hereditária e cerca de 200 genes têm sido associados com asma ou fenótipos relacionados. As alterações de um único nucleotídeo (SNP- Polimorfismos de Nucleotídeo Único) podem ocorrer por todo o genoma e influenciam na suscetibilidade a doenças podendo-se inferir sua relação com os fenótipos de determinada enfermidade (Koberle, Koch et al. 2016).

Evidências sugerem um potencial papel da citocina imunoreguladora Interleucina-10 (IL-10) numa variedade de doenças humanas, incluindo a asma e outras condições alérgicas. As propriedades anti-inflamatórias fazem da IL-10 uma citocina atrativa para o controle das respostas alérgicas e asmáticas. Esta exerce efeitos pleiotrópicos na asma atópica, apresentando um papel importante na diminuição da inflamação alérgica através da inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , assim como as citocinas diretamente associadas com inflamação alérgica, incluindo IL-4 e IL-5.

O gene da IL-10 está localizado no cromossomo 1q32.1, contém 5 exóons e 4 íntrons e apresenta vários sítios polimórficos dentro da região promotora. Em estudos de associação genética, variações nos genes que codificam proteínas

envolvidas no desenvolvimento e função das células Treg tal como a IL-10 foram previamente associados a atopia e fenótipos de asma e níveis alterados da citocina.

Diante da frequência elevada da doença, urge que sejam elucidadas novas vias imunopatológicas, especialmente na asma grave, para que sejam avaliadas intervenções preventivas racionais em larga escala, reduzindo os custos do tratamento e os riscos de uso continuado de medicações. Apesar de correntes terapias incluírem intervenções farmacológicas para a melhoria dos sintomas das doenças alérgicas, estudos evidenciam que uma eficaz terapia de dessensibilização de alérgenos pode ocorrer através da indução de células Treg secretoras de IL-10 (Hawrylowicz and O'Garra 2005).

Dentro do contexto complexo das doenças alérgicas e a forte relação de fatores genéticos com a funcionalidade da IL-10 e sua associação com asma e a atopia, inclusive já descrito em estudos anteriores, em populações brasileiras mas não sendo explorado a gravidade da asma e um amplo quadro de marcadores de alergia, justifica-se o presente trabalho que investigou o impacto dos polimorfismos da *IL10* e os níveis da citocina com a gravidade da asma e marcadores de atopia em pacientes acompanhados pelo Programa para o controle da Asma e da Rinite Alérgica na Bahia (ProAR), uma vez que consideramos essa associação relevante para o entendimento de como esses fatores regulatórios podem estar relacionados à asma e outras alergias, sendo essencial para a compreensão da patogênese destas doenças.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Epidemiologia da asma e doenças alérgicas

As doenças alérgicas que afetam o trato respiratório superior e inferior, tais como a rinite alérgica e asma alérgica, são as doenças inflamatórias crônicas mais prevalentes, estima-se afetar mais de 300 milhões de pessoas nas mais diversas zonas geográficas do mundo (Pearce, Ait-Khaled et al. 2007; Ait-Khaled, Pearce et al. 2009). Essa prevalência tem aumentado em muitas partes do mundo ao longo das últimas décadas, e, até recentemente, vem crescendo em uma base de ano após ano nos países ocidentais desenvolvidos e em desenvolvimento, principalmente em áreas urbanas, representando um problema de saúde pública mundial (Yazdanbakhsh, Kremsner et al. 2002; Pearce, Ait-Khaled et al. 2007; Wang, Xiao et al. 2013). A previsão da Organização Mundial da Alergia (WAO, World Allergy Organization) é que o número de asmáticos chegue a 400 milhões em todo o mundo, em 2025. (Simons, Arduzzo et al. 2011)

A causa para essa epidemia permanece inconsistente, investigações epidemiológicas recentes tem incidido sobre as alterações na dieta materna durante a gravidez, em particular sobre os níveis de micronutrientes, microbiota das vias aéreas e intestinal, entre outros fatores (Jackson, Hartert et al. 2014). O próprio estilo de vida ocidental, nas últimas décadas tem sido associado com complexas mudanças ambientais, comportamentais, e dietéticas, as quais têm sido apontadas como aspectos importantes na etiologia da asma e outras doenças alérgicas (Sole, Camelo-Nunes et al. 2006). Além disso, há uma um forte componente hereditário para essas doenças, e estudos de associação ampla do genoma tem identificado variações em diversos genes que podem aumentar o risco de tais doenças (Martinez and Vercelli 2013).

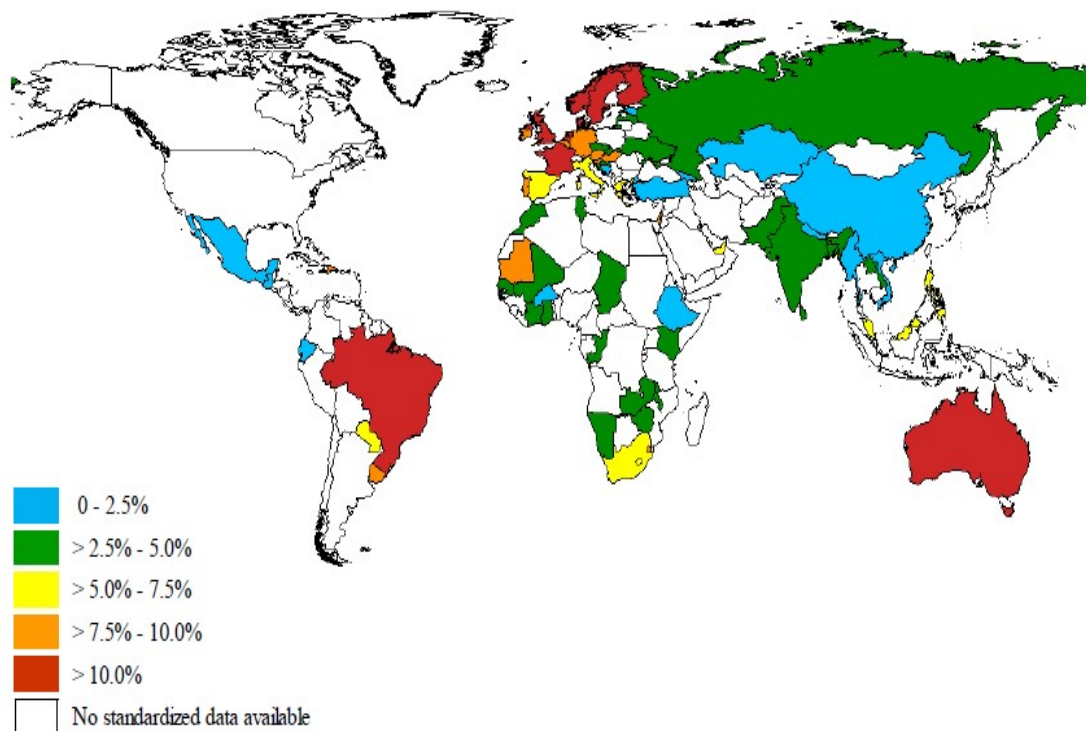
Segundo a GINA (Global Initiative for Asthma) apesar das centenas de relatórios sobre a prevalência de asma em populações muito diferentes, a falta de uma definição precisa e universalmente aceita da asma torna problemática as comparações de prevalência relatada a partir de diferentes partes do mundo (Bousquet, Clark et al. 2007; O'Byrne 2010)

A definição de asma baseada unicamente no diagnóstico médico pode ser útil em alguns contextos clínicos nos países desenvolvidos; No entanto, nos países em

desenvolvimento pode variar muito dependendo do contexto, disponibilidade e acesso a cuidados de saúde e medicamentos. Uma combinação de diagnóstico e / ou tratamento para asma pode classificar com mais precisão indivíduos com asma ativa. Uma vez que o diagnóstico e a disponibilidade de tratamento podem ser desafiadores em países com poucos recursos, uma definição mais ampla que inclua sintomas respiratórios, além do diagnóstico e tratamento recebidos, pode gerar uma maior sensibilidade na identificação de indivíduos com asma.

A figura 1 representa a prevalência de asma no mundo baseada em três definições de asma, aplicadas por meio de instrumentos padronizados. A primeira definição foi baseada na pergunta "Você já foi diagnosticado com asma?"; a segunda definição de asma clínica se baseou em asma diagnosticada pelo médico e / ou uma resposta positiva em qualquer uma das duas perguntas "Você já foi tratado para a asma" ou "Você tem tomado qualquer medicação ou tratamento para a asma durante as últimas 2 semanas?"; a terceira definição, considerou os sintomas de asma clínica, diagnosticados pelo médico e / ou uma resposta positiva a "Durante os últimos 12 meses você teve ataques de respiração ofegante ou assobiando?". As perguntas do Inquérito Mundial à Saúde foram semelhantes aos utilizados pelos inquéritos ISAAC (International Study of Asthma Allergies in Childhood) e ECRHS (1998; Pearce, Sunyer et al. 2000). A população de estudo foi limitada a indivíduos com idade entre 18 a 45 anos (To, Stanojevic et al. 2012).

A prevalência de asma diagnosticada pelo médico variou amplamente entre os 70 países participantes, variando de 0,2% na China a 21,0% na Austrália. Os cinco países com maior prevalência de asma clínica foram Austrália (21,5%), Suécia (20,2%), Reino Unido (18,2%), Holanda (15,3%) e Brasil (13,0%). (Figura 1).(To, Stanojevic et al. 2012)



**Figura 1.** Prevalência de asma no mundo.

**Fonte:** To et al. Global asthma prevalence in adults: findings from the cross-sectional world health survey. *BMC Public Health*, 2012.

Na América Latina, a aplicação do ISAAC demonstrou uma alta prevalência de asma e sintomas relacionados, assim como a descrita para países industrializados ou regiões desenvolvidas do mundo. A maior prevalência de asma entre as crianças latinas é não atópica e tem sido associada a precárias condições de higiene, estresses psicossociais, obesidade e qualidade da dieta (Cooper, Rodrigues et al. 2012).

No Brasil, 20% da população é afetada pela asma e esta é causa de cerca de 350.000 internações por ano (Ponte, Franco et al. 2007; Cooper, Rodrigues et al. 2009). Um estudo transversal realizado com 109.104 escolares do 9º ano (8ª série) do ensino fundamental de escolas públicas e privadas de todos os estados brasileiros e do Distrito Federal apontou uma maior prevalência de sintomas de asma nas cidades de Salvador (BA) (24,6%) e Vitória da Conquista (BA) (30,5%), sendo a prevalência média entre os adolescentes brasileiros próxima de 20% (Barreto, Ribeiro-Silva Rde et al. 2014).



Além disso, dados do SCAALA (*Social Changes, Asthma and Allergy in Latin America*) mostram que, em Salvador, a maior parte da ocorrência da asma é persistente, com alta prevalência de sibilância entre as crianças (Simoès, Cunha et al. 2010). O número de internações e de atendimentos em emergência é relevante e pode sofrer redução significativa com atenção e cuidados específicos em programas de controle de asma (Brandão, Cruz et al. 2009).

Em um estudo desenvolvido por nosso grupo na cidade de Salvador, foram encontradas prevalências de alergias respiratórias de 32% em adultos de classe baixa e 45% em adultos de classe média alta nesta cidade (Baqueiro, Pontes-de-carvalho et al. 2007). Em crianças de classes baixas, foi encontrada prevalência de 22% de sintomas de asma (Rodrigues, Newcombe et al. 2008). Essa perspectiva sinaliza as doenças alérgicas, incluindo a asma, como importantes problemas de saúde pública para Salvador.

## 2.2 Fisiopatologia da atopia e asma

O termo atopia foi utilizado pela primeira vez em 1920 por Arthur Fernández Coca e Robert Anderson Cooke, e significa "doença estranha", foi utilizada por Coca para descrever reações antigênicas específicas com aparente especificidade imunológica, para as quais não foi possível identificar anticorpos precipitantes no plasma. O fator plasmático que conferiu hipersensibilidade foi rotulado posteriormente de IgE (Oettgen and Geha 1999).

A produção de IgE é fortemente regulada e envolve uma rede complexa de sinais celulares e moleculares. A produção de IgE representa apenas uma característica de uma resposta imune específica maior orquestrada pelo subconjunto de células Th2 CD4 + que são críticas para manter tanto o estado de inflamação crônica e recidivante predominante nos eosinófilos como as respostas de hipersensibilidade agudas características das doenças atópicas (Royer, Varadaradjalou et al. 2001; Barnes 2011).

Na medicina clínica, as reações de hipersensibilidade imediata são comumente chamadas de alergia ou atopia e no trato respiratório as manifestações patológicas e clínicas incluem edema de mucosa, infiltrado de leucócitos com abundantes eosinófilos, secreção de muco, aumento da permeabilidade vascular, broncoconstrição, tosse, espirros e dificuldade respiratória (Abbas and Lichtman 2012).

Os testes cutâneos (SPT) são a principal ferramenta de diagnóstico para determinar o estado atópico de um paciente. São simples e de rápida execução, e tem um baixo custo e alta sensibilidade. Os resultados ótimos dependem da utilização de extratos de alérgenos e sobre a habilidade do técnico executor (Bernstein, Li et al. 2008). A escolha do painel de alérgenos dependerá do contexto local. A medição de IgE alérgeno-específica no soro é mais custosa e geralmente menos sensível para identificar a sensibilização aos alérgenos inalados (Bernstein, Li et al. 2008). A medição da IgE total no soro não tem valor como teste diagnóstico para atopia, e uma IgE total normal não exclui alergia clínica.

Alérgenos e alguns patógenos têm sido implicados no agravamento da asma. A atopia é considerada um importante fator de risco para a asma nas sociedades em desenvolvimento e sua prevalência tem aumentado significativamente nas últimas

décadas em decorrência das mudanças de exposições ambientais como dietas, poluição, exposições a alérgenos e, inclusive melhoria dos hábitos de higiene.

A asma é uma condição heterogênea, que surge por diferentes causas e vias associadas a uma complexa base genética (Kabesch, Depner et al. 2007; Moffatt, Kabesch et al. 2007; Liang, Wang et al. 2013), envolvendo fatores ambientais e individuais. De acordo com a Iniciativa Global Contra a Asma (GINA), a asma é definida como uma inflamação crônica das vias aéreas, de perfil heterogêneo, caracterizada tipicamente por inflamação eosinofílica, grande produção de muco e remodelamento da parede das vias aéreas, que resulta em uma série de apresentações clínicas como sibilos, dispnéia, aperto torácico e tosse que variam ao longo do tempo quanto a sua ocorrência, frequência e intensidade com limitação variável ao fluxo aéreo expiratório (O'Byrne, Pedersen et al. 2009).

Outras alterações, incluindo hipertrofia e hiperplasia do músculo liso, elevação no número de células caliciformes, aumento das glândulas e vasos sanguíneos submucosos e alteração no depósito/degradação dos componentes da matriz extracelular, são constituintes do remodelamento que interfere na arquitetura da via aérea podendo levar à irreversibilidade da obstrução brônquica nos casos graves e de longa evolução (de Prost, Costa et al. 2013).

A asma é muitas vezes acompanhada de co-morbidades, incluindo alergias multi-órgãos, tais como rinite alérgica, conjuntivite, dermatite atópica e alergia alimentar, bem como desordens não-alérgicas, tais como a obesidade, o refluxo gastro-esofágico e condições psiquiátricas (Ledford and Lockey 2013).

A abordagem clínica classifica os fenótipos da asma com base em uma riqueza de experiência em históricos de pacientes, sintomas, técnicas de diagnóstico e respostas ao tratamento (Siroux and Garcia-Aymerich 2011). Segundo o III Consenso Brasileiro no Manejo da Asma e a GINA, a asma se categoriza em diferentes níveis de intensidade das exacerbações em adultos e crianças (Leve, moderada, Grave, Muito grave), como exibido na figura 2

Achado <sup>a</sup>	Intensidade das exacerbações		
	Leve a moderada	Grave	Muito grave (insuficiência respiratória)
Impressão clínica geral	Sem alterações	Sem alterações	Cianose, sudorese, exaustão
Estado mental	Normal	Normal ou agitação	Agitação, confusão, sonolência
Dispneia	Ausente ou leve	Moderada	Intensa
Fala	Frases completas	Frases incompletas	Frases curtas ou monossilábicas.
		No lactente: choro curto, dificuldade alimentar	No lactente: dificuldade alimentar
Musculatura acessória <sup>b</sup>	Retrações leves/ausentes	Retrações acentuadas	Retrações acentuadas
Sibilância	Ausentes com MV normal, localizados ou difusos	Localizados ou difusos	Ausentes com MV diminuído
FR, ciclos/min <sup>c</sup>	Normal ou aumentada	Aumentada	Aumentada
FC, bpm	≤ 110	> 110	> 140 ou bradicardia
PFE, % previsto	> 50	30-50	< 30
SpO <sub>2</sub> , %	> 95	91-95	≤ 90
PaO <sub>2</sub> , mmHg	Normal	Ao redor de 60	< 60
PaCO <sub>2</sub> , mmHg	< 40	< 45	≥ 45

MV: murmúrio vesicular. <sup>a</sup>A presença de vários parâmetros, mas não necessariamente de todos, indica a classificação geral da crise. <sup>b</sup>Músculos intercostais, fúrcula ou esternocleidomastoideo. <sup>c</sup>FR em crianças normais: < 2 meses, < 60 ciclos/min; 2-11 meses, < 50 ciclos/min; 1-5 anos, < 40 ciclos/min; 6-8 anos, < 30 ciclos/min; e > 8 anos, igual a FR para adultos. Fontes: Global Initiative for Asthma, Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia e Turner.<sup>(4-6)</sup>

**Figura 2.** Quadro de classificação da intensidade das exacerbações em crianças e adultos.

**Fonte:** Diretrizes da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia para o Manejo da Asma – 2012. Jornal Brasileiro de Pneumologia. 2012;38(supl.1):S1-S46.

Essas classificações se destinam a um estadiamento da doença, com vistas ao planejamento terapêutico, uma vez que os estudos que se propõem a avaliar medicações estabelecem o grau de comprometimento que estão avaliando.

A hiperresponsividade das vias aéreas é uma das principais características da asma, pois se refere à capacidade do brônquio de sofrer estreitamento em resposta a estímulos. O músculo liso das vias respiratórias medeia à contração e o estreitamento do lúmen dos brônquios. A IL-13, presente na resposta Th2, além de aumentar a produção de muco também promove um fenótipo mais contrátil do músculo liso na via aérea (Lauzon and Martin 2016). Medidas de função pulmonar, especialmente o valor em porcentagem do volume expiratório forçado no primeiro segundo (FEV1), que reflete a condição da capacidade pulmonar, constitui-se ferramenta fundamental para categorizar a asma grave (Moore, Meyers et al. 2010)

Um outro fenótipo de asma não citado na figura 2 aborda a asma de difícil tratamento (DTA). Asma crônica grave, asma dependente de esteróides, asma difícil

de controlar e asma refratária são algumas dessas terminologias (Currie, Douglas et al. 2009). Podem ser divididas em etiologias genuínas e não-genuínas. Causas não genuínas podem ser ainda divididas em três categorias: (1) Diagnóstico errado, onde o problema não é asma brônquica para começar, mas outra patologia do sistema respiratório que não é devidamente tratada, ex: Bronquiectasias, tumores endobrônquicos e disfunção de cordas vocais (Lee, Haselkorn et al. 2007). (2) comorbidades que piora a asma brônquica e dificulta o seu manejo ex: sinusite crônica, doença gastroesofágica, síndrome da apnéia do sono e insuficiência cardíaca congestiva (ICC) (Irwin, Curley et al. 1993). E (3) fatores confundidores, ex: a não adesão ao tratamento, a presença de alérgenos em casa ou no trabalho e problemas psicossociais tornando a asma difícil de tratar.

Depois das causas “não verdadeiras” restam os pacientes asmáticos que têm um problema real de não responder à terapia com esteróides (o tipo genuíno)(Sadatsafavi, Rousseau et al. 2014). Os pacientes podem diferir no grau deste fenômeno de "falta de resposta a esteróides". Alguns deles podem ter o status de resistência "pseudo-esteróide", que é devido a outras condições coexistentes, outros não respondem adequadamente a altas doses de esteróides inalados, mas precisarão de terapia oral contínua para mostrar uma resposta razoável (Smits and Letz 2007). O mecanismo de resistência aos esteróides é desconhecido, mas é possível que anormalidades no número de receptores de glicocorticóides, ou anomalias no complexo glicocorticóide-receptor de glicocorticóide sejam provavelmente responsáveis pela fraca resposta à terapêutica com corticosteróides nestes doentes (Sher, Leung et al. 1994; Adcock, Lane et al. 1995).

A asma de difícil tratamento tem uma carga mais significativa em termos de despesas relacionadas com a saúde, diminuição da produtividade e qualidade de vida reduzida para os pacientes (Sullivan, Rasouliyan et al. 2007). Embora estes doentes façam cerca de 5-10% de todos os asmáticos, eles respondem por cerca de 50% do custo total da terapia de asma (Chen, Blanc et al. 2008).

Apesar de ser considerada uma doença tradicionalmente alérgica, uma parcela considerável dos indivíduos asmáticos não reagem ao teste cutâneo(SPT) (Strina, Barreto et al. 2014). A asma atópica e não atópica refletem fenótipos clínicos distintos, embora apresentem semelhanças imunopatológicas. A idade, a idade de início da asma e a proporção entre mulheres e homens foram maiores nos asmáticos não atópicos do que nos asmáticos atópicos. A asma de caráter não

atópico está associada a quadros de sintomas mais exacerbados e têm sido relacionados a fenótipos com inflamação neutrofílica das vias aéreas. A interleucina-17 (IL-17), uma citocina regulada positivamente nas vias aéreas de alguns pacientes asmáticos, parece ser responsável pela ativação e recrutamento de neutrófilos (Murcia, Vargas et al. 2016). Asma associada à produção de IL-17 e a presença predominante de neutrófilos é geralmente caracterizada por uma maior gravidade, obstrução do fluxo de ar e resistência aos esteróides (Yang, Jiang et al. 2016)

### 2.3 Mecanismos imunológicos envolvidos na asma e atopia

O espectro clínico da asma é altamente variável, possivelmente, devido a diferentes padrões celulares e mediadores celulares envolvidos, dentre eles mastócitos, eosinófilos, linfócitos T, células dendríticas, macrófagos, neutrófilos, células epiteliais, assim como citocinas e quimiocinas por elas produzidas (Bel 2004; Wenzel 2012). A depender dos mediadores e subtipos celulares envolvidos a asma pode apresentar fenótipos diferenciados podendo implicar não apenas na gravidade dos sintomas, mas também na resposta ao tratamento.

O padrão característico de inflamação que se encontra em outras doenças alérgicas também é visto na asma alérgica (atópica): ativação de mastócitos, aumento do número de eosinófilos ativados, e aumento do número do receptor de células T e linfócitos T helper 2 (Th2), que liberam mediadores que contribuem para os sintomas (Barnes 2011). A asma alérgica está associada geralmente à sensibilização alérgica definida por um aumento da produção de anticorpos IgE alérgeno- específico e/ou um teste cutâneo positivo para as (lipo) proteínas de alérgenos comuns ao ambiente inalados ou ingeridos, tais como ácaros, pêlos de animais, baratas, esporos de fungos ou plantas, induzindo um aumento da resposta Th2 com a participação notável de basófilos e eosinófilos (Lambrecht and Hammad 2015). IgE medeia às reações alérgicas e tem um papel central na fisiopatologia da asma atópica, uma vez que está presente na resposta alérgica de fase precoce e tardia (Samitas, Delimpoura et al. 2015).

De forma geral, a imunopatologia das doenças atópicas, se inicia logo após a primeira exposição ao alérgeno, onde as células T *naïve* mudam o seu fenótipo para

o subgrupo de linfócitos CD4+ do tipo T *helper* 2. Conseqüentemente, citocinas que estão relacionadas com a inflamação alérgica, incluindo a interleucina-4 (IL-4), IL-5, IL-9 e IL-13 (Till, Durham et al. 1997; Barnes 2008) são produzidas e liberadas, aumentando a expressão do receptor de baixa afinidade para IgE (FceRII) e células B são estimuladas a produzir IgE alérgeno-específico (Samitas, Lotvall et al. 2010).

O receptor de alta afinidade para IgE (FceRI) são expressos na superfície de mastócitos e basófilos e, em níveis muito baixos, nas células apresentadoras de antígenos (MacGlashan 2008). A ativação do FceRI medeia a regulação de IgE, ativação de monócitos e células apresentadoras de antígeno e a diferenciação de células B.

A IL-4 induz ainda a expressão de moléculas de adesão vascular nos eosinófilos e basófilos, além da produção de quimiocinas. Isto facilita a migração de células inflamatórias da circulação para a lâmina própria, o epitélio e lúmen das vias aéreas (Zhu, Homer et al. 1999). A IL-5, junto a IL-3 e ao GM-CSF, promovem a diferenciação de eosinófilos, a partir de precursores mielóides, além de atuar na ativação desta célula. Uma segunda exposição ao mesmo alérgeno resulta em degranulação de mastócitos com rápida liberação de compostos químicos como histamina, leucotrienos, prostaglandinas, além de outros mediadores pró-inflamatórios (Samitas, Delimpoura et al. 2015). Estes desempenham papel central na imunopatogênese da asma sendo responsável em grande parte, pelos sintomas característicos da doença.

A tabela 1 demonstra os principais tipos celulares envolvidos na patogênese da asma, o papel desenvolvido por essas células nesse processo inflamatório, assim como as citocinas por elas produzidas. Incluindo mastócitos, eosinófilos, linfócitos T, células dendríticas, macrófagos, neutrófilos e as células linfoides inatas do tipo 2 (ILC2), essas células podem estar envolvidas na asma de perfil atópico e/ou não atópico e medeiam a complexa resposta inflamatória nas vias aéreas.

**Tabela 1.** Células inflamatórias em vias aéreas asmáticas

<b>Tipo celular</b>	<b>Atuação na asma</b>
<b>Mastócitos</b>	Libera os mediadores broncoconstritores histamina, leucotrienos e Prostaglandina D2 quando ativados. São ativados por alérgenos através da ligação aos receptores de IgE de alta ligação (FceRI).
<b>Eosinófilos</b>	Normalmente presentes em maior número nas vias aéreas asmáticas. Liberam proteínas que podem danificar as células epiteliais das vias aéreas e mediadores inflamatórios, que ativam e recrutam mais eosinófilos para o sítio inflamatório. Além de produzir citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-4, IL-5, IL-13 (Davoine e Lacy 2014)
<b>Linfócitos T</b>	Presentes em maior número nas vias aéreas asmáticas, Os linfócitos Th2 liberam citocinas, inflamatórias incluindo IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, que orquestram a inflamação eosinofílica e produção de IgE por linfócitos B. Na asma grave, há também um aumento nas células Th1 e Th17.
<b>Células dendríticas</b>	São conhecidas por seu papel crítico tanto na sensibilização alérgica quanto na fase efetora da asma atópica. Alguns estudos mostraram que seu papel se resume basicamente à captação do alérgeno, produção de citocinas e quimiocinas e, o mais importante, a sua capacidade em induzir a diferenciação de células T naive para os subtipos Th1, Th2, Th17 e Treg. Também atuam na produção da IL-10. (Lambrecht e Hammad, 2015; Froidure, Shen et al. 2016).
<b>Macrófagos</b>	Podem ser ativados por alérgenos através de receptores IgE de baixa afinidade (FceRII) e liberar mediadores inflamatórios e citocinas que amplificam a resposta inflamatória, especialmente na asma grave.
<b>Neutrófilos</b>	Estas células estão aumentadas nas vias aéreas e no escarro de pacientes com asma grave e asmáticos fumantes. O papel fisiopatológico dessas células é incerto. A asma com perfil neutrofilico esta associada a maior resistência ao tratamento com corticosteróides e $\beta$ -adrenérgicos inalatórios.
<b>ILC2s</b>	ILC2s podem secretar IL-5 e IL-13, são um exemplo de imunidade do tipo 2. Esta imunidade induz ativação de mastócitos, basófilos, eosinófilos e aumenta os níveis de IgE sérico (Ozyigit, Morita et al. 2015).

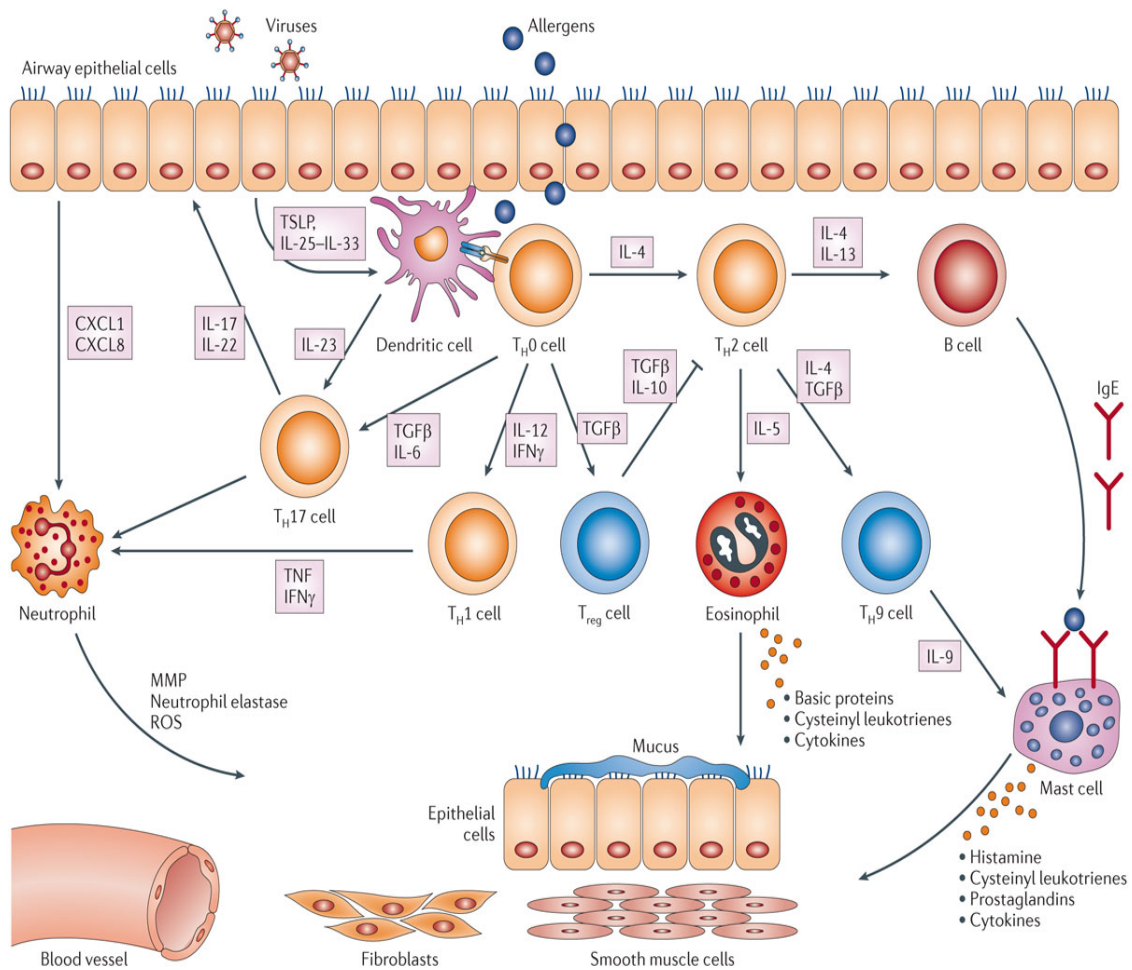
**Fonte:** Adaptado de GINA 2016. "GLOBAL STRATEGY FOR ASTHMA MANAGEMENT AND PREVENTION".



Mesmo a patogênese da asma sendo relacionada ao aumento da resposta do tipo Th2, citocinas do tipo Th1 também podem estar envolvidas, resultando em agravamento do quadro (Smart and Kemp 2002; Cho, Stanciu et al. 2005). As citocinas do tipo Th1/Th2 possuem efeitos inibitórios recíprocos, mediados por mecanismos efetores teoricamente antagônicos. Ainda assim, alguns pacientes podem apresentar manifestações clínicas decorrentes de uma ou outra reação de hipersensibilidade de forma imediata.

Outros fenótipos de células T, incluindo células Th17 e NK-T também contribuem na patogênese da asma. As células Th17 diferenciam-se para produzir grandes quantidades de IL-17, que pode ser importante na asma com fenótipo de inflamação neutrofílica (não atópica) (Robinson 2010). As células linfoides inatas tipo 2 (ILC2s) reguladas por mediadores de células epiteliais, tais como IL-25 e IL-33 tem sido implicada na inflamação das vias aéreas em asma (Scanlon and McKenzie 2012). Em alguns casos (especialmente asma grave) podem contribuir para a resposta neutrofílica (Wenzel 2012). Alguns estudos, inclusive, associam esse perfil neutrofílico da asma, com o agravamento da doença e diminuição da função pulmonar (Louten, Boniface et al. 2009; Lambrecht and Hammad 2015). Além de maior resistência ao tratamento com corticosteróides e  $\beta$ -adrenérgicos inalatórios.

A figura 3 resume essa complexa rede da resposta imune envolvida na patogênese da asma e possíveis agentes causais à doença. A ativação das células epiteliais e liberação de IL-25, IL-33 e TSLP contribui para respostas Th2 por células T e células linfoides inatas. Estas citocinas desempenham um importante papel na produção de IgE específica para o alérgeno, eosinofilia, permissividade do endotélio para o recrutamento de células inflamatórias para tecidos inflamados, produção de muco e diminuição do lúmen dos brônquios pelo aumento da contração dos músculos lisos, resultando em hiperreatividade das vias aéreas. Por outro lado, células Th17 e Th1 também podem ser ativadas levando a um infiltrado de neutrófilos, caracterizando a asma de perfil não alérgico, geralmente associado a um fenótipo de asma com sintomas exacerbados e de difícil tratamento.



Nature Reviews | Drug Discovery

**Figura 3.** Immunopatogênese da asma

**Fonte:** Nature Reviews. Drug Discovery.

#### 2.4 Importância da IL-10 na asma e atopia

No intuito de evitar a ativação crônica de células e o processo inflamatório gerados por antígenos não patogênicos expostos ao organismo via ingestão e inalação, o sistema imunológico desenvolveu ao longo dos anos mecanismos periféricos de tolerância eficientes. Tem sido demonstrado que diferentes subtipos de células regulatórias e supressoras podem desempenhar um papel na tolerância periférica, e sua biologia tem sido objeto de intensa investigação (Shevach 2002).

Um dos principais mecanismos relacionados a esta modulação se dá através das células T regulatórias (Treg) (Read and Powrie 2001).

As células T regulatórias (Treg) CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> são as células responsáveis por suprimirem as respostas imunológicas especialmente através de interações célula-célula e/ou a produção de Fator de transformação do crescimento beta TGF- $\beta$  e IL-10 (Read and Powrie 2001). Há evidências de que o número e/ou função das células T regulatórias podem estar reduzidos em pacientes com doenças alérgicas e asma (Borish, Aarons et al. 1996; Lim, Crawley et al. 1998; Heaton, Rowe et al. 2005).

Akdis et al, mostrou que há um aumento na frequência de células T alérgeno-específicas que secretam IL-4 em pacientes atópicos e um aumento na frequência de células T secretoras de IL-10 em doadores não atópicos (Akdis, Verhagen et al. 2004). Matsumoto K. et al.,2004, relataram que as células IL-10<sup>+</sup> TCD4<sup>+</sup> do sangue periférico foram reduzidas em asmáticos graves em comparação com asmáticos leves estáveis (Matsumoto, Inoue et al. 2004). Outro estudo relatou que a produção de IL-10 em monócitos estava também prejudicada em casos de asma grave (Wing and Sakaguchi 2006).

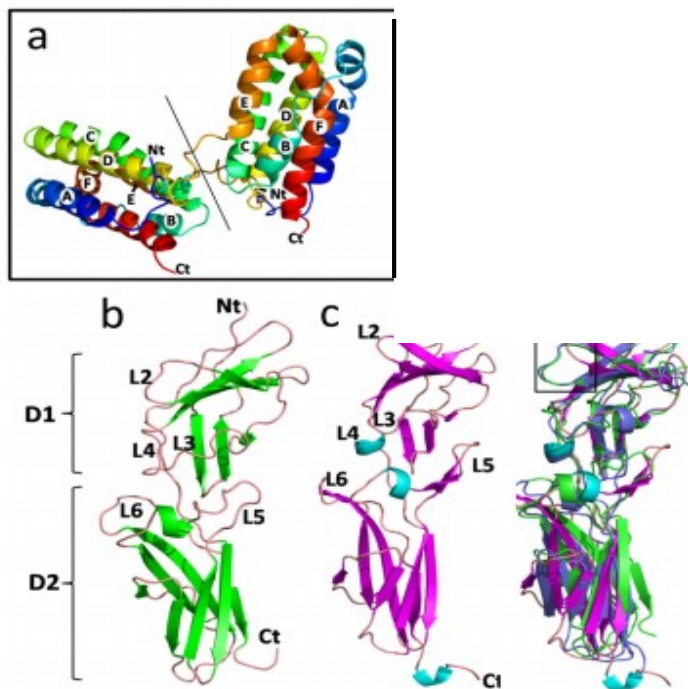
Existem várias explicações possíveis para a redução da atividade de supressão das células Tregs nessas patologias, sendo os defeitos genéticos inerentes ao indivíduo sugeridos como um dos principais responsáveis por tal mecanismo (Robinson 2010).

Estudos indicam que as manifestações alérgicas podem ser reguladas tanto por células T reguladoras CD4 + CD25 + de ocorrência natural (Treg) como por células T reguladoras CD4 + que secretam IL-10. Algumas evidências trazem que uma terapia de dessensibilização de alérgenos bem sucedida pode funcionar através da indução de células T reguladoras produtoras de IL-10. No entanto, tal terapia pode estar associada a um risco considerável de desenvolver efeitos secundários e tem de ser administrada por um período de vários anos para uma máxima eficácia (Hawrylowicz and O'Garra 2005).

Mais recentemente, no contexto das doenças alérgicas, evidências emergentes indicam que um ambiente agudamente inflamatório pode superar a resposta reguladora das células Treg alérgeno-específicas e redirecionar essas células para um fenótipo patogênico e pró-inflamatório. Noval Rivas e Chatila (2016) relataram como as células Treg podem adquirir fenótipos de células T efectoras e, no

processo, contribuir para a patogênese da doença e, em geral, isso acontece em detrimento da troca de aminoácidos que afetam os fatores transcricionais importantes para a célula (Noval Rivas, Burton et al. 2015; Noval Rivas and Chatila 2016).

Biologicamente funcional, a IL-10 humana é um dímero de 36 kDa que consiste em duas cadeias polipeptídicas de 160 aminoácidos com resíduos longos (Walter and Nagabhushan 1995). As respostas celulares de IL-10 requerem o reconhecimento e montagem específicos de um receptor heterodimérico complexo de superfície celular composto por cadeias IL-10R1 e IL-10R2 (Walter 2014). A iniciação da transdução de sinal ocorre quando IL-10 se liga a duas cadeias receptoras (Liu, Wei et al. 1994). Ambas as cadeias são constituídas por domínios extracelulares, transmembranares e intracelulares / citoplasmáticos. A figura 4 representa as estruturas da IL-10 e seu receptor.

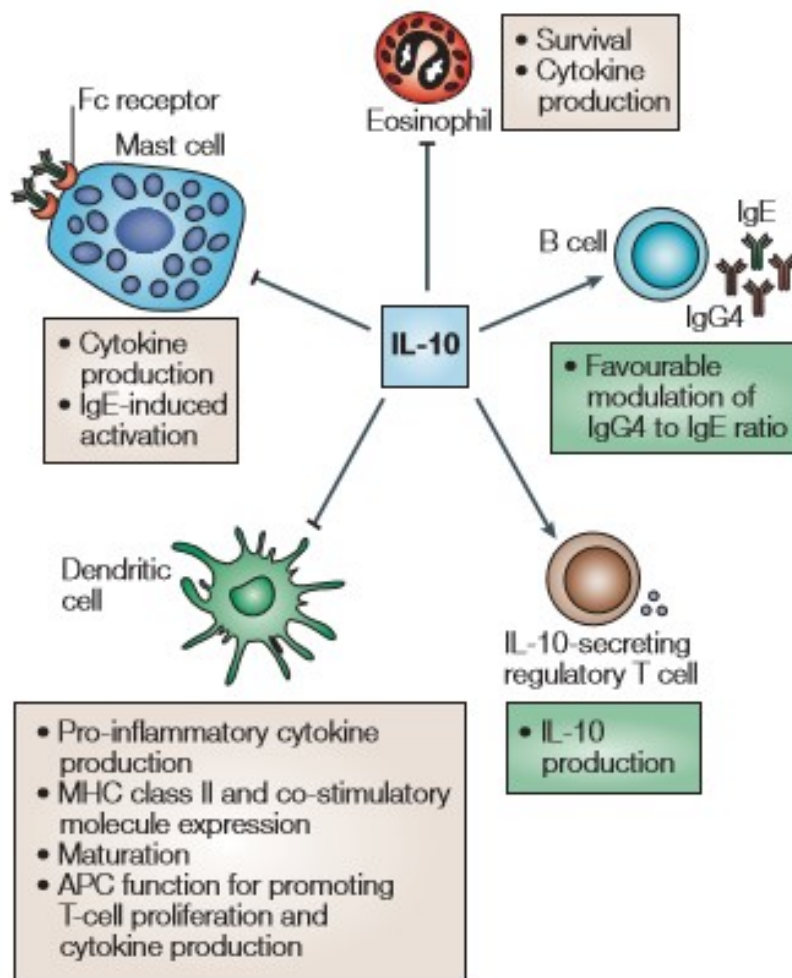


**Figura 4.** Estrutura da IL-10 e seu receptor. Em (a) está a estrutura e topologia do domínio IL-10. As estruturas globais de IL-10R1 (b), IL-10R2 (c) e uma superposição do receptor (d).

**Fonte:** Walter, 2014. The Molecular Basis of IL-10 Function: From Receptor Structure to the Onset of Signaling. *Curr Top Microbiol Immunol*

A IL-10 regula a expressão de citocinas pró-inflamatórias, além da atividade microbicida das células dendríticas, linfócitos T e células NK (Aliberti 2005). Esta exerce múltiplos efeitos na asma atópica, apresentando um papel importante na diminuição das inflamações alérgicas através da inibição da produção de citocinas pró- inflamatórias como IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , bem como a atividade dos principais subtipos celulares e citocinas diretamente envolvidas nas reações alérgicas, incluindo IL-4 e IL-5 (Cooper, Rodrigues et al. 2012; Noval Rivas, Burton et al. 2015). IL-10 também inibe a habilidade de macrófagos em destruir organismos intracelulares (Gazzinelli, Oswald et al. 1992; Moore, de Waal Malefyt et al. 2001).

A figura 4 descreve o potente papel que a IL-10 exerce sobre células que participam intimamente do processo inflamatório na asma e alergias. A IL-10 é uma citocina pleiotrópica que demonstrou inibir a ativação e a produção de citocinas pelos mastócitos (Arock, Zuany-Amorim et al. 1996; Royer, Varadaradjalou et al. 2001), bem como a sobrevivência e a produção de citocinas pelos eosinófilos (Takanashi, Nonaka et al. 1994). Também inibe a função de células apresentadoras de antígenos (APC), incluindo a maturação de células dendríticas (Buelens, Verhasselt et al. 1997), a expressão de moléculas MHC de classe II e co-estimuladoras (Fiorentino, Zlotnik et al. 1991; Moore, de Waal Malefyt et al. 2001), além da ativação de células T-helper (Grunig, Corry et al. 1997). Foi demonstrado que a IL-10 pode promover a indução de células T reguladoras em secretoras de IL-10.



**Figura 5.** Funções da interleucina-10 que são relevantes para alergia e asma

**Fonte:** Hawrylowicz CM et al, 2005. "POTENTIAL ROLE OF INTERLEUKIN-10 SECRETING REGULATORY T CELLS IN ALLERGY AND ASTHMA". Nature Reviews Immunology.

Diversos estudos demonstram a habilidade das infecções helmínticas em manipular o sistema imune do hospedeiro, suprimindo as respostas que podem levar a sua eliminação (Allen and Maizels 2011). A hipótese da higiene inclusive, atribui o aumento de alergias e doenças auto-imunes a falhas da imunorregulação causada por exposição diminuída a certos organismos, incluindo helmintos que coexistiram com hospedeiros definitivos em toda a história de evolução dos mamíferos. Uma dessas estratégias é o aumento da produção de citocinas reguladoras como a IL-10. (levando ao aumento da sobrevivência desses parasitas, através da diminuição de citocinas pró-inflamatórias)(Rook 2007).

Alguns estudos demonstraram que os parasitas como *Ascaris lumbricoides* e *Trichuris trichiura*, podem modular a resposta imune e que crianças que vivem em áreas pobres são mais propensas à infecção por esses parasitas e produzem IL-10 em cultura (Figueiredo, Alcantara-Neves et al. 2009). Esta intensa imunoregulação induzida nos indivíduos infectados pode explicar a proteção descrita na literatura contra o desenvolvimento de doenças imunomediadas. Fatos que corroboram esta hipótese são oriundos de estudos observacionais que associam um aumento da prevalência de doenças alérgicas em indivíduos infectados quando são tratados com drogas anti-parasitárias (Lynch et al., 1993) e que os sintomas de asma são menos graves em indivíduos infectados (Medeiros, Figueiredo et al. 2003).

O nosso grupo recentemente descreveu a primeira evidência em estudo de base populacional do potencial regulador da IL-10. Neste estudo foi verificado que crianças que vivem em regiões com falta de higiene (escassa coleta de lixo, falta de esgoto e falta de pavimentação das ruas) produzem menos citocinas Th1 e Th2 em cultura, sendo esta supressão de citocinas significativamente maior entre as crianças que produzem IL-10 quando comparadas aquelas que não produzem IL-10, indicando que a IL-10 pode modular esse efeito (Figueiredo, Barreto et al. 2013)

Acredita-se que o principal agente infeccioso que poderia estar envolvido neste processo de supressão de citocinas sejam os helmintos por possuírem forte potencial imunomodulador conforme descrito por nosso grupo e outros autores (Araujo, Hoppe et al. 2004; Ponte, Lima et al. 2006).

Dessa forma, alterações nos níveis de citocinas reguladoras, como a IL-10, parece possuir um importante papel na mediação de alergias e asma (Yazdanbakhsh, Kremsner et al. 2002). Em detrimento disso, a IL-10 tem sido reconhecida cada vez mais como um marcador de imunomodulação da doença (Taylor, Verhagen et al. 2004).

## 2.5 Impacto dos Polimorfismos no gene da IL-10

A conclusão do Projeto Genoma Humano em 2003 e do International HapMap Project em 2005, permitiu a identificação de componentes genéticos de diversas doenças. Um estudo australiano investigou 3.808 pares de gêmeos e as correlações para a asma foram maiores para os gêmeos MZ (Monozigóticos) do que para os gêmeos DZ (Dizigóticos) (0,48 para MZ, 0,09 para DZ, masculinos; e 0,33 para MZ, 0,12 para DZ, femininos), o que implica que uma parcela significativa da variância é de responsabilidade genética na patogênese da asma ( $h^2 = 0,60$ ) (DUFFY et al., 1990). Resultados semelhantes foram obtidos no estudo de outras populações, evidenciando a forte influência da hereditariedade sobre o desenvolvimento da asma.

A produção de citocinas é influenciada por controle genético. Os polimorfismos na região promotora de genes de citocinas podem determinar a sua produção de níveis mais baixos ou mais altos, em resposta a diferentes estímulos. Como consequência, estes polimorfismos podem influenciar na susceptibilidade para doenças inflamatórias, bem como em sua severidade.

Mais de 30 genes foram identificados como candidatos à suscetibilidade à asma, incluindo genes relacionados a imunidade inata e genes imunoregulatórios (p. ex. CD14, TLR2, 4, 6, 10, IL-10, TGF-beta e HLA DR, DQ e DP); e os associados à atopia, diferenciação Th2 e suas funções (p. ex. GATA-3, IL-4, IL-4R, FcRI, IL-5, IL-5R e STAT-6) (Vercelli 2008). Vários polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) foram relatados na região promotora do gene IL-10 e estavam associados com níveis alterados desta citocina e susceptibilidade a asma e alergia

Em estudos de associação genética, variações nos genes que codificam proteínas envolvidas no desenvolvimento e função das células Treg foram previamente associados a atopia, fenótipos de asma e níveis alterados de citocinas como IL-10 (Bottema, Kerkhof et al. 2010). Hyun et al (2013) e Raeiszadeh et al (2015) demonstram que o marcador rs1800896 confere suscetibilidade à asma em adultos (Ober and Hoffjan 2006; Hyun, Lee et al. 2013; Raeiszadeh Jahromi, Mahesh et al. 2015). Além disso, o marcador rs1800896 foi associado com níveis elevados de IgE total (Ober and Hoffjan 2006; Grant, Araujo et al. 2011). As variantes rs1878672 e rs3024491 foram associadas a maior produção de IL-10 quando expostos a *Helicobacter Pylori* (Figueiredo, Marques et al. 2014).



Estudos funcionais *in vitro* demonstraram que indivíduos com o haplótipo CGC nos sítios polimórficos da região promotora rs1800896, rs1800871 e rs1800872 produzem altos níveis de IL-10 em cultura de células mononucleares do sangue periférico (PBMC), enquanto que os indivíduos com o haplótipo ATA possuem uma menor taxa de transcrição, produzindo baixos níveis de IL-10 (Turner, Williams et al. 1997). Outro estudo relatou uma associação do haplótipo ATA com contagem de eosinófilos nos asmáticos e níveis de IgE em pacientes asmáticos do sexo masculino (KARLAJALAINEN et al. 2003).

Nosso grupo também demonstrou que variantes genéticas no gene da IL-10 estão negativamente associados à produção de IL-10 sob estímulo de *Ascaris lumbricoides* estando associados negativamente com infecção helmíntica e consequentemente a maior risco de asma atópica (Figueiredo, Barreto et al. 2013).

Estes resultados evidenciam que, provavelmente, a exposição contínua da população a helmintos e seus produtos possam induzir modulações genéticas que suprimem polimorfismos relacionados a uma menor produção de IL-10 e maior risco de asma. Logo, faz-se necessário estudos com foco na interação gene-ambiente, além de elucidar como alterações no gene da IL-10 se associam com a expressão destas moléculas em diferentes fenótipos de asma.

## 2.6 Tratamentos e intervenções

O objetivo do manejo da asma é a obtenção do controle da doença. Esse controle se refere à extensão com a qual as manifestações da asma estão suprimidas, espontaneamente ou pelo tratamento, e compreende dois domínios distintos: o controle das limitações clínicas atuais e a redução dos riscos futuros. O controle das limitações atuais deve ser preferencialmente avaliado em relação às últimas quatro semanas e inclui sintomas, necessidade de medicação de alívio, limitação de atividades físicas e intensidade da limitação ao fluxo aéreo (Pedersen, Hurd et al. 2011). Com base nesses parâmetros, a asma pode ser classificada em três grupos distintos: asma controlada, asma parcialmente controlada e asma não controlada como exibido no quadro a seguir:

<b>Avaliação do controle clínico atual</b> (preferencialmente nas últimas quatro semanas)			
Parâmetros	Asma controlada	Asma parcialmente controlada	Asma não controlada
	Todos os parâmetros abaixo	Um ou dois dos parâmetros abaixo	Três ou mais dos parâmetros da asma parcialmente controlada
Sintomas diurnos	Nenhum ou $\leq 2$ por semana	Três ou mais por semana	
Limitação de atividades	Nenhuma	Qualquer	
Sintomas/despertares noturnos	Nenhum	Qualquer	
Necessidade de medicação de alívio	Nenhuma ou $\leq 2$ por semana	Três ou mais por semana	
Função pulmonar (PFE ou VEF) <sup>b,c</sup>	Normal	< 80% predito ou do melhor prévio (se conhecido)	
<b>Avaliação dos riscos futuros</b> (exacerbações, instabilidade, declínio acelerado da função pulmonar e efeitos adversos)			
Características que estão associadas com aumento dos riscos de eventos adversos no futuro: mau controle clínico, exacerbações frequentes no último ano, <sup>a</sup> admissão prévia em UTI, baixo VEF <sub>1</sub> , exposição à fumaça do tabaco e necessidade de usar medicação em altas dosagens			

<sup>a</sup>Por definição, uma exacerbação em qualquer semana é indicativa de asma não controlada. Qualquer exacerbação é indicativa da necessidade de revisão do tratamento de manutenção. <sup>b</sup>Valores pré-broncodilatador sob o uso da medicação controladora atual. <sup>c</sup>Não aplicável na avaliação do controle da asma em crianças menores de cinco anos. Adaptado de Global Initiative for Asthma e Pedersen et al.<sup>(1-2)</sup>

**Figura 6.** Quadro dos níveis de controle da asma.

**Fonte:** “Diretrizes da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia para o Manejo da Asma – 2012”. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2012;38(supl.1):S1-S46.

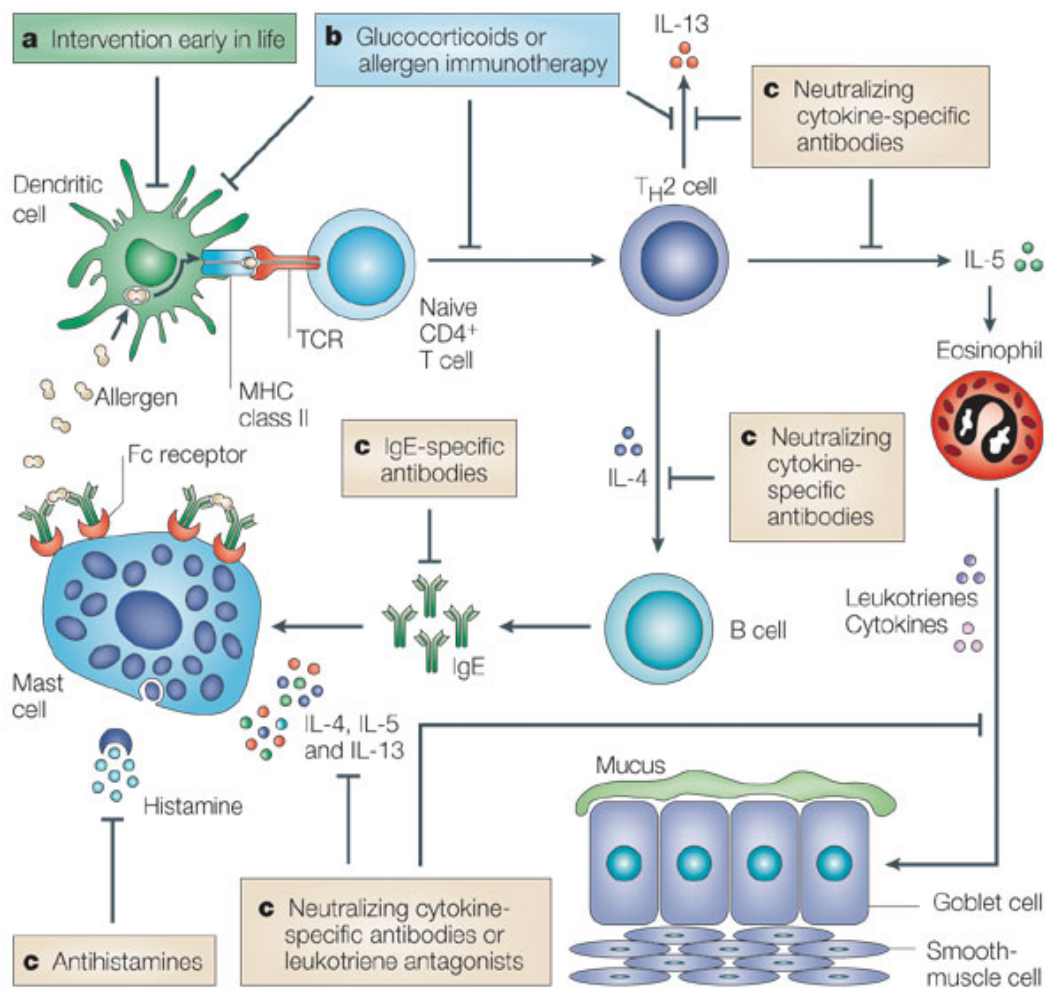
Os corticosteróides Inalatórios (ICS) são os mais efetivos anti-inflamatórios para o tratamento da asma persistente. Estudos tem demonstrado sua eficácia em reduzir os sintomas da asma, melhora na qualidade de vida e melhora da função pulmonar, reduzindo a frequência e gravidade das exacerbações e diminuição da mortalidade (Juniper, Kline et al. 1990; Pauwels, Lofdahl et al. 1997; Juniper, Svensson et al. 1999; O’Byrne, Barnes et al. 2001; Rank, Hagan et al. 2013), bem como controlando a inflamação das vias aéreas (Jeffery, Godfrey et al. 1992). Os linfócitos representam um importante alvo de fármacos anti-inflamatórios e, particularmente, de corticosteróides. Um dos mecanismos mediados pelos

corticosteróides em células alvo é a indução da apoptose celular (Grimm, Goldberg et al. 1996).

Quando uma dose média de ICS sozinho não consegue alcançar um bom controle da asma, A adição de LABA (Beta-2 agonistas de longa ação) é a melhor opção preferencialmente como uma combinação de inaladores ICS / LABA. A adição de LABA ao ICS melhora os resultados clínicos da asma e reduz o número de exacerbações (Kesten, Chapman et al. 1991; Pearlman, Chervinsky et al. 1992; Greening, Ind et al. 1994; Woolcock, Lundback et al. 1996; Wenzel, Lumry et al. 1998; Shrewsbury, Pyke et al. 2000), diminui o risco de hospitalizações relacionadas com asma (Jaeschke, O'Byrne et al. 2008) e alcança o controle clínico da asma em mais pacientes, mais rapidamente e com uma dose mais baixa de ICS do que com ICS administrados sozinhos (Bateman, Boushey et al. 2004).

Os modificadores de leucotrienos incluem antagonistas do receptor cisteinil-leucotrieno 1 (CysLT1) (LTRA) (montelucaste, pranlukast e zafirlukast) e um inibidor da 5-lipoxigenase (zileuton). Estudos clínicos demonstraram que os modificadores de leucotrienos têm um efeito broncodilatador pequeno e variável, reduzem os sintomas incluindo a tosse (Barnes and Miller 2000; Dicipinigitis, Dobkin et al. 2002), melhoram a função pulmonar e reduzem a inflamação das vias aéreas e as exacerbações da asma (Drazen 1999; Lipworth 1999; Barnes and Miller 2000). No entanto, quando utilizados isoladamente como terapia de controle, o efeito de modificadores de leucotrienos é geralmente inferior ao de doses baixas de ICS e, em doentes já em ICS, os modificadores de leucotrienos não podem substituir este tratamento sem correr o risco de perda de controle de asma (Chauhan and Ducharme 2012).

A terapia com anticorpos é o método mais recente para o tratamento de asma e doenças alérgicas, porém é um método ainda pouco utilizado devido ao seu alto custo. A anti-imunoglobulina E (anti-IgE, omalizumab) é uma opção de tratamento para pacientes com asma alérgica persistente grave e elevação da IgE sérica cuja asma não é controlada no tratamento com corticosteróides (inalados e / ou orais) e LABA. (Normansell, Walker et al. 2014) Os doentes podem beneficiar de um melhor controle da asma, menos sintomas, menor necessidade de medicação de alívio, e menos exacerbações.(Normansell, Walker et al. 2014).



Nature Reviews | Immunology

**Figura 7.** A via alérgica e potenciais pontos de intervenção.

**Fonte:** Hawrylowicz CM et al, 2005. "Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells

No que diz respeito ao tratamento das doenças alérgicas, as terapias atuais incluem intervenções farmacológicas tais como tratamento com anti-histamínicos ou glicocorticoides, que funcionam de forma não específica para proporcionar um alívio a curto prazo dos sintomas da doença (Hawrylowicz and O'Garra 2005).

De acordo com a Figura 7, são propostos três pontos principais de intervenção terapêutica para o tratamento de doenças alérgicas. a | A primeira possibilidade (caixa verde) é bloquear a iniciação da resposta imune e assim prevenir o desenvolvimento de respostas T helper 2 (TH2) que promovem a doença aos alérgenos: por exemplo, por intervenção no início da vida. b | A segunda possibilidade (caixa azul) é bloquear a ativação de células TH2 específicas para alérgenos, direta ou indiretamente através de efeitos nas células apresentadoras de antígeno: por exemplo, por tratamento com fármacos anti-inflamatórios, tais como glicocorticóides ou por imunoterapia com alérgenos. c | A terceira possibilidade (caixas amarelas) é bloquear moléculas efetoras que causam os sintomas clínicos de doença alérgica: por exemplo, por tratamento com anti-histamínicos, antagonistas de leucotrienos, anticorpos neutralizantes específicos para citocinas TH2 ou anticorpos específicos para IgE. Essas últimas terapias são menos utilizadas devido ao seu alto custo. (Hawrylowicz and O'Garra 2005).

Cerca de 10% dos indivíduos que possuem asma assumem uma predisposição a fenótipos mais graves da doença e permanecem sem resposta ao tratamento, mesmo com doses elevadas de corticosteróides inalados e agonistas do receptor de longa ação B2-adrenérgico (Wenzel 2005). Pacientes não responsivos aos ICS parecem ter um maior risco de remodelamento e redução da função pulmonar (Bai, Vonk et al. 2007; O'Byrne, Pedersen et al. 2009). Este subgrupo, reúne uma maior proporção da morbimortalidade relacionada à asma, pois, é constante o número de entradas em emergências e pronto atendimentos para tratar estados de exacerbação do quadro clínico desta doença (Antonicelli, Bucca et al. 2004).

Além disso, os glicocorticóides suprimem o sistema imunológico de várias maneiras, interferindo a função de vários tipos celulares, incluindo a supressão da função das células T efectoras (Asher 2010) e influenciando a expressão da IL-10. Avaliando os efeitos dos glicocorticóides, antileucotrienos e beta agonistas em crianças asmáticas, foi demonstrado que pacientes tratados com Montelukaste e Triamcinolona aumentaram os níveis séricos de IL-10 e melhoraram os sintomas de asma e hiperreatividade das vias aéreas (Stelmach, Jerzynska et al. 2002). Além disso, um outro estudo avaliando a capacidade de Budesonida, um glicocorticoide inalatório comumente utilizado no tratamento da asma demonstrou que o Budesonida inalado em pacientes com asma persistente leve é capaz, *in vivo*, de

aumentar a expressão de ICOS, Foxp3 e IL-10 em CD4 + / CD25 + (Pace, Di Sano et al. 2012). O ICOS também é expresso por Tregs e exerce um papel fundamental na geração e função das células T reguladoras CD4 + CD25 + Foxp3 + (Busse, Krech et al. 2012). Já as interações ICOS-ICOS ligante e IL-10 regulam o desenvolvimento e a função inibitória dos linfócitos reguladores (Akbari, Freeman et al. 2002) A IL-10 ativa a tirosina fosfatase 1, a qual desfosforila rapidamente os receptores co-estimuladores CD28 e ICOS.(Taylor, Akdis et al. 2007)

Nesta perspectiva, faz-se necessário investigar de que forma a IL-10 atua nos mecanismos imunopatológicos da asma e atopia e como alterações genéticas pontuais podem afetar o funcionamento dessa proteína assim como interferir na resposta do paciente ao tratamento. Além disso, o entendimento sobre as rotas genéticas que afetam a ocorrência de asma em nossa população poderá nos fornecer novos alvos moleculares para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de tais patologias.

### 3 HIPÓTESE E OBJETIVOS

#### 3.1 Hipótese

Variantes genéticas no gene da IL-10 podem influenciar nas concentrações da proteína produzida e, conseqüentemente, no desenvolvimento de asma e atopia.

#### 3.2 Objetivo Geral

Investigar o impacto de polimorfismos no gene da IL-10 sobre os níveis de produção da citocina, e associá-los aos diferentes fenótipos de asma e atopia na população do ProAR (Programa para o controle da Asma e da Rinite Alérgica na Bahia).

#### 3.3 Objetivos Específicos

- Descrever as frequências de polimorfismos no gene da IL-10 em todos os indivíduos na população do ProAR;
- Investigar a associação entre polimorfismos no gene da IL-10 e fenótipos de asma e atopia;
- Determinar as concentrações de IL-10 no plasma e sobrenadante de cultura nos indivíduos asmáticos, atópicos e não afetados (saudáveis);
- Avaliar a associação entre polimorfismos no gene da IL-10 e níveis desta citocina;
- Avaliar a associação entre os níveis da produção de IL-10 com os fenótipos de asma.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 População de estudo

O estudo foi realizado na cidade de Salvador, no Nordeste do Brasil, e incluiu 1.426 indivíduos recrutados do ProAR (Programa de Controle da Asma e Rinite Alérgica na Bahia). Trata-se de um estudo caso-controle dividido em dois grupos. O primeiro, com n=455 indivíduos controles sem qualquer histórico de asma, pareado aos casos por gênero, idade, nível socioeconômico e local de residência. O grupo caso com n= 971 pacientes asmáticos (461 asma leve, 448 asma grave com reversibilidade, 71 asma grave sem reversibilidade), acompanhados por ao menos um ano, que tiveram o diagnóstico confirmado de asma leve/intermitente ou grave, segundo a classificação da Iniciativa Global contra a Asma (GINA 2006). A idade da população estudada variou entre 18 a 90 anos.

Todos os participantes foram submetidos aos mesmos procedimentos para obtenção de informações clínicas, do ambiente e amostras biológicas. Em ambos os grupos, foram excluídos indivíduos/pacientes com diagnóstico de enfermidade respiratória crônica acometendo as vias aéreas inferiores ou pulmões, tais como tuberculose ativa ou seqüela extensa de tuberculose, fibrose cística, câncer de pulmão ou doença pulmonar obstrutiva crônica.

A atopia foi definida utilizando-se como parâmetro de atopia, um teste cutâneo positivo (diâmetro da pápula  $\geq 3$  mm) a pelo menos um dos 13 aeroalérgenos comuns estudados. Este estudo foi aprovado pela comissão de ética da Maternidade Climério de Oliveira da Universidade Federal da Bahia (COM / UFBA) n ° 095/2012, a partir do projeto intitulado “Fatores de risco, biomarcadores e endofenótipos de asma grave” coordenado pelo Prof. Álvaro Cruz, Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia.

### 4.2 Coleta de sangue total

O sangue venoso foi recolhido em dois tubos de 5 mL. O primeiro tubo contendo EDTA foi utilizado para mensurações de citocinas e extração de DNA genômico. O segundo tubo contendo heparina foi utilizado para culturas de sangue total a uma diluição de 1: 4 em RPMI (Gibco, Auckland, Nova Zelândia) contendo 10



mmol / L de glutamina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e 100 mg / mL de Gentamicina (Sigma-Aldrich). As células foram mantidas num ambiente umidificado de 5% de CO<sub>2</sub> a 37 ° C durante 24 horas até os sobrenadantes serem recolhidos para medição de IL-10, IL-5, IL-12 e IFN.

#### 4.3 Aplicação do teste cutâneo

Todos os indivíduos foram submetidos ao teste cutâneo, O SPT (Skin Prick Test) foi realizado no antebraço direito dos indivíduos incluindo controles positivos e negativos, e um painel de 13 alérgenos comerciais da (ALK-ABELLO, São Paulo, Brasil), contendo extratos de: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, *Dermatophagoides farinae*, *Blomia tropicalis*, epitélio de gato, epitélio de cão, *Blatella germanica*, *Periplaneta americana*, *Paspalum notatum* e *Cynodon dactylon*. Solução salina e histamina (10 mg / mL) foram utilizadas como controles negativo e positivo, respectivamente. As reações foram lidas após 15 minutos e um tamanho médio da pápula de pelo menos  $\geq 3$  mm maior do que o causado pelo controlo negativo foi considerado positivo. (Mendonça, Veiga et al. 2012) Indivíduos com SPT positivo para, pelo menos, um aeroalérgeno testado foram classificados como atópicos.

#### 4.4 Mensuração de citocinas por ELISA

As concentrações de IL-5 e IL-12 foram mensuradas em sobrenadantes de cultura de sangue total por ELISA sanduíche, de acordo com as instruções do fabricante (BD OptEIA, IL-5 (limites de detecção (baixo/alto)= 15.6/500 pg/mL) e IL-12 humana (detecção (baixo/alto)= 7.8/500 pg/mL), ELISA duoset). IL-10 foi mensurada em sobrenadante de cultura e plasma utilizando um kit comercial com pares de anticorpos recombinantes (Affymetrix eBioscience, San Diego) por ELISA sanduíche, de acordo com as instruções do fabricante. As concentrações de citocinas foram determinadas por interpolação de curvas padrão. (Os limites de detecção (baixo / alto) foram 4,68 / 300 pg/mL).

#### 4.5 Extração de DNA e genotipagem

A extração de DNA foi realizada a partir de amostras de sangue de acordo com o protocolo do kit de DNA Flexigene® (Qiagen, Hilden, Alemanha). Todas as amostras foram genotipadas e uniformizadas a uma concentração de 5 ng / µL e armazenadas a -30 °C. Foram genotipados 4 SNPs associados previamente com fenótipos de asma e atopia (rs1878672, rs1800896, rs3024491, rs3024496) por PCR em tempo real em equipamento de alta tecnologia da Applied Biosystems (QuantStudio) conforme previamente descrito (Roussel, Farias et al. 2013) em amostras de indivíduos asmáticos e não asmáticos. Os SNPs foram tipificados utilizando a tecnologia de TaqMan probe-based 5'-nuclease assays (AppliedBiosystems, Foster City, CA, USA). A PCR foi conduzida num volume de 5 µL utilizando uma mistura principal e 4 ensaios de TaqMan pré-concebidos e validados para os SNPs da Life Technologies (Applied Biosystems). As condições de ciclagem térmica foram as seguintes: 95 °C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95 °C durante 15 segundos / 60 °C durante 1 minuto e um passo de extensão de 60 °C durante 5 minutos. Foram incluídos em cada placa de genotipagem os controles negativos para genotipagem. Para controle de qualidade, foram aplicados os seguintes filtros: taxa de genotipagem inferior a 0,98; desequilíbrio de Hardy-Weinberg com valor de  $p > 0.001$  e p-valor para o alelo de menor frequência (MAF - alelo de menor frequência) maior que 5%. Os 4 SNPs passaram pelos critérios selecionados.

#### 4.6 Análise de expressão *in silico* usando a plataforma GTEx

Para avaliarmos a relação entre variação genética e expressão, utilizamos a base de dados do Projeto de extensão dos genótipos em tecido, Gtex, usando o navegador do portal de expressão Gtex ([www.gtexportal.org](http://www.gtexportal.org)). A análise de expressão *in silico* foi conduzida com os SNPs mais associados aos fenótipos estudados (rs3024496, rs3024491 e rs1878672) em sangue total de acordo com o genótipo.

#### 4.7 Análises estatísticas

Inicialmente foi realizada a análise da normalidade da variável nível de produção de IL-10 pelo teste Kolmogorov-smirnov. As diferenças entre médias foram avaliadas utilizando o teste t não pareado para comparar dois grupos, ou Kruskal-Wallis para comparações múltiplas entre os grupos. As análises para associações genéticas foram realizadas por meio da regressão logística nos três modelos genéticos (dominante, aditivo e recessivo) para a associação entre marcadores de IL-10 com asma e com positividade ao SPT para pelo menos um dos aeroalérgenos. Para investigar a associação entre os níveis de IL-10 e os SNPs, utilizou-se uma análise de regressão linear. Todas as análises genéticas foram realizadas com PLINK 1.9 e ajustada por idade, sexo, cor da pele auto-referida e infecção por helmintos. Todos os gráficos foram criados usando o software GraphPad Prism 5.0. Associações com valor de  $p < 0.05$ , foram consideradas estatisticamente significantes.

## 5 RESULTADOS

**Tabela 2.** Características da população segundo os fenótipos de asma e variáveis incluídas neste estudo.

Variáveis	Indivíduos (1426)			Valor de p
	Asma leve (%) (461)	Asma grave (%) (510)	Controle (%) (455)	
<b>Faixa etária</b>				
Idade (Média ± DP)	36,82 ± 12,88	51,67 ± 13,28	43,97 ± 12,55	0,72
<b>Sexo</b>				
Feminino	367	423	391	<b>0,002</b>
Masculino	105	96	64	
<b>Status de asma</b>				
Controlada	131	60	-	<b>0,000</b>
Parcialmente controlada	266	280	-	<b>0,000</b>
Não – controlada	62	170	-	<b>0,000</b>
<b>Reversibilidade</b>				
Teste cutâneo positivo >3mm	-	71	-	-
<b>Pelo menos um dos aeroalérgenos</b>				
Pelo menos um dos aeroalérgenos	302	303	135	<b>0,000</b>
<b>Níveis de IL-10 no plasma (n)</b>				
Média ± DP (pg/mL)	(1,80 ± 1,92)	(2,00 ± 2,34)	(0,07 ± 0,27)	<b>0,000</b>
<b>Infecção por helmintos</b>				
Infecção por helmintos	9	13	12	0,78

Valores estatisticamente significativos são mostrados em negrito. DP, desvio padrão.

A tabela 2 apresenta os dados descritivos da população de estudo que incluem os 1426 indivíduos separados pelos fenótipos de asma. Em nossa população cerca de 62% dos asmáticos (fenótipo leve e grave) foram positivos para marcadores de alergia, caracterizando estes indivíduos, como predominantemente asmáticos atópicos. A maioria dos pacientes com asma grave apresenta status de asma parcialmente controlada ou não controlada, e apenas uma pequena parcela desses indivíduos não responde ao tratamento. Há uma baixa frequência de infecções helmínticas. Além disso, a população é composta em sua maioria por mulheres com idade entre 18 e 64 anos. Houve diferença estatisticamente significativa para sexo ( $p < 0.05$ ), positividade para pelo menos um dos aeroalérgenos

testados ( $P < 0.05$ ) mais frequente em indivíduos asmáticos, e status de asma ( $p < 0.05$ ).

**Tabela 3.** Caracterização dos SNPs estudados no gene da IL-10

<b>Marcador</b>	<b>Posição no cromossomo</b>	<b>Alelo</b>	<b>MAF</b>	<b>Regulome dB score</b>	<b>Função</b>
rs3024496	206941864	C	0.38	5	3'UTR
rs3024491	206945046	T	0.29	6	Intron
rs1878672	206943713	C	0.30	4	Intron
rs1800896	206946897	G	0.32	6	Intron

MAF, frequência do menor alelo.

A tabela 3 mostra a descrição dos quatro SNPs analisados na nossa população. Todos os SNPs apresentaram um MAF (Frequência do Menor Alelo) acima de 25% e estão localizados em regiões não-codificantes.

**Tabela 4.** Frequência dos genótipos para cada SNP na população estudada.

SNP	Genótipo	Asma leve [n(%)]	Asma grave [n(%)]	Controle [n(%)]
<b>rs3024496</b> (n=1386) Alelo (C/T)	TT	167 (36.71%)	184 (37.10%)	178 (40.92%)
	CT	224 (49.23%)	235 (47.38%)	199 (45.75%)
	CC	64 (14.06%)	77 (15.52%)	58 (13.33%)
<b>rs3024491</b> (n=1392) Alelo (G/T)	GG	234 (50.43%)	246 (49.2%)	219 (51.16%)
	TG	188 (40.52%)	204 (40.8%)	177 (41.36%)
	TT	42 (9.05%)	50 (10%)	32 (7.48%)
<b>rs1800896</b> (n=1409) Alelo (A/G)	AA	217 (46.66%)	222 (44.05%)	199 (45.22%)
	AG	200 (43.01%)	225 (44.64%)	201 (45.68%)
	GG	48 (10.33%)	57 (11.31%)	40 (9.1%)
<b>rs1878672</b> (n=1358) Alelo (G/C)	GG	225 (49.13%)	230 (48.83%)	211 (49.18%)
	CG	191 (41.70%)	195 (41.40%)	182 (42.42%)
	CC	42 (9.17%)	46 (9.77%)	36 (8.40%)

A tabela 4 especifica a frequência e distribuição dos genótipos para cada grupo estudado (Controle, asmático leve e asmático grave) considerando todos os SNPs da IL-10 envolvidos no estudo (rs3024496, rs3024491, rs1878672 e rs1800896).

**Tabela 5.** Associação entre SNPs da IL 10 e fenótipos de asma utilizando regressão logística ajustada por sexo, idade, cor da pele e infecção helmíntica.

SNP	Modelo Genético					
	Dominante OR (CI)	P valor	Aditivo OR (CI)	P valor	Recessivo OR (CI)	P valor
<b>Controle x Asma</b>						
rs3024496	1.19(0.94 - 1.50)	0.14	1.12 (0.95 - 1.33)	0.16	1.13 (0.81 - 1.58)	0.46
rs3024491	1.07 (0.85 - 1.35)	0.54	1.09 (0.91 - 1.31)	0.31	1.30 (0.85 - 1.98)	0.22
rs1878672	1.02 (0.99 - 1.00)	0.84	1.03 (0.86 - 1.23)	0.69	1.12 (0.74 - 1.69)	0.56
rs1800896	1.01 (0.80 - 1.27)	1.10	1.04 (0.88 - 1.24)	0.60	1.20 (0.82 - 1.77)	0.33
<b>Controle x Asma grave</b>						
rs3024496	1.21 (0.91 - 1.60)	0.17	1.12 (0.95 - 1.33)	0.16	1.20 (0.81 - 1.77)	0.34
rs3024491	1.09 (0.83 - 1.43)	0.53	1.13 (0.91 - 1.39)	0.25	1.45 (0.89 - 2.36)	0.13
rs1878672	1.04 (0.79 - 1.37)	0.75	1.06 (0.86 - 1.31)	0.54	1.22 (0.75 - 1.97)	0.41
rs1800896	1.09 (0.83 - 1.43)	0.53	1.10 (0.89 - 1.35)	0.36	1.31 (0.84 - 2.05)	0.23
<b>Asma leve x Asma grave</b>						
rs3024496	1.14 (0.83 - 1.58)	0.40	1.15 (0.94 - 1.41)	0.14	1.20 (0.81 - 1.77)	0.34
rs3024491	1.10 (0.81 - 1.49)	0.53	1.13 (0.91 - 1.39)	0.25	1.45 (0.89 - 2.36)	0.13
rs1878672	1.06 (0.78 - 1.45)	0.69	1.06 (0.86 - 1.31)	0.54	1.22 (0.75 - 1.97)	0.41
rs1800896	0.15 (0.85 - 1.58)	0.32	1.10 (0.89 - 1.35)	0.36	1.31 (0.84 - 2.05)	0.23
<b>Asma reversível x Asma irreversível</b>						
rs3024496	0.71 (0.41 - 1.23)	0.22	0.81 (0.54 - 1.20)	0.29	0.86 (0.40 - 1.83)	0.69
rs3024491	1.05 (0.62 - 1.80)	0.83	1.00 (0.67 - 1.50)	0.97	0.88 (0.35 - 2.18)	0.79
rs1878672	1.01 (0.59 - 1.71)	0.95	0.98 (0.65 - 1.46)	0.92	0.87 (0.35 - 2.17)	0.77
rs1800896	1.11 (0.65 - 0.69)	0.34	1.00 (0.65 - 1.46)	0.99	0.76 (0.31 - 1.86)	0.55

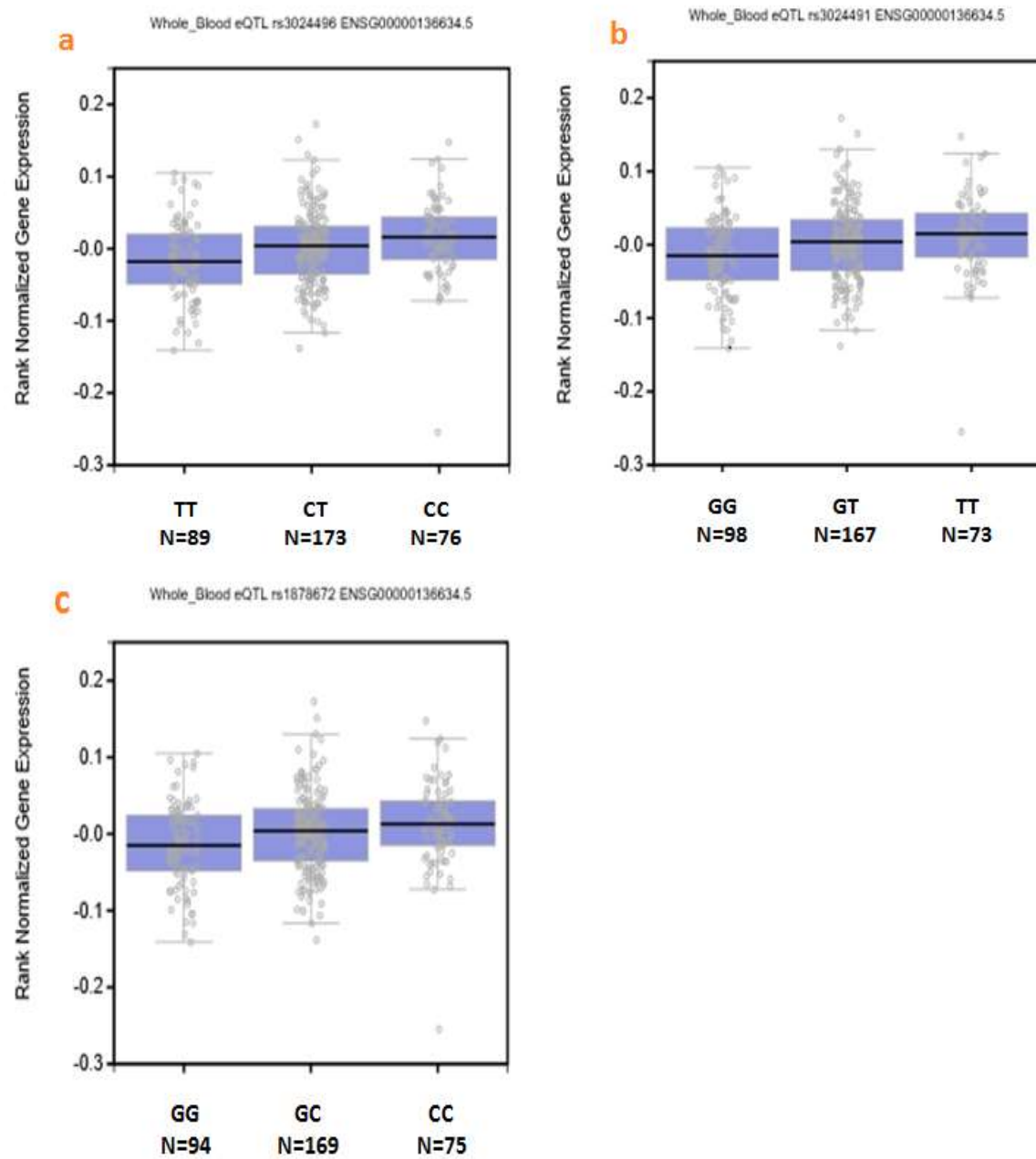
A tabela 5 resume as associações entre os SNPs da IL-10 (rs1878672, rs1800896, rs3024496, rs3024491) e os fenótipos de asma. Foram incluídos controles saudáveis, asmáticos leves, asmáticos graves com e sem reversibilidade. Nenhum dos fenótipos foi associado com os SNPs estudados. ( $p > 0.05$ )

**Tabela 6.** Associações entre os SNPs da IL-10 e os níveis plasmáticos da citocina em modelo aditivo e recessivo. Regressão linear ajustada por sexo, idade, cor da pele e infecção helmíntica.

Marcador	Alelo	BETA	CI	P valor	EMP1
<b>Modelo recessivo</b>					
Concentrações de IL-10 no plasma					
rs3024496	C	1.21	(0.16 - 2.27)	0.02	0.02
rs3024491	T	1.53	(0.14 - 2.96)	0.03	0.02
rs1878672	C	1.55	(0.02 - 3.05)	0.04	0.04
<b>Modelo aditivo</b>					
rs3024496	C	0.58	(0.05 - 1.11)	0.03	0.04

A tabela 6 representa as associações encontradas em modelo genético aditivo e recessivo entre os SNPs da IL-10 e os níveis de IL-10 no plasma dos indivíduos. O alelo C para o SNP rs3024496 foi positivamente associado com os níveis de IL-10 plasmático em modelo recessivo (beta= 1.21; 95% CI 0.16 - 2.27; p=0.02) e em modelo aditivo (beta= 0.58; 95% CI 0.05 - 1.11; p= 0.03). O alelo T para o SNP rs3024491 foi positivamente associado às concentrações de IL-10 no plasma (beta= 1.53; 95% 0.14-2.96; p= 0.03) assim como o alelo C para o SNP rs1878672 foi positivamente associado (beta= 1.55; 95% CI 0.02-3.05; p=0.04) em modelo recessivo. Esses dados sugerem que os indivíduos que apresentam o alelo polimórfico para os SNPs acima citados produzem níveis mais elevados de IL-10 quando comparados a aqueles q não o apresentam.



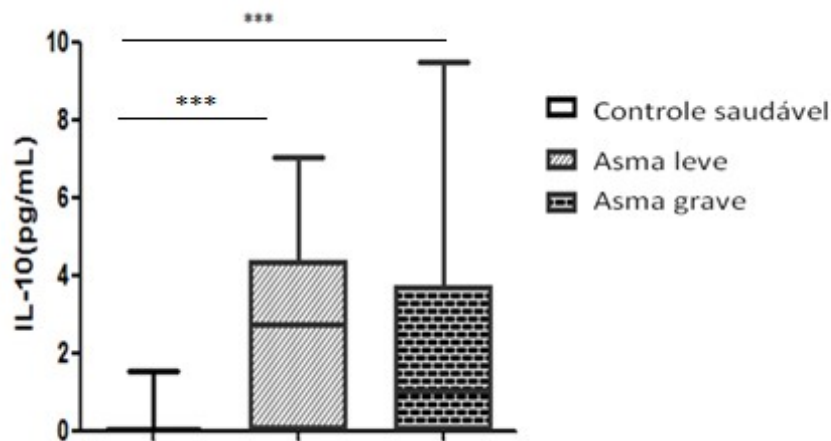


**Figura 8.** Expressão da IL-10 em sangue total para cada genótipo de IL-10 segundo o Gtex.

**Fonte:** Gtex (Projeto de expressão de genótipos em tecidos). [www.gtexportal.org/](http://www.gtexportal.org/)

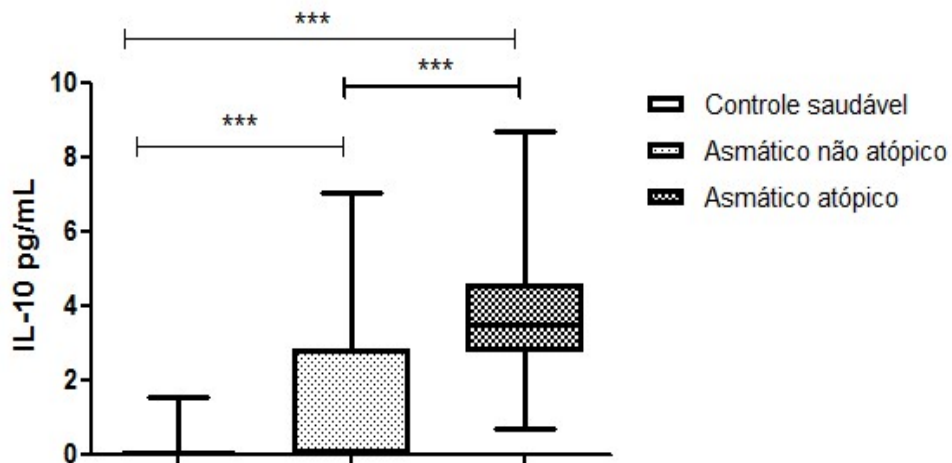
A análise da expressão *in silico* de IL-10 em indivíduos com diferentes genótipos para rs3024496, rs3024491 e rs1878672, são mostrados na Figura 8. Em (a) aqueles indivíduos com o alelo C para o rs3024496 mostraram uma maior expressão de IL-10 em sangue periférico (GTEx p-valor: 0.00034); Em (b) aqueles

indivíduos com alelo T para o rs3024491 apresentaram maior expressão de IL-10 (GTEX p-valor: 0.00061). Em (c) aqueles indivíduos com alelo C para o rs1878672 mostraram maior expressão de IL-10 (GTEX p-valor: 0.0011).



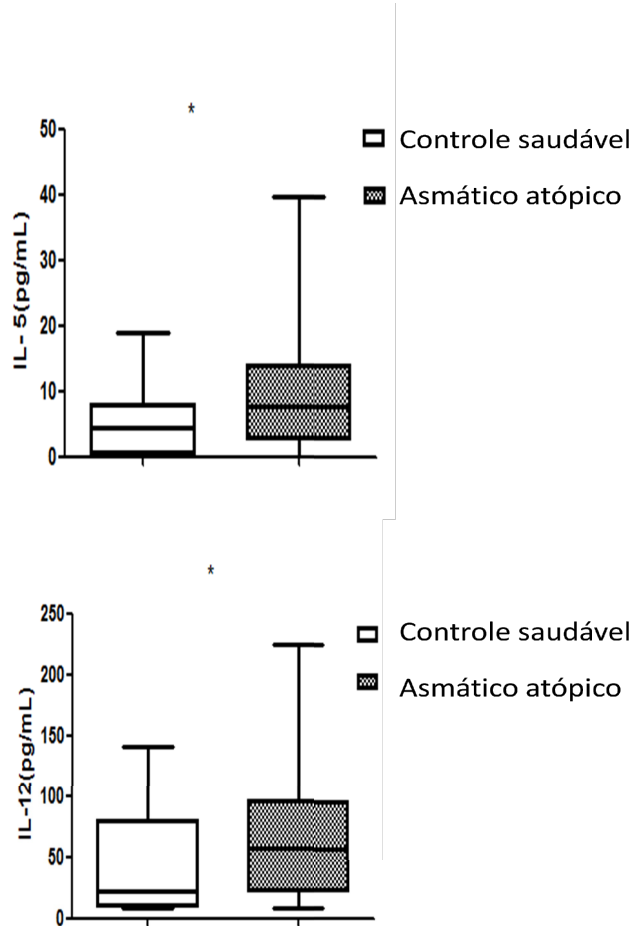
**Figura 9.** Concentrações de IL-10 no plasma de acordo com os fenótipos de asma.

A figura 9 representa as concentrações da IL-10 no plasma dos indivíduos saudáveis, pacientes com asma leve e pacientes com asma grave. Diferenças estatísticas foram encontradas entre os grupos. Os níveis de IL-10 foram superiores nos pacientes com asma leve quando comparados aos indivíduos saudáveis ( $p < 0.0001$ ), assim como o grupo de pacientes com asma grave produziu maiores níveis de IL-10 quando comparados ao grupo de indivíduos saudáveis ( $p < 0.0001$ ).  $n = 31$  Controles saudáveis,  $n = 16$  Pacientes com asma leve,  $n = 68$  Pacientes com asma grave. Não foram encontradas diferenças significativas entre asmáticos leves e asmáticos graves quanto as concentrações da citocina



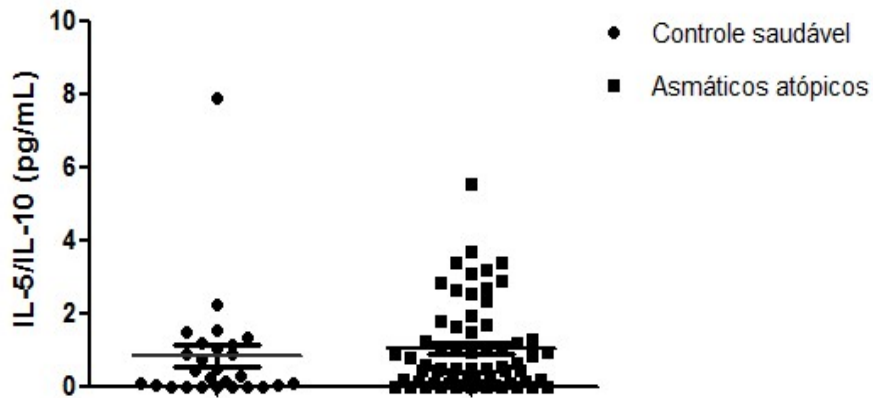
**Figura 10.** Concentrações de IL-10 no plasma de acordo com atopia.

A figura 10 representa as concentrações de IL-10 plasmática entre indivíduos sadios, pacientes asmáticos não atópicos e pacientes asmáticos atópicos. Os níveis de IL-10 no plasma foram significativamente maiores em pacientes asmáticos atópicos ( $p < 0.0001$ ) quando comparados aos outros dois grupos. Assim como os níveis de IL-10 foram significativamente maiores em pacientes asmáticos não atópicos ( $p < 0.0001$ ) quando comparados aos indivíduos saudáveis ( $p < 0.0001$ ).  $n = 50$  Pacientes asmáticos não atópicos,  $n = 26$  Pacientes asmáticos atópicos,  $n = 31$  controles saudáveis.



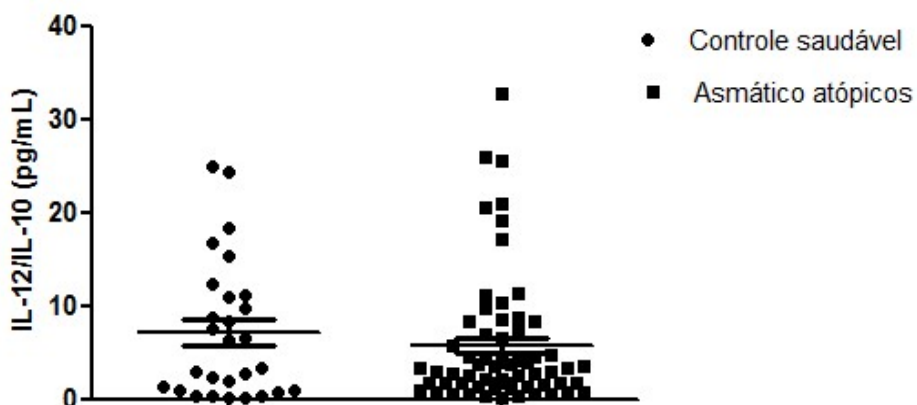
**Figura 11.** Produção de IL-5 and IL-12 entre indivíduos saudáveis e pacientes com asma atópica em sobrenadante de cultura de sangue total.

A figura 11 representa os níveis de IL-5 e IL-12 em sobrenadante de cultura de sangue total entre indivíduos saudáveis e pacientes asmáticos atópicos. Foram encontradas diferenças significativas entre os grupos. Os pacientes com asma atópica apresentaram concentrações de IL-5 e IL-12 superiores quando comparados aos indivíduos saudáveis. IL-5 ( $p=0.024$ ) e IL-12 ( $p=0.035$ ).  $n= 64$  asmáticos atópicos,  $n=26$  controles saudáveis.



**Figura 12.** Razão entre os níveis de IL-5 /IL-10 produzidos em sobrenadante de cultura entre indivíduos saudáveis e pacientes atópicos.

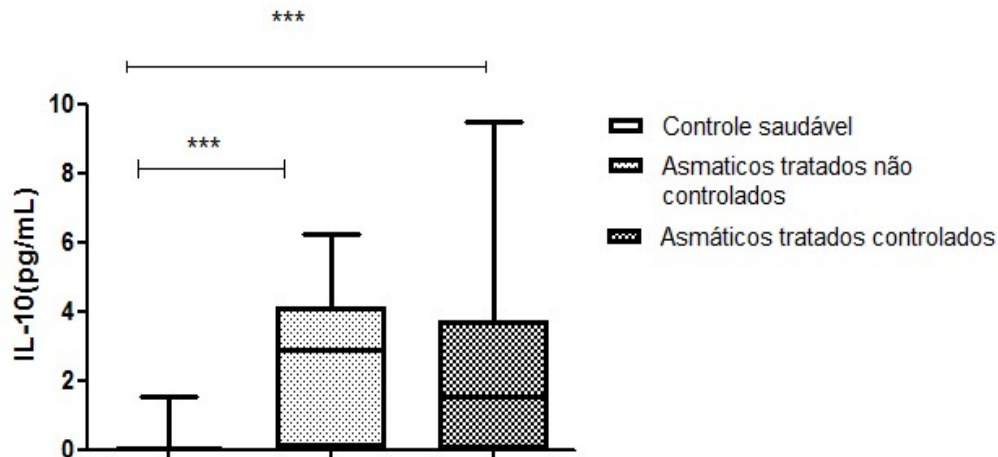
A Figura 12 demonstra a razão das concentrações entre as citocinas IL-5 e IL-10 em sobrenadante de cultura. A razão IL-5/IL-10 produzida foi equivalente entre os grupos de indivíduos saudáveis e asmáticos atópicos ( $p= 0.18$ ).  $n= 64$  asmáticos atópicos,  $n=28$  controle saudável.



**Figura 13.** Razão entre os níveis de IL-12 /IL-10 produzidos em sobrenadante de cultura sem estímulo entre indivíduos saudáveis e pacientes asmáticos atópicos.

A Figura 13 demonstra a razão das concentrações entre as citocinas IL-12 e IL-10 em sobrenadante de cultura sem estímulo. A razão IL-12/IL-10 produzida foi

semelhante entre os indivíduos saudáveis e asmáticos atópicos ( $p= 0.18$ ).  $n= 64$  asmáticos atópicos,  $n=28$  controle saudável.



**Figura 14.** Níveis de IL-10 no plasma entre os grupos de indivíduos saudáveis e pacientes asmáticos, de acordo com tratamento e status da asma.

A figura 14 representa os níveis plasmáticos de IL-10 entre indivíduos saudáveis, pacientes com status de asma não controlada e pacientes com status de asma controlada. Os últimos dois grupos foram tratados com Formoterol (beta-2 adrenérgico de longa ação) e Budesonida (glicocorticoide) regularmente para asma nos últimos três meses. Diferenças significativas foram encontradas entre os grupos. Os pacientes asmáticos controlados apresentaram níveis superiores de IL-10 quando comparados aos indivíduos saudáveis ( $p<0.0001$ ), assim como os pacientes asmáticos controlados tiveram maiores níveis de IL-10 quando comparados aos indivíduos saudáveis ( $p<0.0001$ ). Não houve diferenças significativas entre os grupos asmáticos não controlados e asmáticos controlados ( $p>0.05$ ). Ambos apresentaram níveis semelhantes de IL-10 independente do status da asma.  $n=31$  indivíduos controles saudáveis,  $n= 13$  pacientes asmáticos não controlados e  $n= 39$  pacientes asmáticos controlados.

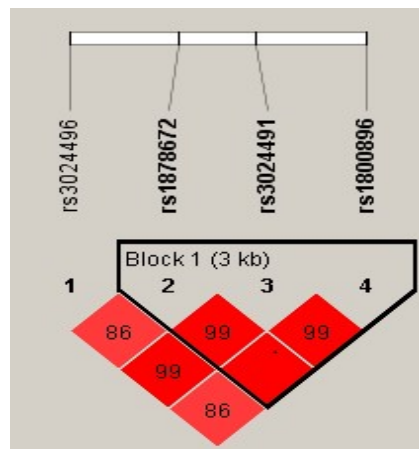
## 6 DISCUSSÃO

Nesse estudo demonstramos o impacto de algumas variantes genéticas da *IL10* sobre a produção da citocina, porém não encontramos uma associação entre esses SNPs estudados com atopia e asma. O gene da IL-10 é um dos genes imunoregulatórios identificados como um candidato à susceptibilidade a asma e atopia (Vercelli 2008; Bottema, Kerkhof et al. 2010). De acordo com Cooper (2012), Noval Rivas (2015) e Burton (2014) a IL-10 pode modular a regulação da resposta alérgica através da atividade de um subconjunto de células-chave envolvidas em reações alérgicas (Cooper, Rodrigues et al. 2012; Burton, Noval Rivas et al. 2014; Noval Rivas, Burton et al. 2015).

Avaliando os marcadores do gene da IL-10 envolvidos no presente estudo, é possível observar que os quatro SNPs analisados estão em alto desequilíbrio de ligação (Figura 15) e estão localizados em regiões não codificantes do genoma (tabela 3), o que pode impactar na taxa de expressão gênica da proteína. Foi encontrada em nossa população uma associação positiva entre três dos SNPs da IL-10 (rs3024496, rs3024491 e rs1878672) e a produção de IL10 no plasma (Tabela 6), mostrando que o indivíduo que apresenta o alelo polimórfico pode produzir maiores níveis da citocina quando comparado a aquele que não porta o alelo.

Essas pequenas mudanças nas seqüências de DNA provavelmente exercem um efeito pequeno, porém discernível na função gênica ou no fenótipo do indivíduo modificado (Pennisi 1998). Esses resultados estão de acordo com os dados obtidos do plataforma de expressão gênica em tecidos, o portal GTEx, que reúne dados acerca da expressão da proteína IL-10 influenciada por variantes genéticas em tecidos humanos (Carithers and Moore 2015). Segundo o GTEx, indivíduos com o alelo polimórfico para os mesmos SNPs aqui citados, apresentam uma expressão maior de IL-10 em sangue total, quando comparados aos indivíduos que não portam o alelo (Figura 8) confirmando que esses polimorfismos podem ter contribuído para os níveis aumentados da citocina produzida.

**Figura 15.** Representação do bloco de haplótipos formados pelos quatro SNPs, mostrando um alto desequilíbrio de ligação entre eles.



Em relação as doenças alérgicas, não encontramos uma associação entre as variantes genéticas da IL-10 com fenótipos de asma e atopia (tabela 5), considerando o diagnóstico de asma de acordo com os padrões e critérios da GINA. Embora diversos estudos em populações distintas demonstrarem essas associações (Kim, Lee et al. 2011; Hyun, Lee et al. 2013; Raeiszadeh Jahromi, Mahesh et al. 2015) os mesmos indivíduos apresentam características étnicas, ambientais e de critérios de diagnóstico da asma diferenciados dos apresentados pela população do ProAR.

Adicionalmente, um outro estudo conduzido por Figueiredo e colaboradores, avaliando os mesmos SNPs e envolvendo crianças residentes de áreas urbanas de Salvador, Bahia também não foi encontrada associação entre essas variantes genéticas e sintomas de asma, porém os SNPs rs1800896 e rs3024496 foram associados com marcadores de atopia e infecções helmínticas (Figueiredo, Barreto et al. 2013). Nesse mesmo estudo, a população apresenta características étnicas, condições de moradia, localização geográfica e exposição a fatores ambientais muito semelhantes a nossa população pesquisada, porém, além de incluírem apenas crianças e adolescentes nesse estudo, há uma alta frequência de infecções helmínticas por parte desses mesmos indivíduos (o que não ocorre em nossa população) e que inclusive, são variáveis importantes para a determinação de asma e atopia (Figueiredo, Barreto et al. 2013). Esses dados sugerem que esses SNPs sozinhos não são capazes de presumir a ocorrência de asma e atopia na população



do ProAR, sendo necessário investigar outros fatores que possam interagir com essas variantes genéticas levando a decorrência desses desfechos.

Ainda avaliando os níveis de IL-10 de acordo com os fenótipos de asma, os níveis de IL-10 plasmático estão aumentados nos grupos de asmáticos (asma leve e grave) quando comparados ao grupo de indivíduos saudáveis (figura 9). No entanto, não houve diferenças significativas entre os níveis de IL-10 produzidos entre os grupos com asma leve e asma grave.

Corroborando com parte dos nossos resultados, Zhang e colaboradores (2013) na China, mostraram que a IL-10 em pacientes asmáticos foi significativamente elevada em comparação aos controles saudáveis e pacientes com pneumonia (Zhang, Luan et al. 2013). No mesmo estudo, os autores também mostraram aumento da produção de células inflamatórias que secretam IL-10 (MDSCs - célula supressora mielóide derivada) em pacientes asmáticos, levando ao aumento da produção da própria citocina (Zhang, Luan et al. 2013). Nossos resultados sinalizam que a citocina IL-10 não pode ser considerada como um marcador de gravidade da asma na população do ProAR.

Em relação aos níveis de IL-10 no plasma de acordo com atopia, os asmáticos atópicos e asmáticos não atópicos apresentaram maiores níveis de IL-10 quando comparados aos indivíduos saudáveis (Figura 10). Além disso, houve diferenças significativas para os níveis de IL-10 entre os dois primeiros grupos, sugerindo que a atopia (positividade para o SPT) interferiu nos níveis da citocina para esses dois grupos. A asma de difícil tratamento (DTA) tem sido associada a um perfil não - atópico, com envolvimento predominante de respostas do tipo Th1 e Th17 (perfil neutrofílico). A asma de caráter não-atópico está associada a quadros de sintomas mais exacerbados e a forma clínica da asma grave é frequentemente caracterizada por difícil manejo, devido à frequente resistência aos esteróides (McKinley, Alcorn et al. 2008).

Considerando que os grupos de indivíduos asmáticos do ProAR, independentemente da atopia são tratados com glicocorticóides inalatórios e que esses fármacos podem interferir na função de diversos tipos celulares e na expressão da IL-10, preconizamos que os níveis de IL-10 nos pacientes asmáticos não- atópicos estão diminuídos comparados aos pacientes atópicos em detrimento de uma falha de resposta frente à terapia com esteróides. Como dito anteriormente na página 20, esses pacientes podem diferir no grau de "falta de resposta a esteróides", logo,

deduzimos que o aumento de IL-10 ocorre porque o indivíduo consegue responder ao tratamento, porém não com a mesma eficácia que o grupo de asmáticos atópicos. Vale ressaltar, que as causas para a resistência ao tratamento com glicocorticóides não estão bem definidas, porém polimorfismos genéticos parecem estar envolvidos neste processo (Winkler, Justice et al. 2015).

No ponto de vista das citocinas produzidas no contexto inflamatório da asma e atopia e a possibilidade do envolvimento de respostas Th1, Th2 e outras na patogênese da asma e Th2 na atopia, avaliamos os níveis de IL-5 e IL-12 nesses indivíduos. Como mostra a figura 11 houve aumento da produção de IL-5 e IL-12 em asmáticos atópicos quando comparados aos indivíduos saudáveis. Esses resultados condizem com o que é descrito na literatura e em outros estudos (Till, Dickason et al. 1997), (Till, Durham et al. 1997) (Barnes 2011).

Tentando presumir a atuação supressora da IL-10 sobre os níveis das citocinas inflamatórias IL-5 e IL-12 avaliamos a razão das concentrações entre as citocinas (IL-5/IL-10) e (IL12/IL-10) em sobrenadante de cultura entre pacientes asmáticos atópicos e indivíduos saudáveis (Figura 13 e 14). Não encontramos diferenças significativas para essas razões entre os dois grupos. Acreditamos, com essas observações, que essa falta de diferença entre os grupos se dá porque na medida em que os níveis de IL-5 e IL-12 aumentam nos pacientes asmáticos atópicos, aumenta-se também os níveis de IL-10 produzida naturalmente e por contribuição também do tratamento com glicocorticóide, atuando na supressão da atividade dessas citocinas com o objetivo de promover a homeostasia. Os níveis de IL-5 e IL-12 estão superiores nos asmáticos atópicos, porém não tão elevados (como classicamente ocorre na atopia) (Humbert, Corrigan et al. 1997; Till, Dickason et al. 1997) em detrimento do efeito da IL-10 e do glicocorticóide.

Como dito anteriormente, um fator que pode influenciar a expressão da IL-10 é o tratamento com glicocorticóides (Asher 2010). Avaliando os efeitos da Budesonida (BUD), medicamento inalatório largamente utilizado no tratamento da asma, um estudo demonstrou que em pacientes com asma persistente leve Budesonida é capaz, *in vivo*, de aumentar a expressão de ICOS, Foxp3 e IL-10 em CD4+/CD25+. Nestes pacientes, estes eventos imunoregulatórios promovidos pelo tratamento com BUD estão associados a benefícios clínicos incluindo melhorias do VEF1 e ausência de sintomas (Pace, Di Sano et al. 2012).

Nessa perspectiva, considerando o potencial efeito dos glicocorticóides sobre a produção de IL-10 e que os pacientes asmáticos fazem uso de terapia combinada de glicocorticoide (Budesonida) e  $\beta$ -2 adrenérgico de longa ação (Formoterol), o resultado descrito na figura 14 sugere que o uso de glicocorticoides contribuem para o aumento dos níveis de IL-10 no plasma dos pacientes tratados com asma. No entanto, como previamente especulado, a IL-10 produzida não é capaz de reverter a gravidade da doença, mas pode suavizar os sintomas clínicos da mesma, bem como melhorar a qualidade de vida dos indivíduos afetados.

Por conseguinte, a IL-10 produzida pode ser considerada como um marcador de resposta ao tratamento. Os mais diversos fatores podem influenciar a resposta ao tratamento do asmático, como o endofenótipo da asma (perfil eosinofílico ou neutrofilico), fatores genéticos individuais, comorbidades e condições agravantes, a exposição constante a agentes sensibilizantes ou irritantes em casa ou no trabalho, além de uma incorreta técnica inalatória (Bousquet, Clark et al. 2007; O'Byrne 2010), o que justifica parte dos pacientes tratados estarem com a doença controlada e a outra parte não controlada, mesmo estes apresentando concentrações de IL-10 no plasma muito semelhantes.

Considerando a atuação da farmacogenômica, os SNPs aqui abordados podem ser relevantes para a resposta dos fármacos no tratamento da asma, principalmente aqueles que agem na via da IL-10, como exemplo, os glicocorticóides. O que poderia explicar o fato de que pacientes tratados com o mesmo fármaco apresentarem diferentes status clínicos para a doença (controlada e não controlada). Deve ser considerado que a interação com outros genes ou principalmente com fatores ambientes diversos pode estar envolvida na regulação da expressão desta proteína.

Embora uma base genética para a asma seja inegável, elucidar certos polimorfismos que contribuem para a doença é muito difícil pela variabilidade do fenótipo clínico, o que é provavelmente devido a múltiplos mecanismos moleculares subjacentes aos complexos processos patológicos envolvidos no desenvolvimento e progressão da doença (Barnes 2011).

## 7 CONCLUSÃO

Em resumo, os nossos resultados demonstram uma forte associação entre variantes genéticas em *IL10* e os níveis da citocina produzida. A produção de IL-10 também variou de acordo com a ocorrência de asma e utilização de glicocorticoide na população do ProAR. Estes dados sinalizam um papel relevante da via da IL-10 no contexto da resposta ao tratamento da asma e reforça a importância de se investigar os possíveis mecanismos e efeitos da exposição ao glicocorticoide, e outros fatores que direta ou indiretamente influenciam na rota da IL-10 sobre a presença desses polimorfismos.

## 8 REFERÊNCIAS

- (1998). "Worldwide variations in the prevalence of asthma symptoms: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC)." *Eur Respir J* **12**(2): 315-335.
- Adcock, I. M., S. J. Lane, et al. (1995). "Differences in binding of glucocorticoid receptor to DNA in steroid-resistant asthma." *J Immunol* **154**(7): 3500-3505.
- Ait-Khaled, N., N. Pearce, et al. (2009). "Global map of the prevalence of symptoms of rhinoconjunctivitis in children: The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Phase Three." *Allergy* **64**(1): 123-148.
- Akbari, O., G. J. Freeman, et al. (2002). "Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS-ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity." *Nat Med* **8**(9): 1024-1032.
- Akdis, M., J. Verhagen, et al. (2004). "Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells." *J Exp Med* **199**(11): 1567-1575.
- Aliberti, J. (2005). "Host persistence: exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma gondii*." *Nat Rev Immunol* **5**(2): 162-170.
- Allen, J. E. and R. M. Maizels (2011). "Diversity and dialogue in immunity to helminths." *Nat Rev Immunol* **11**(6): 375-388.
- Anderson, G. P. (2008). "Endotyping asthma: new insights into key pathogenic mechanisms in a complex, heterogeneous disease." *Lancet* **372**(9643): 1107-1119.
- Antonicelli, L., C. Bucca, et al. (2004). "Asthma severity and medical resource utilisation." *Eur Respir J* **23**(5): 723-729.
- Araujo, M. I., B. Hoppe, et al. (2004). "Impaired T helper 2 response to aeroallergen in helminth-infected patients with asthma." *J Infect Dis* **190**(10): 1797-1803.
- Arock, M., C. Zuany-Amorim, et al. (1996). "Interleukin-10 inhibits cytokine generation from mast cells." *Eur J Immunol* **26**(1): 166-170.
- Asher, M. I. (2010). "Recent perspectives on global epidemiology of asthma in childhood." *Allergol Immunopathol (Madr)* **38**(2): 83-87.
- Bai, T. R., J. M. Vonk, et al. (2007). "Severe exacerbations predict excess lung function decline in asthma." *Eur Respir J* **30**(3): 452-456.
- Baqueiro, T., L. Pontes-de-carvalho, et al. (2007). "Asthma and rhinitis symptoms in individuals from different socioeconomic levels in a Brazilian city." *Allergy Asthma Proc* **28**(3): 362-367.
- Barnes, K. C. (2011). "Genetic studies of the etiology of asthma." *Proc Am Thorac Soc* **8**(2): 143-148.
- Barnes, N. C. and C. J. Miller (2000). "Effect of leukotriene receptor antagonist therapy on the risk of asthma exacerbations in patients with mild to moderate asthma: an integrated analysis of zafirlukast trials." *Thorax* **55**(6): 478-483.
- Barnes, P. J. (2008). "The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease." *J Clin Invest* **118**(11): 3546-3556.
- Barnes, P. J. (2011). "Pathophysiology of allergic inflammation." *Immunol Rev* **242**(1): 31-50.
- Barreto, M. L., C. Ribeiro-Silva Rde, et al. (2014). "Prevalence of asthma symptoms among adolescents in Brazil: National Adolescent School-based Health Survey (PeNSE 2012)." *Rev Bras Epidemiol* **17** Suppl 1: 106-115.
- Bateman, E. D., H. A. Boushey, et al. (2004). "Can guideline-defined asthma control be achieved? The Gaining Optimal Asthma Control study." *Am J Respir Crit Care Med* **170**(8): 836-844.
- Bel, E. H. (2004). "Clinical phenotypes of asthma." *Curr Opin Pulm Med* **10**(1): 44-50.
- Bernstein, I. L., J. T. Li, et al. (2008). "Allergy diagnostic testing: an updated practice parameter." *Ann Allergy Asthma Immunol* **100**(3 Suppl 3): S1-148.
- Borish, L., A. Aarons, et al. (1996). "Interleukin-10 regulation in normal subjects and patients with asthma." *J Allergy Clin Immunol* **97**(6): 1288-1296.

- Bottema, R. W., M. Kerkhof, et al. (2010). "Gene-gene interaction in regulatory T-cell function in atopy and asthma development in childhood." *J Allergy Clin Immunol* **126**(2): 338-346, 346.e331-310.
- Bousquet, J., T. J. Clark, et al. (2007). "GINA guidelines on asthma and beyond." *Allergy* **62**(2): 102-112.
- Brandao, H. V., C. M. Cruz, et al. (2009). "Hospitalizations for asthma: impact of a program for the control of asthma and allergic rhinitis in Feira de Santana, Brazil." *J Bras Pneumol* **35**(8): 723-729.
- Buelens, C., V. Verhasselt, et al. (1997). "Interleukin-10 prevents the generation of dendritic cells from human peripheral blood mononuclear cells cultured with interleukin-4 and granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor." *Eur J Immunol* **27**(3): 756-762.
- Burton, O. T., M. Noval Rivas, et al. (2014). "Immunoglobulin E signal inhibition during allergen ingestion leads to reversal of established food allergy and induction of regulatory T cells." *Immunity* **41**(1): 141-151.
- Busse, M., M. Krech, et al. (2012). "ICOS mediates the generation and function of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells conveying respiratory tolerance." *J Immunol* **189**(4): 1975-1982.
- Carithers, L. J. and H. M. Moore (2015). "The Genotype-Tissue Expression (GTEx) Project." *Biopreserv Biobank* **13**(5): 307-308.
- Chauhan, B. F. and F. M. Ducharme (2012). "Anti-leukotriene agents compared to inhaled corticosteroids in the management of recurrent and/or chronic asthma in adults and children." *Cochrane Database Syst Rev*(5): CD002314.
- Chen, H., P. D. Blanc, et al. (2008). "Assessing productivity loss and activity impairment in severe or difficult-to-treat asthma." *Value Health* **11**(2): 231-239.
- Cho, S. H., L. A. Stanciu, et al. (2005). "Increased interleukin-4, interleukin-5, and interferon-gamma in airway CD4+ and CD8+ T cells in atopic asthma." *Am J Respir Crit Care Med* **171**(3): 224-230.
- Cooper, P. J., L. C. Rodrigues, et al. (2012). "Influence of poverty and infection on asthma in Latin America." *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **12**(2): 171-178.
- Cooper, P. J., L. C. Rodrigues, et al. (2009). "Asthma in Latin America: a public health challenge and research opportunity." *Allergy* **64**(1): 5-17.
- Currie, G. P., J. G. Douglas, et al. (2009). "Difficult to treat asthma in adults." *BMJ* **338**: b494.
- de Prost, N., E. L. Costa, et al. (2013). "Effects of ventilation strategy on distribution of lung inflammatory cell activity." *Crit Care* **17**(4): R175.
- Dicpinigaitis, P. V., J. B. Dobkin, et al. (2002). "Antitussive effect of the leukotriene receptor antagonist zafirlukast in subjects with cough-variant asthma." *J Asthma* **39**(4): 291-297.
- Drazen, J. M. (1999). "Asthma therapy with agents preventing leukotriene synthesis or action." *Proc Assoc Am Physicians* **111**(6): 547-559.
- Figueiredo, C. A., N. M. Alcantara-Neves, et al. (2009). "Spontaneous cytokine production in children according to biological characteristics and environmental exposures." *Environ Health Perspect* **117**(5): 845-849.
- Figueiredo, C. A., M. L. Barreto, et al. (2013). "Coassociations between IL10 polymorphisms, IL-10 production, helminth infection, and asthma/wheeze in an urban tropical population in Brazil." *J Allergy Clin Immunol* **131**(6): 1683-1690.
- Figueiredo, C. A., C. R. Marques, et al. (2014). "Cytokines, cytokine gene polymorphisms and Helicobacter pylori infection: friend or foe?" *World J Gastroenterol* **20**(18): 5235-5243.
- Fiorentino, D. F., A. Zlotnik, et al. (1991). "IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells." *J Immunol* **146**(10): 3444-3451.
- Gazzinelli, R. T., I. P. Oswald, et al. (1992). "IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN-gamma-activated macrophages." *J Immunol* **148**(6): 1792-1796.
- Grant, A. V., M. I. Araujo, et al. (2011). "Polymorphisms in IL10 are associated with total Immunoglobulin E levels and Schistosoma mansoni infection intensity in a Brazilian population." *Genes Immun* **12**(1): 46-50.

- Greening, A. P., P. W. Ind, et al. (1994). "Added salmeterol versus higher-dose corticosteroid in asthma patients with symptoms on existing inhaled corticosteroid. Allen & Hanburys Limited UK Study Group." *Lancet* **344**(8917): 219-224.
- Grimm, L. M., A. L. Goldberg, et al. (1996). "Proteasomes play an essential role in thymocyte apoptosis." *EMBO J* **15**(15): 3835-3844.
- Grunig, G., D. B. Corry, et al. (1997). "Interleukin-10 is a natural suppressor of cytokine production and inflammation in a murine model of allergic bronchopulmonary aspergillosis." *J Exp Med* **185**(6): 1089-1099.
- Hawrylowicz, C. M. and A. O'Garra (2005). "Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma." *Nat Rev Immunol* **5**(4): 271-283.
- Heaton, T., J. Rowe, et al. (2005). "An immunoepidemiological approach to asthma: identification of in-vitro T-cell response patterns associated with different wheezing phenotypes in children." *Lancet* **365**(9454): 142-149.
- Humbert, M., C. J. Corrigan, et al. (1997). "Relationship between IL-4 and IL-5 mRNA expression and disease severity in atopic asthma." *Am J Respir Crit Care Med* **156**(3 Pt 1): 704-708.
- Hyun, M. H., C. H. Lee, et al. (2013). "Interleukin-10 promoter gene polymorphisms and susceptibility to asthma: a meta-analysis." *PLoS One* **8**(1): e53758.
- Irwin, R. S., F. J. Curley, et al. (1993). "Difficult-to-control asthma. Contributing factors and outcome of a systematic management protocol." *Chest* **103**(6): 1662-1669.
- Jackson, D. J., T. V. Hartert, et al. (2014). "Asthma: NHLBI Workshop on the Primary Prevention of Chronic Lung Diseases." *Ann Am Thorac Soc* **11** Suppl 3: S139-145.
- Jaeschke, R., P. M. O'Byrne, et al. (2008). "The safety of long-acting beta-agonists among patients with asthma using inhaled corticosteroids: systematic review and metaanalysis." *Am J Respir Crit Care Med* **178**(10): 1009-1016.
- Jeffery, P. K., R. W. Godfrey, et al. (1992). "Effects of treatment on airway inflammation and thickening of basement membrane reticular collagen in asthma. A quantitative light and electron microscopic study." *Am Rev Respir Dis* **145**(4 Pt 1): 890-899.
- Juniper, E. F., P. A. Kline, et al. (1990). "Effect of long-term treatment with an inhaled corticosteroid (budesonide) on airway hyperresponsiveness and clinical asthma in nonsteroid-dependent asthmatics." *Am Rev Respir Dis* **142**(4): 832-836.
- Juniper, E. F., K. Svensson, et al. (1999). "Asthma quality of life during 1 year of treatment with budesonide with or without formoterol." *Eur Respir J* **14**(5): 1038-1043.
- Kabesch, M., M. Depner, et al. (2007). "Polymorphisms in eosinophil pathway genes, asthma and atopy." *Allergy* **62**(4): 423-428.
- Kesten, S., K. R. Chapman, et al. (1991). "A three-month comparison of twice daily inhaled formoterol versus four times daily inhaled albuterol in the management of stable asthma." *Am Rev Respir Dis* **144**(3 Pt 1): 622-625.
- Kim, K. W., K. E. Lee, et al. (2011). "Involvement of IL-10 gene promoter polymorphisms in the susceptibility for childhood asthma." *Lung* **189**(5): 417-423.
- Koberle, B., B. Koch, et al. (2016). "Single nucleotide polymorphisms in DNA repair genes and putative cancer risk." *Arch Toxicol* **90**(10): 2369-2388.
- Lambrecht, B. N. and H. Hammad (2015). "The immunology of asthma." *Nat Immunol* **16**(1): 45-56.
- Lauzon, A. M. and J. G. Martin (2016). "Airway hyperresponsiveness; smooth muscle as the principal actor." *F1000Res* **5**.
- Ledford, D. K. and R. F. Lockey (2013). "Asthma and comorbidities." *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **13**(1): 78-86.
- Lee, J. H., T. Haselkorn, et al. (2007). "Risk factors associated with persistent airflow limitation in severe or difficult-to-treat asthma: insights from the TENOR study." *Chest* **132**(6): 1882-1889.
- Liang, R., L. Wang, et al. (2013). "New insight into genes in association with asthma: literature-based mining and network centrality analysis." *Chin Med J (Engl)* **126**(13): 2472-2479.
- Lim, S., E. Crawley, et al. (1998). "Haplotype associated with low interleukin-10 production in patients with severe asthma." *Lancet* **352**(9122): 113.

- Lipworth, B. J. (1999). "Leukotriene-receptor antagonists." *Lancet* **353**(9146): 57-62.
- Liu, Y., S. H. Wei, et al. (1994). "Expression cloning and characterization of a human IL-10 receptor." *J Immunol* **152**(4): 1821-1829.
- Louten, J., K. Boniface, et al. (2009). "Development and function of TH17 cells in health and disease." *J Allergy Clin Immunol* **123**(5): 1004-1011.
- MacGlashan, D., Jr. (2008). "IgE receptor and signal transduction in mast cells and basophils." *Curr Opin Immunol* **20**(6): 717-723.
- Martinez, F. D. and D. Vercelli (2013). "Asthma." *Lancet* **382**(9901): 1360-1372.
- Matsumoto, K., H. Inoue, et al. (2004). "Decrease of interleukin-10-producing T cells in the peripheral blood of severe unstable atopic asthmatics." *Int Arch Allergy Immunol* **134**(4): 295-302.
- McKinley, L., J. F. Alcorn, et al. (2008). "TH17 cells mediate steroid-resistant airway inflammation and airway hyperresponsiveness in mice." *J Immunol* **181**(6): 4089-4097.
- Medeiros, M., Jr., J. P. Figueiredo, et al. (2003). "Schistosoma mansoni infection is associated with a reduced course of asthma." *J Allergy Clin Immunol* **111**(5): 947-951.
- Mendonça, L. R., R. V. Veiga, et al. (2012). "Toxocara seropositivity, atopy and wheezing in children living in poor neighbourhoods in urban Latin American." *PLoS Negl Trop Dis* **6**(11): e1886.
- Moffatt, M. F., M. Kabesch, et al. (2007). "Genetic variants regulating ORMDL3 expression contribute to the risk of childhood asthma." *Nature* **448**(7152): 470-473.
- Moore, K. W., R. de Waal Malefyt, et al. (2001). "Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor." *Annu Rev Immunol* **19**: 683-765.
- Moore, W. C., D. A. Meyers, et al. (2010). "Identification of asthma phenotypes using cluster analysis in the Severe Asthma Research Program." *Am J Respir Crit Care Med* **181**(4): 315-323.
- Murcia, R. Y., A. Vargas, et al. (2016). "The Interleukin-17 Induced Activation and Increased Survival of Equine Neutrophils Is Insensitive to Glucocorticoids." *PLoS One* **11**(5): e0154755.
- Normansell, R., S. Walker, et al. (2014). "Omalizumab for asthma in adults and children." *Cochrane Database Syst Rev*(1): CD003559.
- Noval Rivas, M., O. T. Burton, et al. (2015). "Regulatory T cell reprogramming toward a Th2-cell-like lineage impairs oral tolerance and promotes food allergy." *Immunity* **42**(3): 512-523.
- Noval Rivas, M. and T. A. Chatila (2016). "Regulatory T cells in allergic diseases." *J Allergy Clin Immunol* **138**(3): 639-652.
- O'Byrne, P. M. (2010). "Global guidelines for asthma management: summary of the current status and future challenges." *Pol Arch Med Wewn* **120**(12): 511-517.
- O'Byrne, P. M., P. J. Barnes, et al. (2001). "Low dose inhaled budesonide and formoterol in mild persistent asthma: the OPTIMA randomized trial." *Am J Respir Crit Care Med* **164**(8 Pt 1): 1392-1397.
- O'Byrne, P. M., S. Pedersen, et al. (2009). "Severe exacerbations and decline in lung function in asthma." *Am J Respir Crit Care Med* **179**(1): 19-24.
- Ober, C. and S. Hoffjan (2006). "Asthma genetics 2006: the long and winding road to gene discovery." *Genes Immun* **7**(2): 95-100.
- Oettgen, H. C. and R. S. Geha (1999). "IgE in asthma and atopy: cellular and molecular connections." *J Clin Invest* **104**(7): 829-835.
- Pace, E., C. Di Sano, et al. (2012). "Multiple in vitro and in vivo regulatory effects of budesonide in CD4+ T lymphocyte subpopulations of allergic asthmatics." *PLoS One* **7**(12): e48816.
- Pauwels, R. A., C. G. Lofdahl, et al. (1997). "Effect of inhaled formoterol and budesonide on exacerbations of asthma. Formoterol and Corticosteroids Establishing Therapy (FACET) International Study Group." *N Engl J Med* **337**(20): 1405-1411.
- Pearce, N., N. Ait-Khaled, et al. (2007). "Worldwide trends in the prevalence of asthma symptoms: phase III of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC)." *Thorax* **62**(9): 758-766.
- Pearce, N., J. Sunyer, et al. (2000). "Comparison of asthma prevalence in the ISAAC and the ECRHS. ISAAC Steering Committee and the European Community Respiratory Health Survey. International Study of Asthma and Allergies in Childhood." *Eur Respir J* **16**(3): 420-426.



- Pearlman, D. S., P. Chervinsky, et al. (1992). "A comparison of salmeterol with albuterol in the treatment of mild-to-moderate asthma." *N Engl J Med* **327**(20): 1420-1425.
- Pedersen, S. E., S. S. Hurd, et al. (2011). "Global strategy for the diagnosis and management of asthma in children 5 years and younger." *Pediatr Pulmonol* **46**(1): 1-17.
- Pennisi, E. (1998). "A closer look at SNPs suggests difficulties." *Science* **281**(5384): 1787-1789.
- Ponte, E., R. A. Franco, et al. (2007). "Impact that a program to control severe asthma has on the use of Unified Health System resources in Brazil." *J Bras Pneumol* **33**(1): 15-19.
- Ponte, E. V., F. Lima, et al. (2006). "Skin test reactivity and Der p-induced interleukin 10 production in patients with asthma or rhinitis infected with *Ascaris*." *Ann Allergy Asthma Immunol* **96**(5): 713-718.
- Raeiszadeh Jahromi, S., P. A. Mahesh, et al. (2015). "IL-10 and IL-17F Promoter Single Nucleotide Polymorphism and Asthma: A Case-Control Study in South India." *Lung* **193**(5): 739-747.
- Rank, M. A., J. B. Hagan, et al. (2013). "The risk of asthma exacerbation after stopping low-dose inhaled corticosteroids: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials." *J Allergy Clin Immunol* **131**(3): 724-729.
- Read, S. and F. Powrie (2001). "CD4(+) regulatory T cells." *Curr Opin Immunol* **13**(6): 644-649.
- Robinson, D. S. (2010). "The role of the T cell in asthma." *J Allergy Clin Immunol* **126**(6): 1081-1091; quiz 1092-1083.
- Rodrigues, L. C., P. J. Newcombe, et al. (2008). "Early infection with *Trichuris trichiura* and allergen skin test reactivity in later childhood." *Clin Exp Allergy* **38**(11): 1769-1777.
- Rook, G. A. (2007). "The hygiene hypothesis and the increasing prevalence of chronic inflammatory disorders." *Trans R Soc Trop Med Hyg* **101**(11): 1072-1074.
- Royer, B., S. Varadaradjalou, et al. (2001). "Inhibition of IgE-induced activation of human mast cells by IL-10." *Clin Exp Allergy* **31**(5): 694-704.
- Sadatsafavi, M., R. Rousseau, et al. (2014). "The preventable burden of productivity loss due to suboptimal asthma control: a population-based study." *Chest* **145**(4): 787-793.
- Samitas, K., V. Delimpoura, et al. (2015). "Anti-IgE treatment, airway inflammation and remodelling in severe allergic asthma: current knowledge and future perspectives." *Eur Respir Rev* **24**(138): 594-601.
- Samitas, K., J. Lotvall, et al. (2010). "B cells: from early development to regulating allergic diseases." *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **58**(3): 209-225.
- Scanlon, S. T. and A. N. McKenzie (2012). "Type 2 innate lymphoid cells: new players in asthma and allergy." *Curr Opin Immunol* **24**(6): 707-712.
- Sher, E. R., D. Y. Leung, et al. (1994). "Steroid-resistant asthma. Cellular mechanisms contributing to inadequate response to glucocorticoid therapy." *J Clin Invest* **93**(1): 33-39.
- Shevach, E. M. (2002). "CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers." *Nat Rev Immunol* **2**(6): 389-400.
- Shrewsbury, S., S. Pyke, et al. (2000). "Meta-analysis of increased dose of inhaled steroid or addition of salmeterol in symptomatic asthma (MIASMA)." *BMJ* **320**(7246): 1368-1373.
- Simoes, S. M., S. S. Cunha, et al. (2010). "Distribution of severity of asthma in childhood." *J Pediatr (Rio J)* **86**(5): 417-423.
- Simons, F. E., L. R. Arduzzo, et al. (2011). "World allergy organization guidelines for the assessment and management of anaphylaxis." *World Allergy Organ J* **4**(2): 13-37.
- Siroux, V. and J. Garcia-Aymerich (2011). "The investigation of asthma phenotypes." *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **11**(5): 393-399.
- Smart, J. M. and A. S. Kemp (2002). "Increased Th1 and Th2 allergen-induced cytokine responses in children with atopic disease." *Clin Exp Allergy* **32**(5): 796-802.
- Smits, W. and K. Letz (2007). "Managing difficult-to-treat asthma: Lessons from a center of excellence in allergy and asthma care." *J Med Pract Manage* **22**(6): 350-358.
- Sole, D., I. C. Camelo-Nunes, et al. (2006). "Prevalence of atopic eczema and related symptoms in Brazilian schoolchildren: results from the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) phase 3." *J Investig Allergol Clin Immunol* **16**(6): 367-376.

- Stelmach, I., J. Jerzynska, et al. (2002). "A randomized, double-blind trial of the effect of glucocorticoid, antileukotriene and beta-agonist treatment on IL-10 serum levels in children with asthma." *Clin Exp Allergy* **32**(2): 264-269.
- Strina, A., M. L. Barreto, et al. (2014). "Risk factors for non-atopic asthma/wheeze in children and adolescents: a systematic review." *Emerg Themes Epidemiol* **11**: 5.
- Sullivan, S. D., L. Rasouliyan, et al. (2007). "Extent, patterns, and burden of uncontrolled disease in severe or difficult-to-treat asthma." *Allergy* **62**(2): 126-133.
- Takanashi, S., R. Nonaka, et al. (1994). "Interleukin 10 inhibits lipopolysaccharide-induced survival and cytokine production by human peripheral blood eosinophils." *J Exp Med* **180**(2): 711-715.
- Taylor, A., M. Akdis, et al. (2007). "IL-10 inhibits CD28 and ICOS costimulations of T cells via src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase 1." *J Allergy Clin Immunol* **120**(1): 76-83.
- Taylor, A., J. Verhagen, et al. (2004). "T regulatory cells in allergy and health: a question of allergen specificity and balance." *Int Arch Allergy Immunol* **135**(1): 73-82.
- Till, S., R. Dickason, et al. (1997). "IL-5 secretion by allergen-stimulated CD4+ T cells in primary culture: relationship to expression of allergic disease." *J Allergy Clin Immunol* **99**(4): 563-569.
- Till, S., S. Durham, et al. (1997). "IL-13 production by allergen-stimulated T cells is increased in allergic disease and associated with IL-5 but not IFN-gamma expression." *Immunology* **91**(1): 53-57.
- To, T., S. Stanojevic, et al. (2012). "Global asthma prevalence in adults: findings from the cross-sectional world health survey." *BMC Public Health* **12**: 204.
- Turner, D. M., D. M. Williams, et al. (1997). "An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter." *Eur J Immunogenet* **24**(1): 1-8.
- Vercelli, D. (2008). "Discovering susceptibility genes for asthma and allergy." *Nat Rev Immunol* **8**(3): 169-182.
- Walter, M. R. (2014). "The molecular basis of IL-10 function: from receptor structure to the onset of signaling." *Curr Top Microbiol Immunol* **380**: 191-212.
- Walter, M. R. and T. L. Nagabhushan (1995). "Crystal structure of interleukin 10 reveals an interferon gamma-like fold." *Biochemistry* **34**(38): 12118-12125.
- Wang, D., W. Xiao, et al. (2013). "Cross-sectional epidemiological survey of asthma in Jinan, China." *Respirology* **18**(2): 313-322.
- Wenzel, S. (2005). "Severe asthma in adults." *Am J Respir Crit Care Med* **172**(2): 149-160.
- Wenzel, S. E. (2006). "Asthma: defining of the persistent adult phenotypes." *Lancet* **368**(9537): 804-813.
- Wenzel, S. E. (2012). "Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches." *Nat Med* **18**(5): 716-725.
- Wenzel, S. E., W. Lumry, et al. (1998). "Efficacy, safety, and effects on quality of life of salmeterol versus albuterol in patients with mild to moderate persistent asthma." *Ann Allergy Asthma Immunol* **80**(6): 463-470.
- Wing, K. and S. Sakaguchi (2006). "Regulatory T cells as potential immunotherapy in allergy." *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **6**(6): 482-488.
- Winkler, T. W., A. E. Justice, et al. (2015). "The Influence of Age and Sex on Genetic Associations with Adult Body Size and Shape: A Large-Scale Genome-Wide Interaction Study." *PLoS Genet* **11**(10): e1005378.
- Woolcock, A., B. Lundback, et al. (1996). "Comparison of addition of salmeterol to inhaled steroids with doubling of the dose of inhaled steroids." *Am J Respir Crit Care Med* **153**(5): 1481-1488.
- Yang, X., Y. Jiang, et al. (2016). "Does IL-17 Respond to the Disordered Lung Microbiome and Contribute to the Neutrophilic Phenotype in Asthma?" *Mediators Inflamm* **2016**: 6470364.
- Yazdanbakhsh, M., P. G. Kremsner, et al. (2002). "Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis." *Science* **296**(5567): 490-494.
- Zhang, Y. L., B. Luan, et al. (2013). "Peripheral blood MDSCs, IL-10 and IL-12 in children with asthma and their importance in asthma development." *PLoS One* **8**(5): e63775.

Zhu, Z., R. J. Homer, et al. (1999). "Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production." J Clin Invest **103**(6): 779-788.