



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**



REGINA SANTOS NASCIMENTO

TRABALHO DE TESE

**AVALIAÇÃO FUNCIONAL DE POLIMORFISMOS NOS GENES *EBI3* E *IL12A*
ASSOCIADOS AO DESENVOLVIMENTO DE ASMA EM UMA COORTE DE
CRIANÇAS DO MUNICÍPIO DE SALVADOR-BA**

Salvador, BA
2023

REGINA SANTOS NASCIMENTO

**AVALIAÇÃO FUNCIONAL DE POLIMORFISMOS NOS GENES *EBI3* E *IL12A*
ASSOCIADOS AO DESENVOLVIMENTO DE ASMA EM UMA COORTE DE
CRIANÇAS DO MUNICÍPIO DE SALVADOR-BA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Imunologia do Instituto de Ciências da Saúde,
Universidade Federal da Bahia, como requisito
parcial para obtenção do título de Doutora em
Imunologia

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Camila Alexandrina
Figueiredo

Salvador, BA
2023

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA),
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

N244 Nascimento, Regina Santos
Avaliação funcional de polimorfismos nos genes EBI3 e IL12A
associados ao desenvolvimento de asma em uma coorte de crianças do
município de Salvador-Ba. / Regina Santos Nascimento . - - Salvador,
2023.
54 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Camila Alexandrina Figueiredo.
Tese (doutorado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto de
Ciências da Saúde, Programa de Doutorado em Imunologia. 2023.

1. IL-35. 2. EBI3. 3. IL12A. 4. Células regulatórias.
5. Imunogenética. I. Figueiredo, Camila Alexandrina, oriente.
II. Título.

CDU: 616.248-053.2

Dedico à Deus por se mostrar sempre presente na minha vida, especialmente nos momentos mais difíceis, e aos meus pais, por todo amor.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelas infinitas bênçãos concedidas em todos os momentos de da minha vida.

Aos meus pais, Maria Edésia e Josemá Bispo, pelo amor imensurável, compreensão e incentivo que movem a minha trajetória.

À Universidade Federal da Bahia por todas as oportunidades concedidas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia pela oportunidade de desenvolver este trabalho e me aperfeiçoar academicamente.

À minha orientadora, Dr^a Camila Alexandrina Figueiredo, por todo apoio na longa jornada que foi o desenvolvimento desta tese. Por toda paciência, incentivo, confiança e cuidado, especialmente nos difíceis momentos de fragilidade psíquica. Muito obrigada, Camila!

Ao projeto SCAALA, bem como professores e colaboradores envolvidos, sem os quais este trabalho não seria desenvolvido, em especial ao Prof. Dr. Maurício Lima Barreto, e a todos os pacientes e seus familiares, sem os quais, não seria possível este trabalho.

À Milca, por me acompanhar em todas as etapas experimentais. Sem sua companhia e amizade este trabalho não seria possível.

À Jéssica, pela amizade e incentivo na fase da escrita desta tese. Por diversas vezes estivemos juntas, mesmo a distância, nos apoiando na escrita dos nossos trabalhos. Obrigada por tudo <3.

Às agências de fomento CNPq, Capes e Fapesb pelo suporte financeiro para o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos meus amigos e familiares que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

*“E lembre-se sempre, na tristeza ou na
felicidade, que isso também passa.”*

Chico Xavier

RESUMO

NASCIMENTO, Regina Santos. Avaliação funcional de polimorfismos nos genes *EBI3* e *IL12A* associados ao desenvolvimento de asma em uma coorte de crianças do município de Salvador-BA. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia.

A asma é doença inflamatória crônica das vias aéreas, de caráter não transmissível, influenciada por fatores ambientais e genéticos. A asma alérgica é o fenótipo mais comum da doença e está associada com a exacerbação da resposta imune Th2. Vários tipos celulares estão envolvidos na regulação do sistema imunológico no pulmão, com destaque para as células T e B regulatórias. Diversos mecanismos inibitórios desenvolvidos por estas células já foram descritos, dentre os quais estão a liberação de citocinas supressoras como IL-10, TGF- β e IL-35. A IL-35 é uma citocina heterodimérica, composta pelas subunidades *EBI3* e *IL12p35*, que são codificadas respectivamente pelos genes *EBI3* e *IL12A*. Alterações nos níveis dessa citocina têm sido associadas a asma e atopia. A relevância do componente genético no desenvolvimento da asma é amplamente discutida na literatura. Nesse contexto, dada a importância das células Treg e da susceptibilidade genética, este estudo se propôs a investigar o impacto funcional de polimorfismos nos genes regulatórios *EBI3* e *IL12A* em uma população de crianças brasileiras. O DNA de 1.218 crianças foi genotipado usando o Illumina 2.5 Human Chip Omni Bead. Análises de regressão logística foram realizadas usando o software PLINK 1.9 para verificar a associação entre os polimorfismos em *EBI3* e *IL12A*, asma e marcadores atópicos, ajustados para sexo, idade, infecções por helmintos e marcadores de ancestralidade. A expressão do mRNA foi realizada usando qPCR em tempo real. Um total de 4 marcadores para *IL12A* e 5 para *EBI3* foram encontrados. Os resultados mostraram que o alelo C de rs2243131 em *IL12A* foi positivamente associado à asma (OR 1.35, CI 1.06–1.71), gravidade de asma (OR 1.36, CI 1.02–1.81), teste cutâneo positivo para *Blatella germanica* (OR 1.59, CI 1.09–2.22), e também positivamente associado para a produção espontânea da produção de IL-5 (OR: 1.71; CI: 1.11–2.62). O alelo A de rs568408 em *IL12A* também foi positivamente associado ao teste cutâneo positivo para *B. germanica* (OR 1.65, CI 1.10–2, 37). Já o rs582537 em *IL12A* foi negativamente associado ao teste cutâneo positivo para *B. germanica* (OR 0.64, CI 0.42–0.98) e *Dermatophagoides pteronyssinus* (OR 0.77, CI 0.60–0.98), além de negativamente associado com a produção espontânea de INF- γ (OR: 0.52; CI: 0.52–0.99). Com relação a *EBI3*, todas as variantes encontradas foram negativamente associadas a marcadores de atopia: o alelo C de rs78749916 (OR 0.61, CI 0.40–0.93), o alelo G de rs77145509 (OR 0.66, CI 0.46–0.94), e o alelo A de rs76353132 (OR 0.68, CI 0.43–0.96), foram negativamente associados ao teste cutâneo positivo para *Periplaneta americana*. A variante rs76353132 também foi negativamente associada a produção espontânea de INF- γ (OR: 0.72; CI: 0.52–0.99). O alelo C de rs428253 foi negativamente associado com teste cutâneo positivo para pelo menos um alérgeno (OR: 0.64; CI: 0.44–0.92), e o alelo G de rs4905 foi negativamente associado com IgE positivo para pelo menos um alérgeno (OR 0.62, CI 0.40–0.95). Os níveis de expressão do mRNA de *IL12A* foram reduzidos em indivíduos asmáticos atópicos quando comparados aos controles. Os níveis de expressão de mRNA *EBI3* foram diminuídos em indivíduos asmáticos atópicos em comparação com indivíduos não asmáticos e atópicos, e quando comparados aos controles. Neste estudo pudemos, pela primeira vez, descrever novas variantes na via regulatória da IL-35 ligada à asma e atopia, destacando a importância da regulação imune na patogênese da asma. **Palavras-chave:** IL-35, *EBI3*, *IL12A*, células regulatórias, imunogenética.

ABSTRACT

NASCIMENTO, Regina Santos. Functional evaluation of polymorphisms in the *EBI3* and *IL12A* genes associated with the development of asthma in a cohort of children in the city of Salvador-BA. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia.

Asthma is a chronic inflammatory disease of the airways, non-transmissible, influenced by environmental and genetic factors. Allergic asthma is the most common phenotype of the disease and is associated with an exacerbation of the Th2 immune response. Several cell types are involved in the regulation of the immune system in the lung, with emphasis on regulatory cells Treg and Breg. Several inhibitory controls included by these cells have already been admitted, among which are the release of suppressive cytokines such as IL-10, TGF- β and IL-35. IL-35 is a heterodimeric cytokine, composed of the *EBI3* and *IL12p35* subunits, which are encoded by the *EBI3* and *IL12A* genes, respectively. Changes in the levels of this cytokine have been associated with asthma and atopy. The consternation of the genetic component in the development of asthma is widely reported in the literature. In this context, given the importance of Treg cells and genetic susceptibility, this study set out to investigate the functional impact of polymorphisms in the regulatory genes *EBI3* and *IL12A* in a population of Brazilian children. DNA from 1.218 children was genotyped using the Illumina 2.5 Human Chip Omni Bead. Logistic regression analyzes were performed using PLINK 1.9 software to verify the association between polymorphisms in *EBI3* and *IL12A*, asthma and atopic markers, adjusted for sex, age, helminth survivors and ancestry markers. mRNA expression was performed using real-time qPCR. A total of 4 markers for *IL12A* and 5 for *EBI3* were found. The surprising results that the C allele of rs2243131 in *IL12A* was positively associated with asthma (OR 1.35, CI 1.06–1.71), asthma severity (OR 1.36, CI 1.02–1.81), positive skin test for *Blatella germanica* (OR 1.59, CI 1.09–2.22), and also positively associated with the spontaneous production of IL-5 (OR: 1.71; CI: 1.11–2.62). The A allele of rs568408 in *IL12A* was also positively associated with a positive skin test for *B. germanica* (OR 1.65, CI 1.10-2, 37). rs582537 in *IL12A* was associated with a positive skin test for *B. germanica* (OR 0.64, CI 0.42-0.98) and *Dermatophagoides pteronyssinus* (OR 0.77, CI 0.60-0.98), in addition to being associated with the natural production of INF- γ (OR : 0.52; CI: 0.52–0.99). With regard to *EBI3*, all the variants found were incorporated into atopy markers: the C allele of rs78749916 (OR 0.61, CI 0.40-0.93), the G allele of rs77145509 (OR 0.66, CI 0.46-0.94), and the A allele of rs76353132 (OR 0.68, CI 0.43-0.96), were associated with a positive skin test for *Periplaneta americana*. The rs76353132 variant was also associated with spontaneous INF- γ production (OR: 0.72; CI: 0.52-0.99). The rs428253 C allele was associated with a positive skin test for at least one allergen (OR: 0.64; CI: 0.44–0.92), and the rs4905 G allele was associated with a positive IgE for at least one allergen (OR 0.62, CI 0.40-0.95). *IL12A* mRNA expression levels were reduced in atopic asthmatic subjects when compared to controls. *EBI3* mRNA expression levels were decreased in atopic asthmatic subjects compared to non-asthmatic and atopic subjects, and when compared to controls. In this study, we were able, for the first time, to describe new variants in the IL-35 regulatory pathway linked to asthma and atopy, highlighting the importance of immune regulation in the pathogenesis of asthma.

Keywords: IL-35, *EBI3*, *IL12A*, regulatory cells, immunogenetics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ação das citocinas TH2 na asma.	17
Figura 2: Imunoregulação via células Treg na asma.	20
Figura 3: Arquitetura da família IL-12 de citocinas	21

MANUSCRITO

Figura 1: IL12A and EBI3 gene expression analysis according to asthma/atopy status.	39
Figura 2: GTEx - <i>IL12A</i> gene expression levels in lung tissue according to SNVs genotypes	40
Figura 3: LD plots of SNVs from <i>IL12A</i> and <i>EBI3</i> genes	40

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO

Table 1: Characteristics of the SCAALA population according to asthma symptoms status and other variables included in the study.....	32
Table 2: Characterization of the IL12A and EBI3 SNVs evaluated in this study.....	33
Table 3: IL12A and EBI3 SNVs function and regulatory properties.....	34
Table 4: Significant associations between IL12A and EBI3 SNVs, asthma symptoms and asthma severity, using logistic regression.....	34
Table 5: Significant associations between IL12A and EBI3 SNVs and atopy markers, using a logistic regression.....	36
Table 6. Significant associations between IL12A and EBI3 SNVs and spontaneous IL-5 and IFN- γ production, using a logistic regression.....	38

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

Breg: Células T regulatórias
cAMP: adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
Chr: Cromossomo
CI: Intervalo de confiança
CD: *Cluster of differentiation*
CTLA-4: Antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico
DPOC: Doença pulmonar obstrutiva crônica
EBI3: *Epstein-Barr virus-induced gene 3*
eQTL: *Expression quantitative trait loci*
FOXP3: *Forkhead box P3*
GINA: Iniciativa Global para Asma
GWAS: Estudos de associação genômica ampla
HR2: receptor de histamina 2
IFN γ : Interferon-gama
Ig: Imunoglobulina
IL: Interleucina
ILC: Células linfoides inatas
iTreg: Células T regulatórias induzidas
LAG-3: gene de ativação de linfócitos 3
LD: Desequilíbrio de ligação (*Linkage disequilibrium*)
MAF: Frequência do menor alelo (*minor allele frequency*)
MHC: Complexo principal de histocompatibilidade
nTreg: Células T regulatórias naturais
PD1: Morte celular programada 1 (programmed cell death 1)
OR: Razão de chances (*Odds ratio*)
qPCR: Reação em cadeia da polimerase quantitativa
SCAALA: Mudanças sociais asma e alergia na América Latina (*Social Changes Asthma and Allergy in Latin America*)
SNV: Variante de nucleotídeo único
SPT: Teste cutâneo (*Skin Prick Test*)
TCR: Receptor de células T
Th: Células T *helper*
TNF: Fatores de Necrose Tumoral
TGF: Fator de crescimento transformante
Treg: Células T regulatórias

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 Epidemiologia da asma.....	14
2.2 Asma alérgica e atopia.....	15
2.3 Imunopatogênese da asma alérgica.....	15
2.4 Resposta imune regulatória na asma alérgica.....	18
2.4.1 IL-35.....	21
2.5 Fatores imunogenéticos na asma e atopia.....	20
3. OBJETIVOS.....	23
3.1 Objetivo geral	23
3.2 Objetivos específicos	23
4. MANUSCRITO.....	24
5. CONCLUSÃO	43
6. REFERÊNCIA.....	44

1. INTRODUÇÃO

A asma consiste em uma inflamação crônica das vias aéreas que apresenta um conjunto heterogêneo de condições clínicas que variam em gravidade, fatores de risco, resposta ao tratamento, aspectos genéticos e história natural da doença. Cerca de 339 milhões de pessoas no mundo são afetadas pela asma, e os padrões de incidência e prevalência diferem entre crianças e adultos. Ainda que o diagnóstico seja frequentemente realizado durante a infância, pode ocorrer em qualquer momento da vida, com alguns indivíduos desenvolvendo pela primeira vez na idade adulta. Por outro lado, enquanto a incidência e prevalência são maiores em crianças, a mortalidade é maior em adultos. Os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da asma não são totalmente compreendidos, mas sabe-se que eles podem causar um infiltrado de células inflamatórias no tecido pulmonar, hipersecreção de muco, inflamação, remodelamento e hiper responsividade das vias aéreas (Dharmage, Perret, and Custovic 2019; Del Giacco et al. 2017; Hu 2017; Maciag and Phipatanakul 2020; Network 2018).

Sintomas como falta de ar, tosse, limitação reversível do fluxo aéreo e sibilância, são associados a diferentes padrões da doença, que apresenta variáveis clínicas e mecanismos fisiopatológicos diversos. A asma alérgica é o fenótipo mais comum, principalmente na infância, e está associada a sensibilização a aeroalérgenos. Já a asma não alérgica inclui uma resposta imunológica não Th2, incluindo anormalidades neutrofílicas intrínsecas e ativação de linfócitos Th-17. (Akar-Ghibril et al. 2020; Boonpiyathad et al. 2019; Schoettler and Streck 2020; Verschoor and Von Gunten 2019; Victor, Lezmi, and Leite-de-Moraes 2020; Zhao and Wang 2018).

Uma variedade de alérgenos, como ácaros de poeira doméstica, pólen e alérgeno de baratas desempenham um papel importante na patogênese da asma alérgica, na qual predomina a resposta Th2, com produção de citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13. A indução de células Th2 reativas a alérgenos requer a exposição inicial/sensibilização ou e reativação/segunda exposição. Trata-se de um processo complexo no qual ocorrem diversas interações entre variados tipos de células nos pulmões e linfonodos (Boonpiyathad et al. 2019; Wang et al. 2020).

A população está rotineiramente exposta a uma ampla gama de alérgenos, mas nem todos os indivíduos são sensibilizados, ou apresentam atopia ou asma. Esse fato pode ser explicado pela susceptibilidade genética, e por fatores imunológicos. Nesse sentido, a resposta imune requer o mecanismo imunossupressor orquestrado pelas células T regulatórias (Treg). Um número

crescente de estudos tem demonstrado defeitos funcionais e diferenciação insuficiente dessas células como importante fator envolvido na patogênese da asma (Martín-Orozco, Norte-Muñoz, and Martínez-García 2017; Zhao and Wang 2018).

As células Treg participam do controle da inflamação em diversos processos biológicos, como infecções, doenças metabólicas, reparo tecidual, câncer e reações de hipersensibilidade. Quando um antígeno estimula a diferenciação de células T CD4+ *naive* em células Th2, ele também promove a diferenciação de células Treg, que tem por função manter o equilíbrio entre as respostas imunes. Células Treg disfuncionais ou quantitativamente insuficientes não conseguem controlar efetivamente uma resposta Th2 excessiva, como ocorre na asma e em doenças alérgicas. As células Treg podem ser classificadas em naturais (nTregs), induzidas (iTreg), coestimuladoras induzíveis (ICOS+ Treg), células Tr1 produtoras de IL-10, CD8+ Treg, e Tregs produtoras de IL-17. Além das células T, existe uma população de linfócitos B, denominados Breg, que também apresenta papel importante na modulação da asma e alergia (Bergantini et al. 2021; Catalán et al. 2021; Martín-Orozco et al. 2017; Zhao and Wang 2018).

O fator de transcrição FOXP3 (*forkhead box P3*) é um marcador nuclear largamente utilizado na identificação de células Tregs. Ele controla a diferenciação e as funções desse grupo de células, que por sua vez apresenta uma variedade de mecanismos supressores, como a produção de citocinas inibitórias, a exemplo da IL-10, IL-35 e TGF- β 1. IL-10 é imunoreguladora e apresenta atividade supressora em muitas células efetoras diferentes, influenciando na tolerância imunológica a alérgenos. TGF- β 1 é uma citocina pleiotrópica capaz de inibir a proliferação de linfócitos B e T, e está envolvida na regulação de respostas alérgicas. IL-35 é uma citocina heterodimérica composta das subunidades EB13 (Epstein–Barr virus-induced gene 3) e IL-12p35, que apresenta atividade anti-inflamatória e imunossupressora. Alterações nos níveis dessas citocinas têm sido associadas a asma e atopia. As Tregs apresentam um certo nível de plasticidade funcional, possuindo a capacidade de perceber citocinas em seu meio e responder a elas com a expressão de genes apropriados (Boonpiyathad et al. 2020; Martín-Orozco et al. 2017; Zhao and Wang 2018).

A relevância do componente genético no desenvolvimento da asma é amplamente discutida na literatura. Identificar loci genéticos associados a asma e atopia auxiliam na compreensão das vias biológicas implicadas. (Martín-Orozco et al. 2017; Ntontsi et al. 2021). Nesse contexto, dada a importância das células Treg e da susceptibilidade genética, este estudo se propôs a investigar o impacto funcional de polimorfismos nos genes regulatórios *EB13* e *IL12A*, que codificam a IL-35, em uma população de crianças brasileiras.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Epidemiologia da asma

A asma é doença não transmissível, globalmente importante como problema de saúde pública. Diferentes status socioeconômicos, raças, etnias, e faixa etárias são afetados. Embora a incidência e prevalência sejam maiores em crianças, a morbidade e mortalidade são maiores em adultos. Estima-se que cerca de 339 milhões de pessoas tenham asma no mundo, ocupando o 16º lugar entre as principais causas de anos vividos com incapacidade. Existe uma grande variação geográfica na prevalência da asma, embora seja mais elevada em países de renda média, a maior parte da mortalidade ocorre em países de renda média e baixa, e a incidência global tem estabilizado e até mesmo diminuído em países desenvolvidos (Dharmage et al. 2019; Enilari and Sinha 2019; Network 2018; Stern, Pier, and Litonjua 2020).

Em 2019, 12,9 mil crianças morreram de asma no mundo. A prevalência da asma infantil está acima de 10% em praticamente todos os países da América Latina, onde o impacto da doença é complicado pelo acesso limitado aos serviços de saúde e medicamentos essenciais. No Brasil, a prevalência em crianças e adolescentes é cerca de 20%, uma das mais altas do mundo. A falta de controle da doença durante a infância pode levar a altas taxas de inatividade física, absenteísmo escolar e hospitalizações. A carga de incapacidade provocada pela asma, causou 13,8 milhões de dias de aulas perdidas nos Estados Unidos em 2013, sendo o principal fator de absenteísmo escolar no país. 36 mil crianças estadunidenses faltam à escola diariamente devido a doença, o que causa um importante impacto negativo no desenvolvimento acadêmico dos jovens. (Cardoso et al. 2017; Liu et al. 2016; Zhang and Zheng 2022).

Ainda que possa ocorrer em qualquer idade, a asma é mais comum em crianças e é a principal causa de doença crônica das vias aéreas nessa faixa etária. Com o passar dos anos, torna-se mais complexo diferenciar o início da asma na idade adulta, de outros diagnósticos como doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) ou sobreposição DPOC-asma, levando a frequentes subdiagnósticos. Apesar das taxas de internações hospitalares e mortalidade provocadas pela doença apresentarem atualmente um declínio na maioria das regiões brasileiras, a asma é uma das principais responsáveis por internações no país em todas as idades, e a mortalidade ainda é superior a 2000 mortes por ano. (Cardoso et al. 2017; Enilari and Sinha 2019; Network 2018; Zhang and Zheng 2022).

2.2. Asma alérgica e atopia

A asma é uma doença fisiopatologicamente complexa, e, portanto, difícil de ser definida de maneira simplista. Trata-se de uma doença inflamatória crônica das vias aéreas representada por um conjunto heterogêneo de condições clínicas que variam em gravidade, início, fatores de risco desencadeantes, resposta ao tratamento, genética e história natural. A manifestação de sintomas como sibilo, tosse e falta de ar, estão patologicamente relacionados a obstrução variável do fluxo aéreo, causada por hiperreatividade brônquica, hipersecreção de muco, e inflamação crônica das vias aéreas. A diversidade de apresentações clínicas e mecanismos fisiopatológicos envolvidos, permitem classificar a asma em diferentes fenótipos e endótipos (Boonpiyathad et al. 2019; Mims 2015; Padem and Saltoun 2019).

A asma alérgica é o fenótipo mais comum da doença, especialmente em crianças, e é frequentemente induzida por sensibilização a alérgenos ambientais, como pólen e ácaros da poeira doméstica. A predisposição genética para produzir imunoglobulina E (IgE) em resposta a pequenas quantidades desses alérgenos comuns é denominada atopia. Essa condição aumenta o risco de desenvolvimento de doenças como dermatite atópica, alergias alimentares, rinoconjuntivite e asma. (Thomsen 2015; Verschoor and Von Gunten 2019).

As doenças atópicas geralmente se desenvolvem em uma marcha atópica, progressão sequencial de sintomas ou doenças seguindo um certo padrão ao longo da vida. A dermatite atópica e sensibilização a alimentos e aeroalérgenos começam ainda na primeira infância, progredindo para rinite alérgica e asma. Apesar dessa sequência de eventos ser comum, o desenvolvimento desses sintomas e doenças não é uniforme em todas as crianças atópicas. O diagnóstico de asma em crianças menores de 3 anos de idade é difícil, pois muitas apresentam episódios recorrentes de sibilos e tosse, geralmente em resposta a infecções respiratórias agudas, causadas especialmente por vírus tais como o vírus sincicial respiratório e o rinovírus. Apesar da complexidade diagnóstica nessa faixa etária, alguns fatores como história familiar positiva para doença atópica, presença de dermatite atópica e sensibilização a alimentos e aeroalérgenos predizem asma persistente na infância e vida adulta. (Akar-Ghibril et al. 2020; Thomsen 2015; Verschoor and Von Gunten 2019).

2.3. Imunopatogênese da asma alérgica

A asma alérgica implica em uma relação entre reatividade clínica e exposição a aeroalérgenos. A inalação dessas partículas desencadeia sintomas de asma devido ao processo

inflamatório controlado por uma gama de mediadores bioativos incluindo IgE, citocinas e quimiocinas. Já na asma não alérgica não há detecção de IgE específica para alérgenos, bem como relação temporal entre a exposição a essas partículas e sintomas de asma. Infecções do trato respiratório superior, refluxo gastroesofágico, ar frio ou exposições a substâncias irritantes, como o tabaco, são tipicamente associadas a asma não alérgica (Padem and Saltoun 2019; Shum, Rolph, and Sewell 2008).

A asma alérgica tende a iniciar na infância e está associada com a resposta de células T *helper 2* (Th2), também observada em outras condições alérgicas como dermatite e rinite. Este fenótipo da doença é normalmente induzido por encontros precoces com alérgenos ambientais. O desenvolvimento de linfócitos T CD4⁺ do tipo Th2 requer a exposição inicial, sensibilização, e a reativação com uma segunda exposição. As células Th2 específicas produzem então citocinas que levam ao acúmulo de uma grande quantidade de eosinófilos nas paredes das vias aéreas, superprodução de muco e síntese de IgE por células B alérgeno-específicas (**figura 1**), que podem ser detectadas no soro ou através de teste cutâneo. Essa resposta exagerada das vias aéreas a um estímulo inespecífico é denominada hiperresponsividade e é uma importante característica fisiopatológica da asma. O aumento da produção de muco, hiperplasia do músculo liso e remodelamento são mecanismos de obstrução reversíveis das vias aéreas, mas que podem evoluir para o comprometimento irreversível da função pulmonar. (Boonpiyathad et al. 2019; Hammad and Lambrecht 2021).

O estreitamento, que leva a obstrução, é mediado pela infiltração e ativação de células imunes como as células dendríticas, eosinófilos, neutrófilos, linfócitos, células linfóides inatas (ILCs), mastócitos e basófilos. Uma interação complexa entre essas células imunológicas e células estruturais das vias aéreas leva ao desenvolvimento das características da asma. Sua imunofisiopatologia envolve, portanto, a ativação do sistema imune inato e adaptativo para estimular a inflamação crônica das vias aéreas (Hammad and Lambrecht 2021).

O reconhecimento de antígenos ambientais comuns é inicialmente regulado por células apresentadoras de antígenos (APCs), como células dendríticas, macrófagos e linfócitos B. Os antígenos são processados pelas APCs através da via endocítica, e apresentados como epítopos de 8-10 aminoácidos em moléculas de MHC classe II (MHCII) para os linfócitos T CD4⁺. A célula dendrítica (CD) é o ativador mais potente de células T *naive*, e são essenciais para induzir e preparar respostas Th adequadas, além de cruciais tanto para a iniciação quanto para a manutenção da inflamação na resposta alérgica. Os complexos MHCII e antígenos interagem com receptores de células T (TCR), e essa ativação em conjunto com a expressão de moléculas co-estimuladoras e citocinas irão determinar a diferenciação Th. Os linfócitos T CD4⁺ são

geralmente divididos em classes que são caracterizadas pelo arranjo de citocinas produzidos pelas células. A diferenciação requer a expressão de um fator de transcrição mestre juntamente com um transdutor de sinal e ativador de transcrição, que no subtipo Th2 são respectivamente o fator de transcrição GATA-3 e o transdutor STAT5. (Caminati et al. 2018; Kwilasz 2016; Vroman, van den Blink, and Kool 2015; Walker and McKenzie 2018)

As células Th2 específicas produzem uma variedade de citocinas pró-alérgicas como IL4, IL-5, e IL-13. IL-4 é uma citocina que possui um papel muito importante na própria diferenciação de células T *naive* para células Th2, além de promover a mudança da produção de anticorpos para o isotipo IgE; IL-5 é responsável pela maturação e liberação de eosinófilos na medula óssea; e IL-13 induz a proliferação de células B produtoras de IgE e células endoteliais, sendo um mediador central no processo de hiperreatividade das vias aéreas (**figura 1**) (Caminati et al. 2018; Kwilasz 2016; Walker and McKenzie 2018).

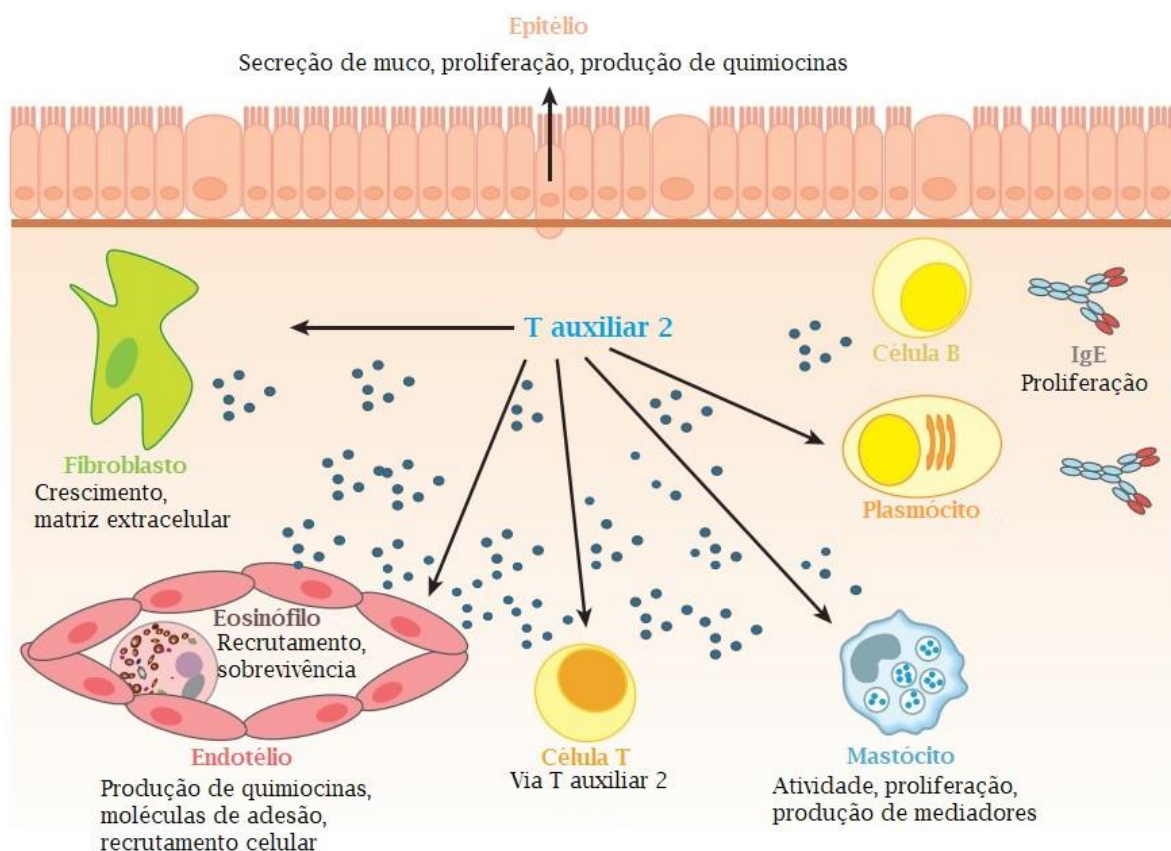


Figura 1. Ação das citocinas Th2 na asma. O possível efeito das citocinas Th2 em várias células do pulmão na asma. Adaptado de (Hamid and Tulic 2009).

A produção de IgE alérgeno-específica pelos linfócitos B é uma característica importante da resposta imune alérgica. O papel biológico da IgE é complexo e está relacionado a sua capacidade de influenciar as funções de diversas células imunológicas e estruturais

envolvidas na patogênese da inflamação alérgica. Isso ocorre por meio da ligação da IgE aos seus receptores, como CD23 de alta afinidade (FcεRI) e CD23 de baixa afinidade (FcεRII), expressos por mastócitos, basófilos, células dendríticas, células musculares lisas das vias aéreas, células epiteliais, endoteliais e eosinófilos. Quando a IgE específica se liga aos seus receptores nos mastócitos e basófilos, ocorre a degranulação de mediadores pré-formados como histamina e triptase, e outros mediadores como prostaglandinas e leucotrienos são gerados a partir do metabolismo do ácido araquidônico da membrana celular (Boonpiyathad et al. 2019; Kwilasz 2016).

Além das Th2, outras citocinas inflamatórias como IL-31 e IL-33 demonstram papel importante na asma e outros distúrbios imunomediados. IL-31 regula a proliferação celular e está envolvida no remodelamento tecidual, já tendo sido encontrada aumentada no soro de pacientes com asma alérgica juntamente com seu receptor IL-31R. Já a IL-33 é uma citocina alarmina da família IL-1, cuja expressão é mediada a partir do dano tecidual, sendo capaz de induzir a expressão de citocinas Th2 e ativar basófilos e eosinófilos (Boonpiyathad et al. 2019; Kwilasz 2016; Murdaca et al. 2019).

As células linfóides inatas tipo 2 (ILC2s) pertencem a linhagem linfóide e também produzem citocinas do tipo 2, como IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13. As ILCs são indiretamente ativadas por alérgenos, se infiltram nos pulmões e são uma importante fonte inata de IL-13. A via do receptor IL-33-ST2 e ILC2 desempenha um papel importante no desenvolvimento de doenças alérgicas e na asma (Boonpiyathad et al. 2019; Kwilasz 2016).

2.4. Resposta imune regulatória na asma alérgica

As vias aéreas são constantemente acometidas por uma mistura de partículas inaladas durante a respiração, incluindo patógenos, alérgenos e poluentes. Como o dano tecidual mediado pelo sistema imune pode comprometer as trocas gasosas, a resposta imunológica pulmonar deve estar bem regulada, permitindo a rápida eliminação de patógenos, e evitando respostas excessivas. A atividade de vários tipos celulares, incluindo macrófagos intersticiais, células dendríticas, e subgrupos de células T regulatórias FoxP3⁺ e FoxP3⁻, está envolvida na regulação do sistema imunológico no pulmão (Branchett and Lloyd 2019).

A indução e manutenção da tolerância ao alérgeno é uma marca registrada da resposta imune saudável. Em modelos *in vivo* de exposição natural a altas doses de alérgenos, demonstrou-se que a geração de células Treg e Breg alérgeno-específicas é essencial na indução da tolerância (Meiler et al. 2008; Palomares et al. 2017; Platts-Mills et al. 2001; Van De Veen

et al. 2013; Vroman et al. 2015). Em contraste, nas doenças alérgicas ocorre uma resposta imunológica inadequada aos alérgenos, ocasionada por um desequilíbrio entre resposta imune Th2 e as células regulatórias, que suprimem a função aberrante ou excessiva de outras células (Boonpiyathad et al. 2020; Wang et al. 2020).

O papel das células T e B regulatórias já foi documentado em diferentes contextos e patologias. Várias células T possuem o potencial de mediar a imunossupressão, mas as Treg FoxP3⁺ são consideradas o tipo celular dominante. Tregs são potentes células imunossupressoras, fundamentais para manter o equilíbrio homeostático em casos de resposta imune desregulada, uma característica crítica da inflamação na asma. Já as células B, classicamente reconhecidas por seu papel singular na produção de anticorpos, tem demonstrado um importante potencial imunorregulador (Bregs), e recebido atenção crescente sob esse aspecto nas últimas duas décadas. Apesar dos extensos esforços para caracterizar fenotipicamente as Bregs, incluindo análises de transcriptoma e citometria de fluxo multiparamétrica, ainda não há um conjunto definitivo de marcadores fenotípicos ou regulador transcricional de assinatura, equivalente ao FoxP3 em células Treg, que permita a identificação das Breg. (Khan 2020; Ma et al. 2021).

As células Breg continuam sendo uma população funcionalmente definida com base em sua capacidade de suprimir respostas inflamatórias *in vitro* ou *in vivo*, ao contrário das células B efectoras, que produzem moléculas pró-inflamatórias ou induzem outras células a fazê-lo (Catalán et al. 2021). As Breg podem desempenhar um papel importante na indução da tolerância imunológica aos alérgenos regulando a inflamação via secreção de IL-10 e TGF- β , suprimindo assim as respostas das células T efectoras e favorecendo a indução de Tregs (Palomares et al. 2017).

Com relação as células Treg, diversos mecanismos inibitórios já foram descritos, dentre os quais estão a liberação de citocinas supressoras como IL-10, TGF- β e IL-35; citólise da célula efectora pela produção de granzima e perforina; interrupção metabólica mediada pela inibição da resposta proliferativa via receptor de IL-2; inibição metabólica mediada por cAMP; e inibição da maturação e função das células dendríticas via CTLA-4 (Arce-Sillas et al. 2016; Catalán et al. 2021). Usando estes mecanismos, as Tregs suprimem direta ou indiretamente quase todos os tipos de células que contribuem para o início e manutenção das doenças alérgicas, incluindo a ativação e degranulação de mastócitos e basófilos (**figura 2**) (Palomares et al. 2017).

As células Treg podem se desenvolver otogeneticamente no timo (tTregs) ou periféricamente (pTregs) a partir de células efectoras. tTregs expressam constitutivamente

FoxP3 e são predominantes na corrente sanguínea e linfonodos, estando envolvidas principalmente na tolerância a autoantígenos. As pTregs são geradas fora do timo após estimulação antigênica, e estão atuando principalmente na regulação da inflamação local na presença de antígenos exógenos. Duas populações de pTreg, Th3 e Tr1, apresentam alta secreção de TGF- β e IL-10 respectivamente (**figura 2**). Além dessas, outras populações de Treg, como Treg CD8⁺, Treg CD4-CD8-TCR $\alpha\beta$ ⁺, e TCR $\gamma\delta$ Tregs já foram descritas. (Sakaguchi et al. 2020; Zheng et al. 2007).

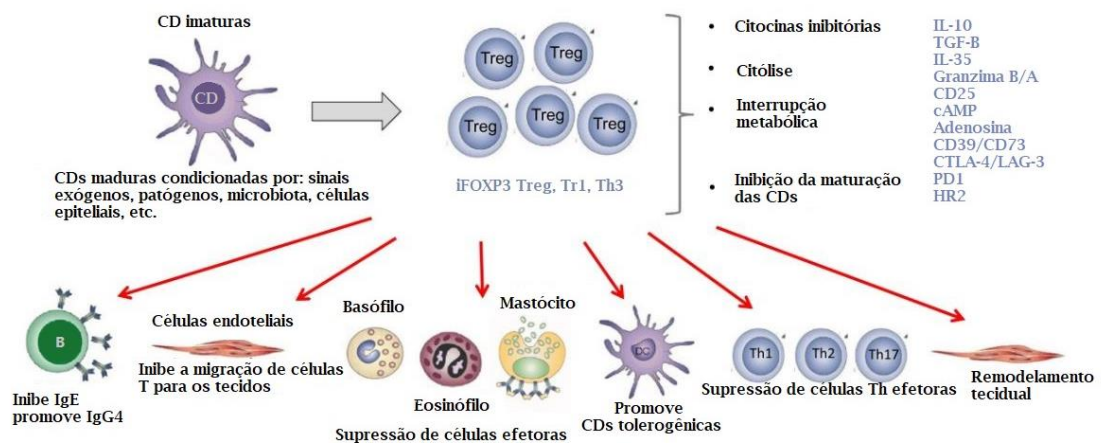


Figura 2. Imunoregulação via células Treg na asma. As células Treg suprimem as reações alérgicas inibindo diferentes eventos inflamatórios importantes. CDs de estado estacionário ou CDs condicionadas por sinais exógenos, células epiteliais, patógenos, microbiota, etc., promovem a geração de diferentes tipos de células Treg funcionais que empregam quatro mecanismos principais de supressão (citocinas inibitórias, citólise, interrupção metabólica e inibição de DCs) usando uma infinidade de moléculas solúveis e ligadas à superfície. As células Treg previnem e inibem a inflamação contínua, agindo em muitos tipos diferentes de células que causam inflamação alérgica incluindo células B, células endoteliais e musculares lisas, células efetoras, CDs, células T e teciduais. Adaptado de (Palomares et al. 2017)

2.4.1. IL-35

As citocinas são um amplo grupo de fatores solúveis, diretamente influenciadas por uma série de reguladores e feedbacks. Essas moléculas desempenham papéis essenciais na coordenação das atividades de diversos tipos de células imunes, interligando estímulos extracelulares a intracelulares, e participando de redes de transdução de sinal que mediam múltiplos processos fisiológicos (Behzadi, Behzadi, and Ranjbar 2016; Taniguchi 1995). Existem mais de 40 tipos de interleucinas (IL) com propriedades diferentes. Os membros da família IL-12 são conhecidos por apresentarem características muito distintas entre si, e por serem os únicos a apresentarem apenas citocinas heterodiméricas. Fazem parte dessa família a IL-12, IL-23, IL-27 e IL-35 (Vignali and Kuchroo 2012). Dentre essas, a IL-35 é reconhecida

pelo seu caráter imunossupressor, semelhante a IL-10 e TGF- β , sendo produzida pelas células regulatórias do tipo B (iBregs), T naturais (nTreg) e induzidas (iTREG35). A citocina heterodimérica IL35 é composta pela p35 e a Ebi3 associadas por uma ligação dissulfeto, essas subunidades também são encontradas na IL-27 e IL-12 (Behzadi et al. 2016) (**figura 3**).

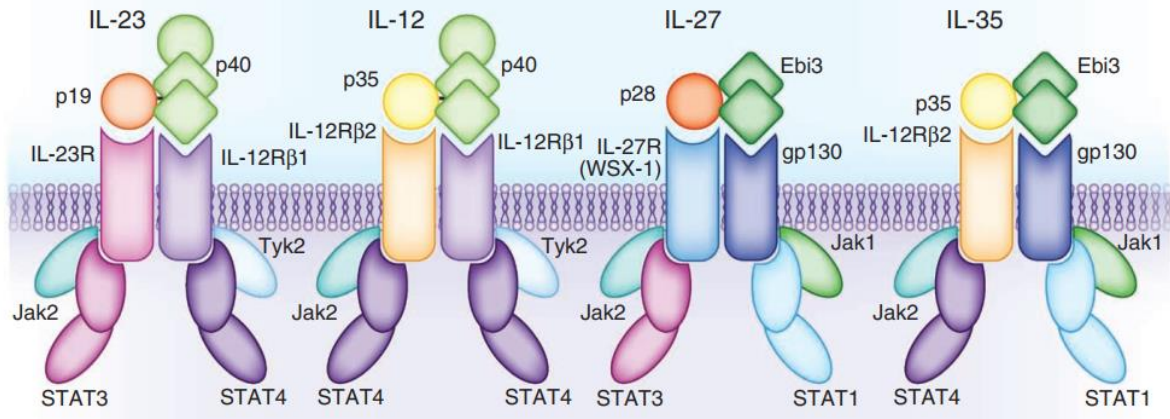


Figura 3. Arquitetura da família IL-12 de citocinas. Membros da família de citocinas IL-12 são apresentados junto com seus receptores e ligantes Jak-STAT. Adaptado de (Vignali and Kuchroo 2012).

Estudos sugerem que a IL-35 está desregulada na asma, e análises funcionais desta citocina indicam que ela desempenha um papel importante na fisiopatologia da doença (Hu 2017). A IL-35 pode suprimir a proliferação e produção de citocinas como IL-5 e IL-13, pelas células TH2 em resposta a alérgenos, além de inibir a produção de IgE por células B. Recentemente foi relatada uma redução da transformação de células TCD4 *naive* em células iTREG35 pós exposição a alérgenos em pacientes com asma alérgica (Hu 2017; Wang et al. 2020).

2.5. Fatores imunogenéticos na asma e atopia

A asma resulta de uma interação disfuncional entre fatores genéticos, ambientais e comportamentais, especialmente na vida fetal e infantil. A complexa interação gene-ambiente modula os diferentes fenótipos da doença, uma vez que fatores ambientais aumentam a penetrância de genótipos suscetíveis. Identificar os *loci* genéticos e os mecanismos moleculares que afetam o risco de desenvolver asma, ajuda a compreender melhor as vias biológicas implicadas na patogênese da doença. O primeiro estudo a vincular um *locus* genético com a asma foi publicado em 1989. (Herrera Luis et al. 2022; Ntontsi et al. 2021; Toskala and Kennedy 2015).

Na última década, diversos estudos de associação ampla genômica (GWAS), identificaram variantes genéticas associadas a doença. O primeiro GWAS que avaliou a asma na infância, identificou que a variante rs7216389, na região 17q21, não só aumentou o risco de desenvolver asma em crianças, como também, estava envolvido na regulação da expressão do gene *ORMDL3*. Desde então, centenas de genes candidatos tem sido descritos nesse contexto (Herrera Luis et al. 2022; Moffatt et al. 2007; Shi, Zhang, and Qiu 2022). Outras variantes genéticas, como as Variações de Número de Cópias também tem sido associadas com o aumento da susceptibilidade à asma, inclusive em nossa população (Oliveira et al. 2018).

As variantes genéticas associadas as doenças alérgicas podem ou não ser codificantes, e mesmo que não sejam, desempenham um papel importante na regulação da expressão gênica e na herdabilidade da doença. Essa regulação é complexa e envolve interações entre ambiente, DNA, RNA e proteínas. (Herrera Luis et al. 2022; Shi et al. 2022). Tendo em vista o ambiente inflamatório, as células regulatórias exercem função crítica na regulação da resposta imune periférica, já que são capazes de suprimir a inflamação regulando positivamente a expressão de genes repressores, moléculas imunossupressoras e receptores teciduais (Frank, Matthew G. annis, Watkins 2019; Martín-Orozco et al. 2017).

Dentre os mecanismos imunoregulatórios já descritos, destaca-se nessa tese a liberação das citocinas IL-10, TGF- β e IL-35 pelas células Treg Foxp3⁺. Essas moléculas desempenham papel importante na polarização da resposta imune em diversas patologias.

Nosso grupo demonstrou anteriormente a associação entre polimorfismos genéticos nos genes IL-10, TGF- β e FOXP3, com asma e atopia em crianças da coorte do programa SCAALA em Salvador (Costa et al. 2017; Figueiredo, Barreto, and Maria 2016; Marques et al. 2022). Tendo em vista o impacto que variantes genéticas possuem na expressão gênica, e a importância dessa expressão como mecanismo subjacente de doenças complexas como a asma, neste trabalho propusemo-nos a avaliar o impacto funcional de polimorfismos nos genes imunoregulatórios *EBI3* e *IL12A*, que codificam a IL-35, nunca antes estudado no contexto da asma na população brasileira.

3. OBJETIVOS

3.1. GERAL

Avaliar o impacto funcional de polimorfismos nos genes imunorregulatórios *EBI3* e *IL12A* no contexto da asma e atopia numa população brasileira.

3.2. ESPECÍFICO

- Descrever a frequência de polimorfismos nos genes imunorregulatórios *EBI3* e *IL12A* e avaliar o impacto funcional *in silico* destes polimorfismos.;
- Avaliar a associação de polimorfismos nos genes imunorregulatórios *EBI3* e *IL12A* com asma e gravidade de asma;
- Avaliar a associação de polimorfismos nos genes imunorregulatórios *EBI3* e *IL12A* com marcadores de atopia;
- Avaliar o efeito de polimorfismos em *EBI3* e *IL12A* sobre a produção de citocinas Th1 e Th2;
- Avaliar a expressão de RNAm de *EBI3* e *IL12A*, em cultura de sangue total.

4. MANUSCRITO:

MANUSCRITO: Genetic variants in IL-35 route are associated with atopic asthma and atopy makers in population with high African origins

Regina S. Nascimento ^a, Milca de J. Silva ^a, Hatilla Santos^a, Neuza M. Alcântara-Neves ^a, Maurício L. Barreto ^b, Camila Alexandrina Figueiredo ^a

^aInstituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brasil.

^bFundação Oswaldo Cruz, Salvador, BA, Brasil.

Corresponding author

Camila Alexandrina Figueiredo

Departamento de Ciências da Biorregulação, Instituto de Ciências da Saúde

Universidade Federal da Bahia, Canela, CEP 41110-100, Salvador, BA, Brazil

Email: (cavfigueiredo@gmail.com)

Financial Support: This work was supported by Brazil CNPq, CAPES and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) (Edital PRONEX # 8665/2014, TO 0001/2014).

ABSTRACT

The role of regulatory T and B cells has already been documented in different contexts and pathologies. Such group of cells has a variety of suppressor mechanisms, such as the production of inhibitory cytokines, such as IL-10, TGF- β 1 and IL-35. The heterodimeric cytokine IL35 is composed of IL-12p35 and Ebi3, and encoded by the *IL12A* and *EBI3* genes. Studies suggest that IL-35 is dysregulated in asthma, and functional analyzes of this cytokine indicate that it plays an important role in the pathophysiology of the disease. Bearing this in mind, the impact that genetic variants have on gene expression, and the importance of this expression as an underlying mechanism of complex diseases such as asthma, in this work, we set out to evaluate the functional impact of polymorphisms in the immunoregulatory genes *EBI3* and *IL12A*, never studied before in the context of asthma in other populations. DNA from 1245 children was genotyped using the Illumina 2.5 Human Chip Omni Bead. Logistic regression analyzes were performed using the PLINK 1.9 software to verify the association between *EBI3* and *IL12A* polymorphisms, asthma and atopy markers, adjusted for sex, age, helminths infections and ancestry markers. The mRNA expression was performed using real-time qPCR. The C allele of rs2243131 in *IL12A* was positively associated with asthma (OR 1.35, CI 1.06–1.71), asthma

severity (OR 1.36, CI 1.02–1.81), positive skin test for *Blatella germanica* (OR 1.59, CI 1.09–2.22), and also positively associated with the spontaneous production of IL-5 (OR: 1.71; CI: 1.11–2.62). The A allele of rs568408 in IL12A was also positively associated with a positive skin test for *B. germanica* (OR 1.65, CI 1.10–2, 37). rs582537 in IL12A was associated with a positive skin test for *B. germanica* (OR 0.64, CI 0.42–0.98) and *Dermatophagoides pteronyssinus* (OR 0.77, CI 0.60–0.98), in addition to being associated with the natural production of INF- γ (OR : 0.52; CI: 0.52–0.99). With regard to *EBI3*, all the variants found were associated with atopy markers: the C allele of rs78749916 (OR 0.61, CI 0.40–0.93), the G allele of rs77145509 (OR 0.66, CI 0.46–0.94), and the A allele of rs76353132 (OR 0.68, CI 0.43–0.96), were associated with skin test reactivity for *Periplaneta americana*. The rs76353132 variant was also associated with spontaneous INF- γ production (OR: 0.72; CI: 0.52–0.99). The rs428253 C allele was associated with a positive skin test for at least one allergen (OR: 0.64; CI: 0.44–0.92), and the rs4905 G allele was associated with a positive IgE for at least one allergen (OR 0.62, CI 0.40–0.95). *IL12A* mRNA expression levels were reduced in atopic asthmatic subjects when compared to controls. *EBI3* expression levels were decreased in atopic asthmatic subjects compared to non-asthmatic and atopic subjects, and when compared to controls. In this study, we were able, for the first time, to describe new variants in the IL-35 regulatory pathway linked to asthma and atopy, highlighting the importance of immune regulation in the pathogenesis of asthma.

INTRODUCTION

Cytokines are a large group of soluble factors, directly influenced by a number immune modulators factors. These molecules play an essential role in coordinating the activities of different types of immune cells, interconnecting extracellular to intracellular stimuli, and participating in signal transduction networks that mediate multiple physiological processes (Behzadi et al. 2016; Taniguchi 1995). There are more than 40 types of interleukins (IL) with different properties. Members of the IL-12 family are known to have very different characteristics from each other but one to highlight is their, heterodimeric nature. This family includes IL-12, IL-23, IL-27 and IL-35 (Vignali and Kuchroo 2012). Among these, IL-35 is recognized for its immunosuppressive character, similar to IL-10 and TGF-B, being produced by type B regulatory cells (iBregs) and natural (nTreg) and induced (iTREG) T cells. The heterodimeric cytokine IL35 is composed of IL-12p35 and Ebi3, associated by a disulfided bond, these subunits are also found in IL-27 and IL-12 (Behzadi et al. 2016).

Studies suggest that IL-35 is dysregulated in asthma, and functional analyzes of this cytokine indicate that it plays an important role in the pathophysiology of the disease. (Hu 2017). Asthma is a chronic inflammation of the upper airways that presents a heterogeneous set of clinical conditions that vary in severity, risk factors, response to treatment, genetic aspects and natural history. (Verschoor and Von Gunten 2019). The disease can be triggered by many different factors and is characterized by infiltration of inflammatory cells, mucus hypersecretion, remodeling and airway hyperresponsiveness (Hamid and Tulic 2009; Hu 2017). The relative severity may differ between patients due to the heterogeneity of factors influencing the course of the disease. In addition to clinical forms, asthma has distinct pathophysiological mechanisms. It can be clinically classified as intermittent or persistent, and it can still be considered mild, moderate or severe. When it is immunologically mediated by IgE, it is called allergic or atopic. On the other hand, non-atopic asthma has been associated with intrinsic neutrophilic abnormalities and activation of TH17 lymphocytes (Boonpiyathad et al. 2019; Hamid and Tulic 2009; Schoettler and Streck 2020).

Allergic diseases are caused by inadequate immune responses to allergens. In allergy, an imbalance between regulatory cells and T helper (Th) 2 cells can be observed. In allergic individuals, common allergens induce a response where naive CD4⁺ T cells differentiate into Th2-type effector cells, a response characterized by IgE-producing B cells, eosinophils, type 2 lymphoid cells (ILC2), mast cells, and basophils. Type 2 cytokines include IL-4, IL-5, IL-9 and IL-13 (Boonpiyathad et al. 2020). The regulatory cells are essential for the maintenance of immune tolerance, prevention of autoimmune disease and regulation of immune response to foreign antigens. Among the basic suppression mechanisms mediated by regulatory cells, we can mention the production of inhibitory cytokines IL-10, TGF- β and IL-35. (Boonpiyathad et al. 2020; Layhadi, Eguiluz-Gracia, and Shamji 2019) IL-35 can suppress the proliferation and production of cytokines such as IL-5 and IL-13 by TH2 cells in response to allergens, in addition to inhibiting IgE production by B cells. A reduction in the transformation of CD4 T cells has recently been reported in naive iT_H2 cells after allergen exposure in patients with allergic asthma (Hu 2017; Wang et al. 2020). Considering all together, we hypothesize that genetic alterations in *EBI3* and *IL12A*, genes that encode IL-35, may play a role in immune mediated diseases, in particular, allergy and asthma.

In this way, in this study, we investigate the association between variants IL-35 gene and markers of atopy and atopic asthma.

METHODS

Study Population

Data were collected in northeastern Brazil, in the city of Salvador. The study population consisted of approximately 1245 children between 4 and 11 years of age, born between 1994 and 2001. This population was originally recruited for Social Changes Asthma and Allergy in Latin America (SCAALA), as previously described (Barreto et al. 2006). In short, were applied standardized questionnaires, based on the ISAAC (International Study of Asthma and Allergies in Childhood) phase 2 study, to the children's guardians; blood samples were collected from the children for laboratory tests and isolation of genetic material; and skin prick test were done with several allergens in a field ambulatory. Written free informed consent was obtained from the legal guardian of each child. The project was approved by the ethics committees of the Federal University of Bahia (registry 003-05/CEP-ISC) and the National Council of Ethics in Research (CONEP, resolution number 15 895/2011).

Asthma symptoms and atopy definitions

Asthma was defined according to the ISAAC questionnaire as follows: asthmatic children were those who presented wheezing in the last 12 months, plus at least 1 of the following symptoms: diagnosis of asthma ever; wheezing with exercise during the previous 12 months, four or more episodes of wheezing during the previous 12 months, or night waking due to wheezing episodes during the previous 12 months. Children who had specific IgE levels greater than or equal to 0.7 kU/L and/or Skin prick test ≥ 3 mm for at least one tested aeroallergens, were classified as atopics (Figueiredo, Amorim, and Alcantara-neves 2013). Children who did not meet these criteria were classified as non-asthmatic and non-atopic. In cases where a child had asthma and atopy, we classified as atopic asthmatics. Those who had asthma without atopy, were considered as non-atopic asthmatics.

Skin prick test and allergens specific IgE (sIgE)

Heparinized blood was collected, and the plasma was used for determination of following allergen-specific IgE (sIgE): *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Blomia tropicalis*, *Blatella germanica* and *Periplaneta americana*. Children with ≥ 0.70 kU/L or greater of specific IgE for any allergen tested were considered to have a positive result (Figueiredo et al. 2013). The skin prick test SPTs were performed using extracts of *D. pteronyssinus*, *B. tropicalis*, *B. germanica*,

P. americana, fungi, cat and dog danders (ALK-Abello, São Paulo, Brazil). The test was performed on the right forearm of each child. Saline solution was used as negative control, and 10 mg mL⁻¹ histamine solution was used as positive control. The reactions were read after 15 min. Was considered positive if the mean of the largest perpendicular diameters, was at least 3mm greater than the negative control.

Cell culture and measurement of IL-5, IL-10, IL-13 and IFN- γ by ELISA

For the detection of IL-5, IL-10, IL-13 and IFN- γ , the cells were cultured at a 1:4 dilution in RPMI medium (Gibco, Auckland, New Zealand) containing 10 mM of glutamine (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, Missouri, USA) and 100 μ g/ml gentamycin (Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, Missouri, USA) within 6 h following collection in heparinized tubes. Cell cultures were maintained in a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37 °C for 5 days, either without stimulation. To evaluate spontaneous production, or with stimulation, it was used 2,5 μ g/ml of *B. tropicalis* extract (Greer, Brazil). The concentrations of each cytokine were measured by sandwich ELISA, following the manufacturer's recommendations (BD PharMingen, San Diego, CA, USA)

DNA extraction and genotyping

DNA was extracted from peripheral blood samples according to the Flexigene® DNA Kit protocol (Qiagen, Hilden, Germany) and genotyping performed using a commercial panel, a Illumina Bead Chip HumanOmni 2.5 Kit (www.illumina.com), through the Consortium EPIGEN-Brazil (<https://epigen.grude.ufmg.br>). The genetic information for *IL12A* was extracted from positions 159988835 to 159996019 (location: NC_000003.12) on chromosome 3 and for *EBI3* from positions 4229523 to 4237528 (location: NC_000019.10) on chromosome 19. The following filters were applied for quality control: a genotyping call rate of less than 0.98; an imbalance of the Hardy–Weinberg equilibrium with a P-value of less than 10⁻⁴; and a P-value for the minor allele frequency (MAF) of less than 1%. (Laurie et al. 2010) A total of 4 markers for *IL12A* and 5 for *EBI3* were analyzed after quality control.

RNA extraction and cDNA production

RNA extraction and cDNA production were performed from the whole blood cultures mentioned above, to evaluate the expression of the *EBI3* and *IL12A* genes comprises the heterodimeric protein IL-35. RNA was isolated using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hamburg,

Germany), according to the manufacturer's protocol. Subsequently, 0.3 µg of total RNA from each sample was reverse transcribed into cDNA using 200 U of Superscript III Reverse Transcriptase (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and 500 ng of Oligo (dT) (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), according to the manufacturer's instructions.

Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction

The cDNA produced from RNA extracted from whole blood cultures used in presynthesized Taqman® Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The probes Hs01057148_m1 (*EBI3*), Hs01073447_m1 (*IL-12A*) and Hs99999903_m1 (*β-actin*) were used. cDNA samples derived from the investigated genes were detected by a QuantStudio 12 K Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), according to the manufacturer's recommendations. Each qRT-PCR assay was performed with 10 ng of the cDNA sample in 10 µL of Taqman-PCR Mastermix 2X (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and 1 µL of the respective primer/probe set and was purified using deionized H₂O q.s. 20 µL. The gene expression levels were normalized to β-actin levels. Relative quantification was performed by the comparative threshold cycle ($\Delta\Delta CT$) method.

***In silico* functional analyses**

To perform the *in silico* analysis, we used GTEX platform, genotype-tissue expression project (www.gtexportal.org) and rSNPBase (<http://rsnp.psych.ac.cn/>). Using GTEX, it is possible to study the relationship between gene expression and genetic variation, and other molecular phenotypes, in multiple reference human tissues. Expression quantitative trait *loci* (eQTL) mapping offers a powerful approach to elucidate the genetic component underlying altered gene expression. Genetic variation can also influence gene expression through alterations in splicing, non-coding RNAs, and RNA stability (Lonsdale et al. 2013).

The rSNPBase (<http://rsnp.psych.ac.cn>) is a database that provides annotations focused on regulatory SNVs that are involved in a wide range of regulation types, including proximal, distal and post-transcriptional regulation, and that helps to identify their potentially regulated genes (Guo et al. 2014), in respect of: *proximal regulation* indicates SNVs that are involved in proximal transcriptional regulation; the *distal regulation*, SNVs should be involved in distal transcriptional regulation; the *micro RNA regulation* describes SNVs within mature miRNA;

and the *RNA binding protein* are SNVs involved in RNA binding protein-mediated post-transcriptional regulation.

Statistical analysis

The analyses for associations between SNVs in the *EBI3* and *IL12A* genes and asthma or atopy (skin tests and specific IgE production) were performed using logistic regressions applied to estimate odds ratio (OR), permutational-p value, and 95% confidential interval (CI), adjusted for sex, age, helminth infections and ancestry markers. The analyses were performed using the additive genetic model. A permutational p-value lower than 0.05 was considered statistically significant. The permutation test is performed to test the null hypothesis, a difference in the values is expected under the null hypothesis. Permutation procedures provide a computationally intensive approach to generating significance levels empirically. This test control the false discovery rate in order to solve the problem of multiple comparisons (Lage-Castellanos et al. 2010), preserving the correlational structure between SNVs (Purcell et al. 2007). All the analyses above were performed using the software PLINK (version 1.9). The Linkage Disequilibrium among cases and controls was created using Haploview 4.2. We considered significant associations to be those with P-values ≤ 0.05 . Statistical analysis of the *EBI3* and *IL12A* gene expression levels was performed using GraphPad 6 software, using a t-test for parametric data and a Mann-Whitney test for non-parametric data.

RESULTS AND DISCUSSION

IL-35 is a heterodimeric cytokine composed of IL-12p35 and Ebi3 subunits. The IL-12A gene, located on chromosome 3q25.33, encodes the p35 subunit, and has seven exons. The Ebi3 subunit of IL-35 is encoded by the *EBI3* gene located on chromosome 19q13.3 and contains 5 exons. SNVs in the *IL-12A* and *EBI3* genes have been little explored in the scientific literature, mainly in the context of asthma and allergies. The present study is the first to show the influence of genetic variants in the *IL12A* and *EBI3* gene on asthma and atopy in a Brazilian population. We find associations of SNVs in *IL12A* and *EBI3* with asthma and atopy markers.

Characteristics of study population

Table 1 shows the main characteristics of the studied population. The main differences between cases and controls were for age and atopy measures by both skin prick test (SPT) and IgE, with higher prevalence among asthmatics. The genetic predisposition to produce IgE in response to

small amounts of these common allergens is called atopy. This condition increases the risk of developing diseases such as atopic dermatitis, food allergies, rhinoconjunctivitis and asthma (Thomsen 2015; Verschoor and Von Gunten 2019). No difference was found between cases and controls for gender and helminth infection. The prevalence of severe asthma was 53.1% among cases.

Table 1. Characteristics of the SCAALA population according to asthma symptoms status and other variables included in the study.

	Control (n=945)		Case (n=273)		p-value*
Age					
≤ 5	314	33.3%	132	48.3%	< 0.001
6 - 7	336	35.7%	88	32.2%	
≥ 8	291	30.9%	53	19.4%	
Sex					
Male	506	53.7%	150	54.9%	0.785
Female	435	46.2%	123	45.0%	
SPT	271	28.8%	100	36.6%	0.017
IgE > 0.70	324	34.4%	133	48.7%	< 0.001
Severe Asthma	-	-	145	53.1%	-
Helminth Infection	206	22.3%	67	25.0%	0.386

*p-value obtained from the chi square test

***IL12A* and *EBI3* polymorphisms**

Table 2 shows characteristics of studied SNVs in *IL-12A* and *EBI3* evaluated in this study. A total of 9 SNVs, 4 for *IL12A*, and 5 for *EBI3* were analyzed. The majority of the SNVs are intron variants. The genetic variants associated with allergic diseases may or may not be coding, and even if they are not, they play an important role in the regulation of gene expression and in the heritability of the disease. Considering IL-35 route has a regulatory role, in the an

inflammatory environment, regulatory cells play a critical role in regulating the peripheral immune response, as they are able to suppress inflammation by positively regulating the expression of repressor genes, immunosuppressive molecules and tissue receptors (Frank, Matthew G. annis, Watkins 2019; Herrera Luis et al. 2022; Martín-Orozco et al. 2017; Shi et al. 2022). Thus, it is worth to verify how variants in such genes may affect the development of asthma and allergies.

As can be seen in Table 2, the minor allele frequency (MAF) of the studied SNVs in *IL12A* ranged from 15% (rs568108) to 25% (rs582537) and for *EBI3* ranged from 12% (rs78749916) to 49% (rs4905). The Regulome DB database was used to identify possible regulatory regions of the studied SNVs as presented (Table 3). The SNV showing the strongest evidence of being regulatory is given the score of 1 and SNV demonstrating the less evidence of being functional is marked as 6. SNV rs428253 (*EBI3* gene) demonstrated a higher significant functional impact, according to the Regulome DB 2b classification, and SNV rs568408 is a missense variant.

Table 2. Characterization of the *IL12A* and *EBI3* SNVs evaluated in this study.

SNV ¹	Risk allele ²	Wild allele ³	MAF ⁴	HWE ⁵	Function ⁶
Asthma Symptoms					
<i>IL12A</i>					
rs2243131	C	A	0.18	0.20	Intron variant, nc
rs568408	A	G	0.15	0.44	Intron variante, utr
rs582537	A	C	0.25	0.80	Intron variant
rs2243123	C	T	0.21	0.09	Intron variant
<i>EBI3</i>					
rs428253	C	G	0.42	0.15	Intron variant
rs78749916	C	T	0.12	0.60	Intron variant
rs77145509	G	T	0.15	0.53	Intron variant
rs76353132	A	C	0.15	0.35	Intron variant
rs4905	G	A	0.49	0.91	Synonymous codon,

Single Nucleotide Variants; ² Alternative / Polymorphic allele; ³ Wild allele; ⁴ Minor allele frequency; ⁵Hardy-Weinberg equilibrium.

Table 3. *IL12A* and *EBI3* SNVs function and regulatory properties

SNV ¹	Proximal regulation	Distal regulation	miRNA regulation	RNA-binding-protein mediated regulation	RegulomeDB score
<i>IL12A</i>					
rs2243131	No	No	No	Yes	3a
rs568408	Yes	No	No	Yes	6
rs582537	No	No	No	Yes	5
rs2243123	No	No	No	Yes	3a
<i>EBI3</i>					
rs428253	Yes	Yes	No	No	2b
rs78749916	Yes	Yes	No	No	5
rs77145509	No	Yes	No	No	4
rs76353132	No	Yes	No	No	5
rs4905	No	Yes	No	No	5

¹Single Nucleotide Variants.

(*) *in silico* data analysis obtained from rSNPBase and RegulomeDB platforms.

Association of *IL12A* and *EBI3* variants with asthma and atopy

The C allele of rs2243131 *IL12A*, was positively associated with asthma (OR 1.35, CI 1.06–1.71) and asthma severity (OR 1.36, CI 1.02–1.81) (Table 4). Previously, the SNV rs2243131 was related to Breg cell disorder in Vogt-Koyanagi-Harada Syndrome patients, and was strongly related to rheumatoid arthritis disease susceptibility, both studies carried out in a Chinese population (Feng et al. 2021; Xie et al. 2021). According to RegulomeDB this variant has scored 3a, which means that this SNV can influence transcription factor (TF) binding, some motif sequences (indicates sequence-specific binding sites for proteins such as TF) and the DNase peak, (Boyle et al. 2012).

Table 4. Significant associations between *IL12A* and *EBI3* SNVs, asthma symptoms and asthma severity, using logistic regression adjusted for sex, age, helminth infections, and ancestry markers.

	CHR	SNV	Model	A1	OR	CI 95%	P value
<i>IL12A</i>							
Asthma symptoms	3	rs2243131	ADD	C	1.35	1.06-1.71	0.01
			DOM	C	1.42	1.06-1.92	0.01
Asthma severity	3	rs2243131	ADD	C	1.36	1.02-1.81	0.03
			DOM	C	1.47	1.02-2.12	0.03

CHR, chromosome; SNP, single-nucleotide polymorphism; A1, polymorphic allele; OR, odds ratio; CI, confidence interval.

Table 5 shows the significant associations between *IL12A* and *EBI3* polymorphisms and atopy markers. SNV rs2243131 was positively associated with a positive skin test for *Blatella germanica* (OR 1.59, CI 1.09–2.22), as well as rs568408 (A allele) (OR 1.65, CI 1.10-2, 37). *IL-12A* rs568408 seems to have no association with susceptibility to rheumatoid arthritis in a Chinese population, but in the same population it was identified as a genetic risk factor for Alzheimer’s disease linked to this variant. In addition, rs568408 decreased the risk of metabolic syndrome in a Mexican population. (Posadas-Sánchez et al. 2017; Xie et al. 2021; Zhu et al. 2014). On the other hand, the variant rs582537 was negatively associated with a positive skin test for *Blatella germanica* (OR 0.64, CI 0.42-0.98) and *Dermatophaoides pteronyssinus* (OR 0.77, CI 0.60-0.98).

Regarding SNVs in *EBI3*, all were negatively associated with atopy markers. The allele C of rs78749916 (OR 0.61, CI 0.40-0.93), the allele G of rs77145509 (OR 0.66, CI 0.46-0.94), and the allele A of rs76353132 (OR 0.68, CI 0.43-0.96), were negatively associated with a positive skin test for *Periplaneta americana*. The last two variants, rs77145509 and rs76353132 are in high LD (Figure 3B). The allele G of rs4905 (OR 0.62, CI 0.40-0.95) was negatively associated for IgE positive for at least one allergen. *EBI3* rs4905 had no association with rheumatoid arthritis susceptibility or serum levels of IL-35 among different genotypes (Xie et al. 2021) in a previous report. Finally, the rs428253 (C allele) in *EBI3* (OR: 0.64; CI: 0.44–0.92) was negatively associated with SPT positivity for at least one allergen. The same variant, rs428253, has been previously associated with a decreased risk of developing premature chronic arterial disease in a Mexican population, and had no association with susceptibility to arthritis rheumatoid in China (Posadas-Sánchez et al. 2017; Xie et al. 2021).

Table 5. Significant associations between *IL12A* and *EBI3* SNVs and atopy markers, using a logistic regression adjusted for sex, age, helminth infections, and ancestry markers.

Atopy marker	CHR	SNV	Model	A1	OR	CI 95%	P value
<i>IL12A</i>							
SPT(+) <i>Blatella germanica</i>	3	rs2243131	ADD	C	1.59	1.09-2.22	0.01
			REC	C	1.98	1.25-7.105	0.01
SPT(+) <i>Blatella germanica</i>	3	rs568408	ADD	A	1.65	1.10-2.37	0.01
			DOM	A	1.66	1.06-2.58	0.02
SPT(+) <i>Blatella germanica</i>	3	rs582537	ADD	A	0.64	0.42-0.98	0.04
SPT(+) <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	3	rs582537	ADD	A	0.77	0.60-0.98	0.04
			DOM	A	0.48	0.29-0.79	0.05
<i>EBI3</i>							
SPT(+) <i>Periplaneta americana</i>	19	rs78749916	ADD	C	0.61	0.40-0.93	0.02
			DOM	C	0.60	0.38-0.94	0.02
SPT(+) <i>Periplaneta americana</i>	19	rs77145509	ADD	G	0.66	0.46-0.94	0.02
			DOM	G	0.64	0.43-0.96	0.03
SPT(+) <i>Periplaneta americana</i>	19	rs76353132	ADD	A	0.68	0.47-0.97	0.03
			DOM	A	0.64	0.43-0.96	0.03
IgE positive for at least one allergen	19	rs4905	DOM	G	0.62	0.40-0.95	0.02
SPT (+) positive for at least one allergen	19	rs428253	ADD	C	0.64	0.44-0.92	0.01

Association of *IL12A* and *EBI3* polymorphisms with spontaneous IL-5 and IFN- γ production

The SNVs rs2243131, which was positively associated with asthma, asthma severity, and positive skin test for *Blatella germanica*, was also positively associated with spontaneous IL-5 production (OR: 1.71; CI: 1.11–2.62). Such findings indicates that this variant possibly impaired regulatory cells function, enhancing the inflammatory Th2-mediated process, as previously found in studies in a Chinese population (Feng et al. 2021; Xie et al. 2021). The allele A of rs568408, which was positively associated positive skin test for *Blatella germanica*, was also positively associated with spontaneous IL-5 production (OR: 1.78; CI: 1.12–2.82) (Table 6). As can be seen in Figure 3A, rs2243131 and rs568408 are in linkage disequilibrium (LD) and thus we hypothesize that rs568408 may have similar effect along with rs2243131, inhibiting the regulatory role of Treg cells, increasing inflammation.

The SNVs rs582537, which was negatively associated with a positive skin test for *Blatella germanica* and *Dermatophagoides pteronyssinus*, was also negatively associated with spontaneous INF- γ production (OR: 0.52; CI: 0.52–0.99). The allele C of rs78749916 of *EBI3*, in addition to being negatively related with a positive skin test for *Periplaneta americana*, was also negatively associated with spontaneous INF- γ production (OR: 0.72; CI: 0.52-0.99) (Table 6). No previous study was found in literature for both rs582537 and rs78749916. Our group has previously described IFN- γ *in vitro* production upon *Dermatophagoides pteronyssinus* stimulation (Figueiredo et al. 2010) in the same population studied herein. Thus, such findings could be linked to a non-atopic phenotype of asthma which has been also described in this population.

Table 6. Significant associations between IL12A and EBI3 SNVs and spontaneous IL-5 and IFN- γ production, using a logistic regression adjusted for sex, age, helminth infections, and ancestry markers.

Spontaneous cytokine production	CHR	Gene/SNV	Model	A1	OR	CI 95%	P value
IL-5	3	<i>IL12A</i> rs2243131	ADD	C	1.71	1.11-2.62	0.01
			DOM	C	2.24	1.30-3.85	0.003
IL-5	3	<i>IL12A</i> rs568408	ADD	A	1.78	1.12-2.82	0.01
			DOM	A	2.05	1.18-3.56	0.01
IFN- γ	3	<i>IL12A</i> rs582537	ADD	A	0.72	0.52-0.99	0.04
			DOM	A	0.63	0.41-0.96	0.03
IFN- γ	19	<i>EBI3</i> rs78749916	DOM	C	0.52	0.29-0.93	0.02

mRNA expression of *IL12A* and *EBI3* by real-time qPCR

Figure 1. shows the expression levels of the *IL12A* and *EBI3* genes assessed by Real-Time qPCR. As can be seen in Figure 1 (A) and (B) there were no difference for *IL12A* and *EBI3* gene expression among asthmatics in comparison to non-asthmatics subjects ($P > 0.05$) and also no difference (Figure 1 C and D) in terms of *IL12A* and *EBI3* gene expression among atopic and non-atopic subjects ($p > 0.05$). However, when we stratified subjects according to asthma and atopy together, as can be seen in Figure 1 (D) and (E), *IL12A* mRNA expression levels were decreased in atopic asthmatic subjects when compared with controls (non-asthmatic and non atopic individuals) (P value = 0.04) (E). *EBI3* expression levels were decreased in atopic asthmatic individuals (P value = 0.01) in comparison to both non-asthmatic and atopic individuals (P value = 0.03) and, when compared with controls (non-asthmatic and non-atopic individuals) (F). These data corroborate, at least in part, previous published studies carried out in the Chinese population where decreased levels of *EBI3* and *IL12A* mRNA in patients with asthma when compared to healthy controls (Ma et al. 2014; Wang, Li, and Yang 2015).

Another Chinese study that evaluated the expression of IL-35 in the peripheral blood of patients with allergic rhinitis found a reduction in *EBI3* mRNA in patients with allergic rhinitis, with the level of *EBI3* mRNA in the allergic rhinitis group being about half of the level found in the normal control group. The level of *IL-12A* mRNA expression in these patients showed a significant difference in relation to the normal control group (Wan, J., Luo, Y., Yang, C., Liu, J., Du, Y., & Wang 2014)

In this study, we were able to see the same reduction trend when we stratified for atopic asthma (Figure 1 E and F). This observation can lead us to hypothesize that considering non-atopic asthma account for a great part of our asthma cases, the effect on gene expression could be diluted in the asthma group. This also highlights the need of additional studies with a greater sample size to address this.

We did not measure IL-35 serum levels in blood or sputum, however, the data found in our study reinforce other results found in the literature. A study carried out in Egypt demonstrated that the IL-35 dosage was significantly lower in asthmatics than in the healthy control group. Furthermore, the serum level of IL-35 was significantly higher in non-atopic asthmatic patients than in atopic asthmatic patients (Mansour et al. 2017) corroborated by Li et al., 2020 findings, which showed that IL-35 concentrations in sputum are lower in asthmatics than in healthy controls.

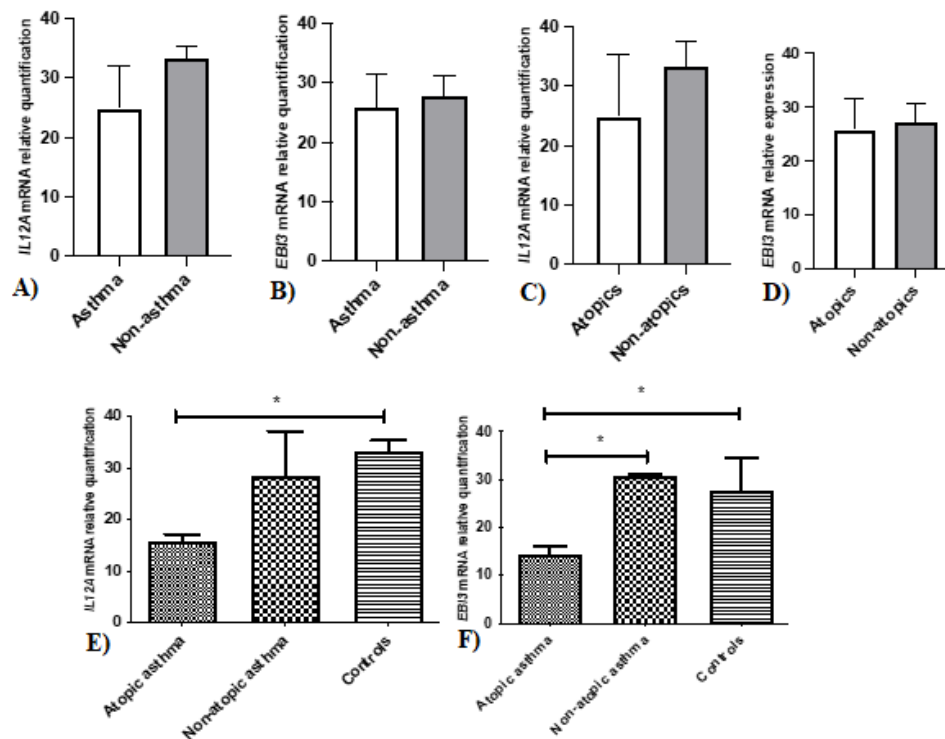


Figure 1. *IL12A* and *EB13* gene expression analysis according to asthma/atopy status. (A) and (B) *IL12A* and *EB13* mRNA gene expression, respectively, among asthmatics versus non-asthmatics subjects; (C) and (D) *IL12A* and *EB13* mRNA gene expression, respectively, among atopics versus non-atopics subjects and; (E) and (F) *IL12A* and *EB13* mRNA gene expression, respectively, for atopic asthmatics, non-atopic asthmatics and controls (non-atopic-non asthmatics).

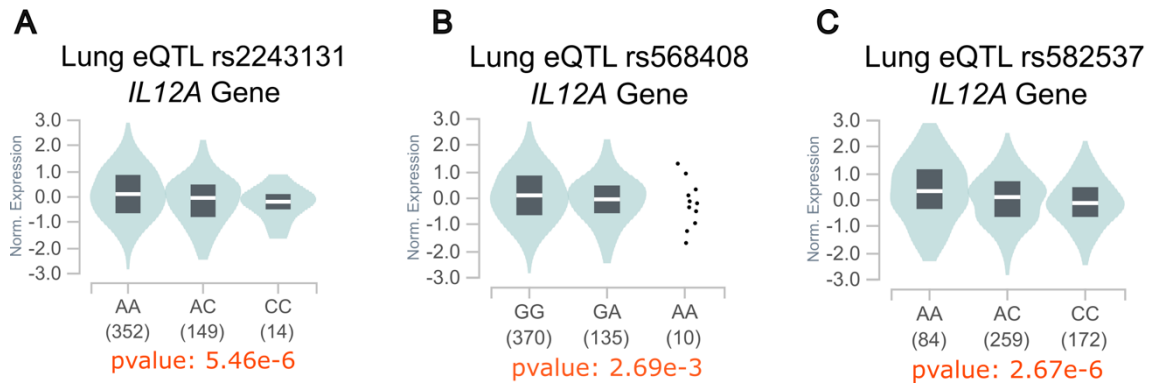


Figure 2: GTEx-*IL12A* gene expression levels in lung tissue according to SNVs genotypes: (A). rs2243131 (p-value 5.46×10^{-6}); (B). rs568408 (p-value 2.69×10^{-3}) and (C). rs582537 (p-value 2.67×10^{-6}).

Linkage disequilibrium

Figure 3 (A e B) shows the linkage disequilibrium (LD) analysis between the studied SNVs in the *IL12A* and *EBI3* genes. There is a high degree of linkage disequilibrium between the SNVs rs77145509 and rs76353132 from *EBI3* gene. The LD was also found between the SNVs rs2243131 and rs568408 in the *IL12A* gene. The LD plots were generated by the Haploview 4.2 program using the PLINK 1.9 data set.

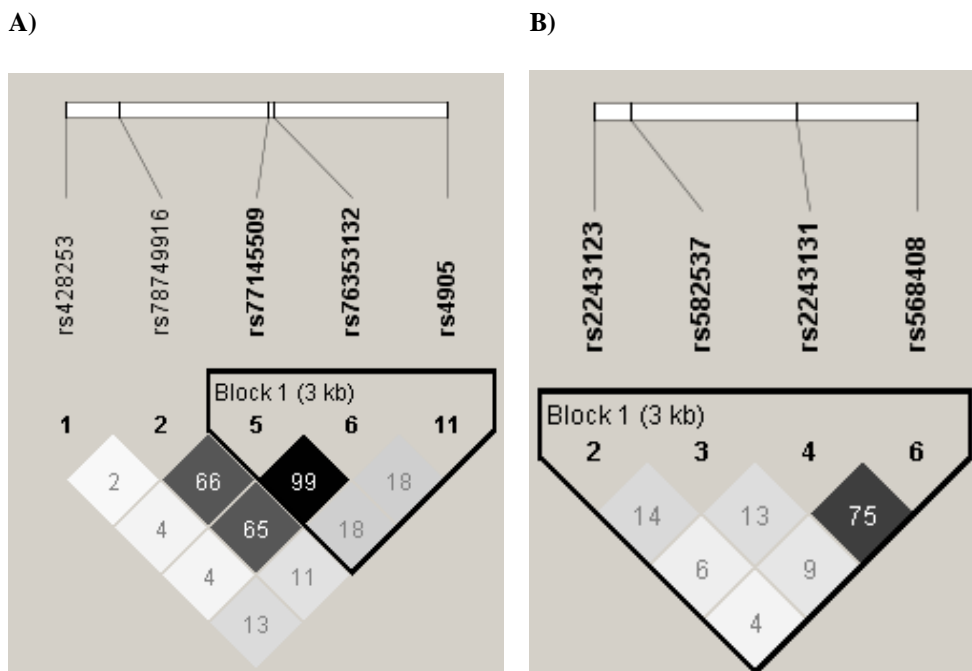


Figure 3: LD plots of SNVs from *IL12A* (A) and *EBI3* (B) genes, in the studied Brazilian cohort. The top horizontal bar illustrates the location of SNVs on a physical scale. The color of the squares illustrates the strength of pairwise r^2 values on a scale where black indicates perfect LD ($r^2 = 1$), shades of gray indicates imperfect LD ($0 < r^2 < 1$) and White indicates perfect equilibrium ($r^2 = 0$).

Taken all together, in this study we were able to, for the first time, describe new variants in IL-35 regulatory route linked to asthma and atopy and also corroborate with previous studies conducted in different environmental scenarios attesting that genetic variations in this route can have an impact on asthma and atopy.

CONCLUSION

In conclusion, polymorphisms in the *EBI3* and *IL12A* genes, which encode as subunits of the heterodimeric cytokine IL-35, are associated with asthma, asthma severity and atopy markers. This was the first study to demonstrate the association of these genes with asthma and atopy in the Brazilian population. Our results suggest that IL-35 plays an important role in the pathogenesis of childhood asthma.

REFERENCES

- Akar-Ghibril, Nicole, Thomas Casale, Adnan Custovic, and Wanda Phipatanakul. 2020. "Allergic Endotypes and Phenotypes of Asthma." *Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice* 8(2):429–40. doi: 10.1016/j.jaip.2019.11.008.
- Arce-Sillas, Asiel, Diana Denisse Álvarez-Luquín, Beatriz Tamaya-Domínguez, Sandra Gomez-Fuentes, Abel Trejo-García, Marlene Melo-Salas, Graciela Cárdenas, Juan Rodríguez-Ramírez, and Laura Adalid-Peralta. 2016. "Regulatory T Cells: Molecular Actions on Effector Cells in Immune Regulation." *Journal of Immunology Research* 2016. doi: 10.1155/2016/1720827.
- Barreto, Mauricio L., Sergio S. Cunha, Neuza Alcântara-Neves, Lain P. Carvalho, Álvaro A. Cruz, Renato T. Stein, Bernd Genser, Philip J. Cooper, and Laura C. Rodrigues. 2006. "Risk Factors and Immunological Pathways for Asthma and Other Allergic Diseases in Children: Background and Methodology of a Longitudinal Study in a Large Urban Center in Northeastern Brazil (Salvador-SCAALA Study)." *BMC Pulmonary Medicine* 6. doi: 10.1186/1471-2466-6-15.
- Behzadi, Payam, Elham Behzadi, and Reza Ranjbar. 2016. "IL-12 Family Cytokines: General Characteristics, Pathogenic Microorganisms, Receptors, and Signalling Pathways." *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 63(1):1–25. doi: 10.1556/030.63.2016.1.1.
- Bergantini, Laura, Miriana d'Alessandro, Paolo Cameli, Tommaso Pianigiani, Matteo Fanetti, Piersante Sestini, and Elena Bargagli. 2021. "Follicular T Helper and Breg Cell Balance in Severe Allergic Asthma Before and After Omalizumab Therapy." *Molecular Diagnosis and Therapy* 25(5):593–605. doi: 10.1007/s40291-021-00545-3.
- Boonpiyathad, Tadech, Zeynep Celebi Sözen, Mübeccel Akdis, and Cezmi A. Akdis. 2020. "The Role of Treg Cell Subsets in Allergic Disease." *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology* 38(3):139–49. doi: 10.12932/AP-030220-0754.
- Boonpiyathad, Tadech, Zeynep Celebi Sözen, Pattraporn Satitsuksanoa, and Cezmi A. Akdis. 2019. "Immunologic Mechanisms in Asthma." *Seminars in Immunology* 46(October):101333. doi: 10.1016/j.smim.2019.101333.
- Boyle, Alan P., Eurie L. Hong, Manoj Hariharan, Yong Cheng, Marc A. Schaub, Maya Kasowski, Konrad

- J. Karczewski, Julie Park, Benjamin C. Hitz, Shuai Weng, J. Michael Cherry, and Michael Snyder. 2012. "Annotation of Functional Variation in Personal Genomes Using RegulomeDB." *Genome Research* 22(9):1790–97. doi: 10.1101/gr.137323.112.
- Branchett, William J., and Clare M. Lloyd. 2019. "Regulatory Cytokine Function in the Respiratory Tract." *Mucosal Immunology* 12(3):589–600. doi: 10.1038/s41385-019-0158-0.
- Caminati, Marco, Duy Le Pham, Diego Bagnasco, and Giorgio Walter Canonica. 2018. "World Allergy Organization Journal." *World Allergy Organization Journal* 11:1–10.
- Cardoso, Thiago de Araujo, Cristian Roncada, Emerson Rodrigues da Silva, Leonardo Araujo Pinto, Marcus Herbert Jones, Renato Tetelbon Stein, and Paulo Márcio Pitrez. 2017. "Impacto Da Asma No Brasil: Análise Longitudinal de Dados Extraídos de Um Banco de Dados Governamental Brasileiro Thiago." *Jornal Brasileiro de Pneumologia* 43(3):163–68. doi: 10.1590/s1806-37562016000000352.
- Catalán, Diego, Miguel Andrés Mansilla, Ashley Ferrier, Lilian Soto, Kristine Oleinika, Juan Carlos Aguillón, and Octavio Aravena. 2021. "Immunosuppressive Mechanisms of Regulatory B Cells." *Frontiers in Immunology* 12(April):1–30. doi: 10.3389/fimmu.2021.611795.
- Costa, Ryan dos Santos, Camila Alexandrina Figueiredo, Mauricio Lima Barreto, Neuza Maria Alcantara-Neves, Laura Cunha Rodrigues, Alvaro A. Cruz, Candelaria Vergara, Nicholas Rafaels, Cassandra Foster, Joseph Potee, Monica Campbell, Rasika A. Mathias, and Kathleen C. Barnes. 2017. "Effect of Polymorphisms on TGFB1 on Allergic Asthma and Helminth Infection in an African Admixed Population." *Annals of Allergy, Asthma and Immunology* 118(4):483-488.e1. doi: 10.1016/j.anai.2017.01.028.
- Dharmage, Shyamali C., Jennifer L. Perret, and Adnan Custovic. 2019. "Epidemiology of Asthma in Children and Adults." *Frontiers in Pediatrics* 7(JUN):1–15. doi: 10.3389/fped.2019.00246.
- Enilari, Oladunni, and Sumita Sinha. 2019. "The Global Impact of Asthma in Adult Populatio." *Annals of Global Health* 85(1):1–7. doi: 10.5334/aogh.2412.
- Feng, Meng, Shuping Zhou, Tong Liu, Yong Yu, Qinghong Su, Xiaofan Li, Min Zhang, Xiao Xie, Tingting Liu, and Wei Lin. 2021. "Association Between Interleukin 35 Gene Single Nucleotide Polymorphisms and the Uveitis Immune Status in a Chinese Han Population." *Frontiers in Immunology* 12(December):1–11. doi: 10.3389/fimmu.2021.758554.
- Figueiredo, Camila Alexandrina, Leila D. Amorim, and Neuza M. Alcantara-neves. 2013. "Europe PMC Funders Group Asthma : New Evidence of How the Hygiene Hypothesis Operates in Latin America." 131(4):1064–68. doi: 10.1016/j.jaci.2013.01.016.Environmental.
- Figueiredo, Camila Alexandrina, Mauricio L. Barreto, Laura C. Rodrigues, Philip J. Cooper, Nívea Bispo Silva, Leila D. Amorim, and Neuza Maria Alcantara-Neves. 2010. "Chronic Intestinal Helminth Infections Are Associated with Immune Hyporesponsiveness and Induction of a Regulatory Network." *Infection and Immunity* 78(7):3160–67. doi: 10.1128/IAI.01228-09.
- Figueiredo, Camila Alexandrina, Maurício Lima Barreto, and Neuza Maria. 2016. "Europe PMC Funders Group Coassociations between IL10 Polymorphisms , IL-10 Production , Helminth Infection , and Asthma / Wheeze in an Urban Tropical Population in Brazil." 131(6):1683–90. doi: 10.1016/j.jaci.2012.10.043.Coassociations.
- Frank, Matthew G. annis, Watkins, Maier. 2019. "乳鼠心肌提取 HHS Public Access." *Physiology & Behavior* 34(80):678–87. doi: 10.1016/j.tig.2018.03.007.The.
- Del Giacco, Stefano R., A. Bakirtas, E. Bel, A. Custovic, Z. Diamant, E. Hamelmann, E. Heffler, Kalayci, S. Saglani, S. Sergejeva, S. Seys, A. Simpson, and L. Bjermer. 2017. "Allergy in Severe Asthma."

- Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology* 72(2):207–20. doi: 10.1111/all.13072.
- Guo, Liyuan, Yang Du, Suhua Chang, Kunlin Zhang, and Jing Wang. 2014. “RSNPBase: A Database for Curated Regulatory SNPs.” *Nucleic Acids Research* 42(D1):1033–39. doi: 10.1093/nar/gkt1167.
- Hamid, Qutayba, and Meri Tulic. 2009. “Immunobiology of Asthma.” *Annual Review of Physiology* 71:489–507. doi: 10.1146/annurev.physiol.010908.163200.
- Hammad, Hamida, and Bart N. Lambrecht. 2021. “The Basic Immunology of Asthma.” *Cell* 184(6):1469–85. doi: 10.1016/j.cell.2021.02.016.
- Herrera Luis, E., E. Forno, JC Celedón, and M. Pino Yanes. 2022. “Asthma Exacerbations : The Genes behind the Scenes.” *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology* 33(2):1–49. doi: 10.18176/jiaci.0878.
- Hu, Daiju. 2017. “Role of Anti-Inflammatory Cytokines IL-35 and IL-37 in Asthma.” *Inflammation* 40(2):697–707. doi: 10.1007/s10753-016-0480-6.
- Khan, Mohammad Afzal. 2020. “Regulatory T Cells Mediated Immunomodulation during Asthma: A Therapeutic Standpoint.” *Journal of Translational Medicine* 18(1):1–8. doi: 10.1186/s12967-020-02632-1.
- Kwilasz, A. J. 2016. “乳鼠心肌提取 HHS Public Access.” *Physiology & Behavior* 176(1):139–48. doi: 10.1016/j.ccm.2018.10.014.Proinflammatory.
- Lage-Castellanos, Agustín, Eduardo Martínez-Montes, Juan A. Hernández-Cabrera, and Lídice Galán. 2010. “False Discovery Rate and Permutation Test: An Evaluation in ERP Data Analysis.” *Statistics in Medicine* 29(1):63–74. doi: 10.1002/sim.3784.
- Laurie, Cathy C., Kimberly F. Doheny, Daniel B. Mirel, Elizabeth W. Pugh, Laura J. Bierut, Tushar Bhangale, Frederick Boehm, Neil E. Caporaso, Marilyn C. Cornelis, Howard J. Edenberg, Stacy B. Gabriel, Emily L. Harris, Frank B. Hu, Kevin B. Jacobs, Peter Kraft, Maria Teresa Landi, Thomas Lumley, Teri A. Manolio, Caitlin McHugh, Ian Painter, Justin Paschall, John P. Rice, Kenneth M. Rice, Xiuwen Zheng, and Bruce S. Weir. 2010. “Quality Control and Quality Assurance in Genotypic Data for Genome-Wide Association Studies.” *Genetic Epidemiology* 34(6):591–602. doi: 10.1002/gepi.20516.
- Layhadi, Janice A., Ibon Eguiluz-Gracia, and Mohamed H. Shamji. 2019. “Role of IL-35 in Sublingual Allergen Immunotherapy.” *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 19(1):12–17. doi: 10.1097/ACI.0000000000000499.
- Liu, Andrew H., Denise C. Babineau, Rebecca Z. Krouse, Edward M. Zoratti, Jacqueline A. Pongracic, George T. O’Connor, Robert A. Wood, Gurjit K. Khurana Hershey, Carolyn M. Kercsmar, Rebecca S. Gruchalla, Meyer Kattan, Stephen J. Teach, Melanie Makhija, Dinesh Pillai, Carin I. Lamm, James E. Gern, Steven M. Sigelman, Peter J. Gergen, Alkis Togias, Cynthia M. Visness, and William W. Busse. 2016. “Pathways through Which Asthma Risk Factors Contribute to Asthma Severity in Inner-City Children.” *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 138(4):1042–50. doi: 10.1016/j.jaci.2016.06.060.
- Lonsdale, John, Jeffrey Thomas, Mike Salvatore, Rebecca Phillips, Edmund Lo, Saboor Shad, Richard Hasz, Gary Walters, Fernando Garcia, Nancy Young, Barbara Foster, Mike Moser, Ellen Karasik, Bryan Gillard, Kimberley Ramsey, Susan Sullivan, Jason Bridge, Harold Magazine, John Syron, Johnelle Fleming, Laura Siminoff, Heather Traino, Maghboeba Mosavel, Laura Barker, Scott Jewell, Dan Rohrer, Dan Maxim, Dana Filkins, Philip Harbach, Eddie Cortadillo, Bree Berghuis, Lisa Turner, Eric Hudson, Kristin Feenstra, Leslie Sobin, James Robb, Phillip Branton, Greg

- Korzeniewski, Charles Shive, David Tabor, Liqun Qi, Kevin Groch, Sreenath Nampally, Steve Buia, Angela Zimmerman, Anna Smith, Robin Burges, Karna Robinson, Kim Valentino, Deborah Bradbury, Mark Cosentino, Norma Diaz-Mayoral, Mary Kennedy, Theresa Engel, Penelope Williams, Kenyon Erickson, Kristin Ardlie, Wendy Winckler, Gad Getz, David DeLuca, Daniel MacArthur, Manolis Kellis, Alexander Thomson, Taylor Young, Ellen Gelfand, Molly Donovan, Yan Meng, George Grant, Deborah Mash, Yvonne Marcus, Margaret Basile, Jun Liu, Jun Zhu, Zhidong Tu, Nancy J. Cox, Dan L. Nicolae, Eric R. Gamazon, Hae Kyung Im, Anuar Konkashbaev, Jonathan Pritchard, Matthew Stevens, Timothée Flutre, Xiaoquan Wen, Emmanouil T. Dermitzakis, Tuuli Lappalainen, Roderic Guigo, Jean Monlong, Michael Sammeth, Daphne Koller, Alexis Battle, Sara Mostafavi, Mark McCarthy, Manual Rivas, Julian Maller, Ivan Rusyn, Andrew Nobel, Fred Wright, Andrey Shabalina, Mike Feolo, Nataliya Sharopova, Anne Sturcke, Justin Paschal, James M. Anderson, Elizabeth L. Wilder, Leslie K. Derr, Eric D. Green, Jeffery P. Struewing, Gary Temple, Simona Volpi, Joy T. Boyer, Elizabeth J. Thomson, Mark S. Guyer, Cathy Ng, Assya Abdallah, Deborah Colantuoni, Thomas R. Insel, Susan E. Koester, A Roger Little, Patrick K. Bender, Thomas Lehner, Yin Yao, Carolyn C. Compton, Jimmie B. Vaught, Sherilyn Sawyer, Nicole C. Lockhart, Joanne Demchok, and Helen F. Moore. 2013. "The Genotype-Tissue Expression (GTEx) Project." *Nature Genetics* 45(6):580–85. doi: 10.1038/ng.2653.
- Ma, Siyuan, Pattaporn Satitsuksanoa, Kirstin Jansen, Lacin Cevhertas, Willem van de Veen, and Mübeccel Akdis. 2021. "B Regulatory Cells in Allergy." *Immunological Reviews* 299(1):10–30. doi: 10.1111/imr.12937.
- Ma, Yanyan, Xingli Liu, Zengtao Wei, Dong Xu, Shen Dai, Yan Li, Meng Gao, Changqin Ji, Chun Guo, Lining Zhang, and Xiaoyan Wang. 2014. "The Expression of a Novel Anti-Inflammatory Cytokine IL-35 and Its Possible Significance in Childhood Asthma." *Immunology Letters* 162(1):11–17. doi: 10.1016/j.imlet.2014.06.002.
- Maciag, Michelle C., and Wanda Phipatanakul. 2020. "Prevention of Asthma: Targets for Intervention." *Chest* 158(3):913–22. doi: 10.1016/j.chest.2020.04.011.
- Mansour, Amira Ibrahim, Eman Rateb Abd Almonaem, Ola Galal Behairy, and Tahany Mahmoud Gouda. 2017. "Predictive Value of IL-35 and IL-17 in Diagnosis of Childhood Asthma." *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 77(5):373–78. doi: 10.1080/00365513.2017.1328739.
- Marques, Cintia Rodrigues, Bianca Sampaio Dotto Fiuza, Thiago Magalhães da Silva, Tamires Cana Brasil Carneiro, Ryan Santos Costa, Monica Francisca de Assis Silva, Wagma Lauane Luz Viana, Valdirene Leão Carneiro, Neuza Maria Alcantara-Neves, Maurício Lima Barreto, and Camila Alexandrina Figueiredo. 2022. "Impact of FOXP3 Gene Polymorphisms and Gene-Environment Interactions in Asthma and Atopy in a Brazilian Population." *Gene* 838:146706. doi: 10.1016/J.GENE.2022.146706.
- Martín-Orozco, Elena, María Norte-Muñoz, and Javier Martínez-García. 2017. "Regulatory T Cells in Allergy and Asthma." *Frontiers in Pediatrics* 5(May):1–18. doi: 10.3389/fped.2017.00117.
- Meiler, Flurina, Judith Zumkehr, Sven Klunker, Beate Rückert, Cezmi A. Akdis, and Mübeccel Akdis. 2008. "In Vivo Switch to IL-10-Secreting T Regulatory Cells in High Dose Allergen Exposure." *The Journal of Experimental Medicine* 205(12):2887–98. doi: 10.1084/JEM.20080193.
- Mims, James W. 2015. "Asthma: Definitions and Pathophysiology." *International Forum of Allergy and Rhinology* 5(June):S2–6. doi: 10.1002/alr.21609.
- Moffatt, Miriam F., Michael Kabesch, Liming Liang, Anna L. Dixon, David Strachan, Simon Heath, Martin Depner, Andrea Von Berg, Albrecht Bufe, Ernst Rietschel, Andrea Heinzmann, Burkard Simma, Thomas Frischer, Saffron A. G. Willis-Owen, Kenny C. C. Wong, Thomas Illig, Christian

- Vogelberg, Stephan K. Weiland, Erika Von Mutius, Gonçalo R. Abecasis, Martin Farrall, Ivo G. Gut, G. Mark Lathrop, and William O. C. Cookson. 2007. "Genetic Variants Regulating ORMDL3 Expression Contribute to the Risk of Childhood Asthma." *Nature* 448(7152):470–73. doi: 10.1038/NATURE06014.
- Murdaca, Giuseppe, Monica Greco, Alessandro Tonacci, Simone Negrini, Matteo Borro, Francesco Puppo, and Sebastiano Gangemi. 2019. "IL-33/IL-31 Axis in Immune-Mediated and Allergic Diseases." *International Journal of Molecular Sciences* 20(23):1–15. doi: 10.3390/ijms20235856.
- Network, Global Asthma. 2018. *The Global Asthma Report 2014*.
- Ntontsi, Polyxeni, Andreas Photiades, Eleftherios Zervas, Georgina Xanthou, and Konstantinos Samitas. 2021. "Genetics and Epigenetics in Asthma." *International Journal of Molecular Sciences* 22(5):1–14. doi: 10.3390/ijms22052412.
- Oliveira, Pablo, Gustavo N. O. Costa, Andresa K. A. Damasceno, Fernando P. Hartwig, George C. G. Barbosa, Camila A. Figueiredo, Rita de C. Ribeiro-Silva, Alexandre Pereira, M. Fernanda Lima-Costa, Fernanda S. Kehdy, Eduardo Tarazona-Santos, Bernardo L. Horta, Laura C. Rodrigues, Rosemeire L. Fiaccone, and Maurício L. Barreto. 2018. "Genome-Wide Burden and Association Analyses Implicate Copy Number Variations in Asthma Risk among Children and Young Adults from Latin America." *Scientific Reports* 8(1):1–10. doi: 10.1038/s41598-018-32837-w.
- Padem, Nurcicek, and Carol Saltoun. 2019. "Classification of Asthma." *Allergy and Asthma Proceedings* 40(6):385–88. doi: 10.2500/aap.2019.40.4253.
- Palomares, Oscar, Mübeccel Akdis, Mar Martín-Fontecha, and Cezmi A. Akdis. 2017. "Mechanisms of Immune Regulation in Allergic Diseases: The Role of Regulatory T and B Cells." *Immunological Reviews* 278(1):219–36. doi: 10.1111/imr.12555.
- Platts-Mills, Thomas, John Vaughan, Susan Squillace, Judith Woodfolk, and Richard Sporik. 2001. "Sensitisation, Asthma, and a Modified Th2 Response in Children Exposed to Cat Allergen: A Population-Based Cross-Sectional Study." *Lancet (London, England)* 357(9258):752–56. doi: 10.1016/S0140-6736(00)04168-4.
- Posadas-Sánchez, Rosalinda, Nonanzit Pérez-Hernández, José Manuel Rodríguez-Pérez, Ramón M. Coral-Vázquez, Bladimir Roque-Ramírez, Luis Llorente, Guadalupe Lima, Carmina Flores-Dominguez, Teresa Villarreal-Molina, Carlos Posadas-Romero, and Gilberto Vargas-Alarcón. 2017. "Interleukin-27 Polymorphisms Are Associated with Premature Coronary Artery Disease and Metabolic Parameters in the Mexican Population: The Genetics of Atherosclerotic Disease (GEA) Mexican Study." *Oncotarget* 8(38):64459–70. doi: 10.18632/oncotarget.16223.
- Purcell, Shaun, Benjamin Neale, Kathe Todd-Brown, Lori Thomas, Manuel A. R. Ferreira, David Bender, Julian Maller, Pamela Sklar, Paul I. W. De Bakker, Mark J. Daly, and Pak C. Sham. 2007. "PLINK: A Tool Set for Whole-Genome Association and Population-Based Linkage Analyses." *American Journal of Human Genetics* 81(3):559–75. doi: 10.1086/519795.
- Sakaguchi, Shimon, Norihisa Mikami, James B. Wing, Atsushi Tanaka, Kenji Ichiyama, and Naganari Ohkura. 2020. "Regulatory T Cells and Human Disease." *Annual Review of Immunology* 38:541–66. doi: 10.1146/ANNUREV-IMMUNOL-042718-041717.
- Schoettler, Nathan, and Mary E. Strek. 2020. "Recent Advances in Severe Asthma: From Phenotypes to Personalized Medicine." *Chest* 157(3):516–28. doi: 10.1016/j.chest.2019.10.009.
- Shi, Fei, Yu Zhang, and Chen Qiu. 2022. "Gene Polymorphisms in Asthma: A Narrative Review." *Annals of Translational Medicine* 10(12):711–711. doi: 10.21037/atm-22-2170.
- Shum, Bennett O. V., Michael S. Rolph, and William A. Sewell. 2008. "Mechanisms in Allergic Airway

- Inflammation - Lessons from Studies in the Mouse." *Expert Reviews in Molecular Medicine* 10(15):1–18. doi: 10.1017/S1462399408000707.
- Stern, Jessica, Jennifer Pier, and Augusto A. Litonjua. 2020. "Asthma Epidemiology and Risk Factors." *Seminars in Immunopathology* 42(1):5–15. doi: 10.1007/s00281-020-00785-1.
- Taniguchi, Tadatsugu. 1995. "Cytokine Signaling Through Nonreceptor Protein Tyrosine Kinases." *Science* 268(April):1486.
- Thomsen, Simon F. 2015. "Epidemiology and Natural History of Atopic Diseases." *European Clinical Respiratory Journal* 2(1):24642. doi: 10.3402/ecrj.v2.24642.
- Toskala, Elina, and David W. Kennedy. 2015. "Asthma Risk Factors." *International Forum of Allergy and Rhinology* 5(September):S11–16. doi: 10.1002/alr.21557.
- Van De Veen, Willem, Barbara Stanic, Görkem Yaman, Marcin Wawrzyniak, Stefan Söllner, Deniz G. Akdis, Beate Rückert, Cezmi A. Akdis, and Mübecce Akdis. 2013. "IgG4 Production Is Confined to Human IL-10-Producing Regulatory B Cells That Suppress Antigen-Specific Immune Responses." *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 131(4):1204–12. doi: 10.1016/J.JACI.2013.01.014.
- Verschoor, Daniëlle, and Stephan Von Gunten. 2019. "Allergy and Atopic Diseases: An Update on Experimental Evidence." *International Archives of Allergy and Immunology* 180(4):235–43. doi: 10.1159/000504439.
- Victor, Jefferson Russo, Guillaume Lezmi, and Maria Leite-de-Moraes. 2020. "New Insights into Asthma Inflammation: Focus on INKT, MAIT, and $\gamma\delta$ T Cells." *Clinical Reviews in Allergy and Immunology* 59(3):371–81. doi: 10.1007/s12016-020-08784-8.
- Vignali, Dario A. A., and Vijay K. Kuchroo. 2012. "IL-12 Family Cytokines: Immunological Playmakers." *Nature Immunology* 13(8):722–28. doi: 10.1038/ni.2366.
- Vroman, Heleen, Bernt van den Blink, and Mirjam Kool. 2015. "Mode of Dendritic Cell Activation: The Decisive Hand in Th2/Th17 Cell Differentiation. Implications in Asthma Severity?" *Immunobiology* 220(2):254–61. doi: 10.1016/j.imbio.2014.09.016.
- Walker, Jennifer A., and Andrew N. J. McKenzie. 2018. "TH2 Cell Development and Function." *Nature Reviews Immunology* 18(2):121–33. doi: 10.1038/nri.2017.118.
- Wan, J., Luo, Y., Yang, C., Liu, J., Du, Y., & Wang, K. 2014. "[Expression of IL-35, Epstein-Barr Virus-Induced Gene 3 mRNA and IL-12A mRNA in Peripheral Blood of Patients with Allergic Rhinitis] - PubMed." *Journal of Clinical Otorhinolaryngology, Head, and Neck Surgery* 952–954.
- Wang, Wei, Ping Li, and Jiong Yang. 2015. "Decreased Circulating Interleukin-35 Levels Are Related to Interleukin-4-Producing CD8+ T Cells in Patients with Allergic Asthma." *Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology* 14(4):379–85.
- Wang, Wei, Chaojie Wei, Zhenshun Cheng, and Jiong Yang. 2020. "Aberrant Th2 Immune Responses Are Associated with a Reduced Frequency of IL-35-Induced Regulatory T Cells after Allergen Exposure in Patients with Allergic Asthma." *Allergy, Asthma and Immunology Research* 12(6):1029–45. doi: 10.4168/aaair.2020.12.6.1029.
- Xie, Qiang, Wang Dong Xu, Min Pan, You Yu Lan, Xiao Yan Liu, Lin Chong Su, and An Fang Huang. 2021. "Association of IL-35 Expression and Gene Polymorphisms in Rheumatoid Arthritis." *International Immunopharmacology* 90(August 2020):107231. doi: 10.1016/j.intimp.2020.107231.
- Zhang, Daoqi, and Jinxin Zheng. 2022. "The Burden of Childhood Asthma by Age Group, 1990–2019:

- A Systematic Analysis of Global Burden of Disease 2019 Data." *Frontiers in Pediatrics* 10(February):1–12. doi: 10.3389/fped.2022.823399.
- Zhao, Sheng tao, and Chang zheng Wang. 2018. "Regulatory T Cells and Asthma." *Journal of Zhejiang University: Science B* 19(9):663–73. doi: 10.1631/jzus.B1700346.
- Zheng, Song Guo, Juhua Wang, Pu Wang, J. Dixon Gray, and David A. Horwitz. 2007. "IL-2 Is Essential for TGF-Beta to Convert Naive CD4+CD25- Cells to CD25+Foxp3+ Regulatory T Cells and for Expansion of These Cells." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 178(4):2018–27. doi: 10.4049/JIMMUNOL.178.4.2018.
- Zhu, Xi Chen, Lan Tan, Teng Jiang, Meng Shan Tan, Wei Zhang, and Jin Tai Yu. 2014. "Association of IL-12A and IL-12B Polymorphisms with Alzheimer's Disease Susceptibility in a Han Chinese Population." *Journal of Neuroimmunology* 274(1–2):180–84. doi: 10.1016/j.jneuroim.2014.06.026.

5. CONCLUSÃO:

Variantes presentes nos genes *EBI3* e *IL12A*, que codificam as subunidades da citocina heterodimérica IL-35, estão associados à asma, gravidade da asma e marcadores de atopia. Este foi o primeiro estudo a demonstrar a associação desses genes com asma e atopia na população brasileira. Nossos resultados sugerem que a IL-35 desempenha um papel importante na patogênese da asma. Estudos a nível celular e molecular, em um número maior de pacientes, são necessários para entender melhor o impacto dos SNVs e da molécula IL-35 na asma. Com esses dados esperamos contribuir com vários outros trabalhos que buscam compreender o impacto das variantes genéticas em doenças complexas como asma e atopia.

6. REFERÊNCIAS:

- Akar-Ghibril, Nicole, Thomas Casale, Adnan Custovic, and Wanda Phipatanakul. 2020. "Allergic Endotypes and Phenotypes of Asthma." *Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice* 8(2):429–40. doi: 10.1016/j.jaip.2019.11.008.
- Arce-Sillas, Asiel, Diana Denisse Álvarez-Luquín, Beatriz Tamaya-Domínguez, Sandra Gomez-Fuentes, Abel Trejo-García, Marlene Melo-Salas, Graciela Cárdenas, Juan Rodríguez-Ramírez, and Laura Adalid-Peralta. 2016. "Regulatory T Cells: Molecular Actions on Effector Cells in Immune Regulation." *Journal of Immunology Research* 2016. doi: 10.1155/2016/1720827.
- Barreto, Mauricio L., Sergio S. Cunha, Neuza Alcântara-Neves, Lain P. Carvalho, Álvaro A. Cruz, Renato T. Stein, Bernd Genser, Philip J. Cooper, and Laura C. Rodrigues. 2006. "Risk Factors and Immunological Pathways for Asthma and Other Allergic Diseases in Children: Background and Methodology of a Longitudinal Study in a Large Urban Center in Northeastern Brazil (Salvador-SCAALA Study)." *BMC Pulmonary Medicine* 6. doi: 10.1186/1471-2466-6-15.
- Behzadi, Payam, Elham Behzadi, and Reza Ranjbar. 2016. "IL-12 Family Cytokines: General Characteristics, Pathogenic Microorganisms, Receptors, and Signalling Pathways." *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 63(1):1–25. doi: 10.1556/030.63.2016.1.1.
- Bergantini, Laura, Miriana d'Alessandro, Paolo Cameli, Tommaso Pianigiani, Matteo Fanetti, Piersante Sestini, and Elena Bargagli. 2021. "Follicular T Helper and Breg Cell Balance in Severe Allergic Asthma Before and After Omalizumab Therapy." *Molecular Diagnosis and Therapy* 25(5):593–605. doi: 10.1007/s40291-021-00545-3.
- Boonpiyathad, Tadech, Zeynep Celebi Sözen, Mübeccel Akdis, and Cezmi A. Akdis. 2020. "The Role of Treg Cell Subsets in Allergic Disease." *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology* 38(3):139–49. doi: 10.12932/AP-030220-0754.
- Boonpiyathad, Tadech, Zeynep Celebi Sözen, Pattaporn Satitsuksanoa, and Cezmi A. Akdis. 2019. "Immunologic Mechanisms in Asthma." *Seminars in Immunology* 46(October):101333. doi: 10.1016/j.smim.2019.101333.
- Boyle, Alan P., Eurie L. Hong, Manoj Hariharan, Yong Cheng, Marc A. Schaub, Maya Kasowski, Konrad J. Karczewski, Julie Park, Benjamin C. Hitz, Shuai Weng, J. Michael Cherry, and Michael Snyder. 2012. "Annotation of Functional Variation in Personal Genomes Using RegulomeDB." *Genome Research* 22(9):1790–97. doi: 10.1101/gr.137323.112.
- Branchett, William J., and Clare M. Lloyd. 2019. "Regulatory Cytokine Function in the Respiratory Tract." *Mucosal Immunology* 12(3):589–600. doi: 10.1038/s41385-019-0158-0.
- Caminati, Marco, Duy Le Pham, Diego Bagnasco, and Giorgio Walter Canonica. 2018. "World Allergy Organization Journal." *World Allergy Organization Journal* 11:1–10.
- Cardoso, Thiago de Araujo, Cristian Roncada, Emerson Rodrigues da Silva, Leonardo Araujo Pinto, Marcus Herbert Jones, Renato Tetelbon Stein, and Paulo Márcio Pitrez. 2017. "Impacto Da Asma No Brasil: Análise Longitudinal de Dados Extraídos de Um Banco de Dados Governamental Brasileiro Thiago." *Jornal Brasileiro de Pneumologia* 43(3):163–68. doi: 10.1590/s1806-37562016000000352.

- Catalán, Diego, Miguel Andrés Mansilla, Ashley Ferrier, Lilian Soto, Kristine Oleinika, Juan Carlos Aguillón, and Octavio Aravena. 2021. “Immunosuppressive Mechanisms of Regulatory B Cells.” *Frontiers in Immunology* 12(April):1–30. doi: 10.3389/fimmu.2021.611795.
- Costa, Ryan dos Santos, Camila Alexandrina Figueiredo, Mauricio Lima Barreto, Neuza Maria Alcantara-Neves, Laura Cunha Rodrigues, Alvaro A. Cruz, Candelaria Vergara, Nicholas Rafaels, Cassandra Foster, Joseph Potee, Monica Campbell, Rasika A. Mathias, and Kathleen C. Barnes. 2017. “Effect of Polymorphisms on TGFB1 on Allergic Asthma and Helminth Infection in an African Admixed Population.” *Annals of Allergy, Asthma and Immunology* 118(4):483-488.e1. doi: 10.1016/j.anai.2017.01.028.
- Dharmage, Shyamali C., Jennifer L. Perret, and Adnan Custovic. 2019. “Epidemiology of Asthma in Children and Adults.” *Frontiers in Pediatrics* 7(JUN):1–15. doi: 10.3389/fped.2019.00246.
- Enilari, Oladunni, and Sumita Sinha. 2019. “The Global Impact of Asthma in Adult Populatio.” *Annals of Global Health* 85(1):1–7. doi: 10.5334/aogh.2412.
- Feng, Meng, Shuping Zhou, Tong Liu, Yong Yu, Qinghong Su, Xiaofan Li, Min Zhang, Xiao Xie, Tingting Liu, and Wei Lin. 2021. “Association Between Interleukin 35 Gene Single Nucleotide Polymorphisms and the Uveitis Immune Status in a Chinese Han Population.” *Frontiers in Immunology* 12(December):1–11. doi: 10.3389/fimmu.2021.758554.
- Figueiredo, Camila Alexandrina, Leila D. Amorim, and Neuza M. Alcantara-neves. 2013. “Europe PMC Funders Group Asthma : New Evidence of How the Hygiene Hypothesis Operates in Latin America.” 131(4):1064–68. doi: 10.1016/j.jaci.2013.01.016.Environmental.
- Figueiredo, Camila Alexandrina, Mauricio L. Barreto, Laura C. Rodrigues, Philip J. Cooper, Nívea Bispo Silva, Leila D. Amorim, and Neuza Maria Alcantara-Neves. 2010. “Chronic Intestinal Helminth Infections Are Associated with Immune Hyporesponsiveness and Induction of a Regulatory Network.” *Infection and Immunity* 78(7):3160–67. doi: 10.1128/IAI.01228-09.
- Figueiredo, Camila Alexandrina, Maurício Lima Barreto, and Neuza Maria. 2016. “Europe PMC Funders Group Coassociations between IL10 Polymorphisms , IL-10 Production , Helminth Infection , and Asthma / Wheeze in an Urban Tropical Population in Brazil.” 131(6):1683–90. doi: 10.1016/j.jaci.2012.10.043.Coassociations.
- Frank, Matthew G. annis, Watkins, Maier. 2019. “乳鼠心肌提取 HHS Public Access.” *Physiology & Behavior* 34(80):678–87. doi: 10.1016/j.tig.2018.03.007.The.
- Del Giacco, Stefano R., A. Bakirtas, E. Bel, A. Custovic, Z. Diamant, E. Hamelmann, E. Heffler, Kalayci, S. Saglani, S. Sergejeva, S. Seys, A. Simpson, and L. Bjermer. 2017. “Allergy in Severe Asthma.” *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology* 72(2):207–20. doi: 10.1111/all.13072.
- Guo, Liyuan, Yang Du, Suhua Chang, Kunlin Zhang, and Jing Wang. 2014. “RSNPBase: A Database for Curated Regulatory SNPs.” *Nucleic Acids Research* 42(D1):1033–39. doi: 10.1093/nar/gkt1167.
- Hamid, Qutayba, and Meri Tulic. 2009. “Immunobiology of Asthma.” *Annual Review of Physiology* 71:489–507. doi: 10.1146/annurev.physiol.010908.163200.

- Hammad, Hamida, and Bart N. Lambrecht. 2021. "The Basic Immunology of Asthma." *Cell* 184(6):1469–85. doi: 10.1016/j.cell.2021.02.016.
- Herrera Luis, E., E. Forno, JC Celedón, and M. Pino Yanes. 2022. "Asthma Exacerbations : The Genes behind the Scenes." *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology* 33(2):1–49. doi: 10.18176/jiaci.0878.
- Hu, Daiju. 2017. "Role of Anti-Inflammatory Cytokines IL-35 and IL-37 in Asthma." *Inflammation* 40(2):697–707. doi: 10.1007/s10753-016-0480-6.
- Khan, Mohammad Afzal. 2020. "Regulatory T Cells Mediated Immunomodulation during Asthma: A Therapeutic Standpoint." *Journal of Translational Medicine* 18(1):1–8. doi: 10.1186/s12967-020-02632-1.
- Kwilasz, A. J. 2016. "乳鼠心肌提取 HHS Public Access." *Physiology & Behavior* 176(1):139–48. doi: 10.1016/j.ccm.2018.10.014.Proinflammatory.
- Lage-Castellanos, Agustín, Eduardo Martínez-Montes, Juan A. Hernández-Cabrera, and Lidice Galán. 2010. "False Discovery Rate and Permutation Test: An Evaluation in ERP Data Analysis." *Statistics in Medicine* 29(1):63–74. doi: 10.1002/sim.3784.
- Laurie, Cathy C., Kimberly F. Doheny, Daniel B. Mirel, Elizabeth W. Pugh, Laura J. Bierut, Tushar Bhangale, Frederick Boehm, Neil E. Caporaso, Marilyn C. Cornelis, Howard J. Edenberg, Stacy B. Gabriel, Emily L. Harris, Frank B. Hu, Kevin B. Jacobs, Peter Kraft, Maria Teresa Landi, Thomas Lumley, Teri A. Manolio, Caitlin McHugh, Ian Painter, Justin Paschall, John P. Rice, Kenneth M. Rice, Xiuwen Zheng, and Bruce S. Weir. 2010. "Quality Control and Quality Assurance in Genotypic Data for Genome-Wide Association Studies." *Genetic Epidemiology* 34(6):591–602. doi: 10.1002/gepi.20516.
- Layhadi, Janice A., Ibon Eguiluz-Gracia, and Mohamed H. Shamji. 2019. "Role of IL-35 in Sublingual Allergen Immunotherapy." *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 19(1):12–17. doi: 10.1097/ACI.0000000000000499.
- Liu, Andrew H., Denise C. Babineau, Rebecca Z. Krouse, Edward M. Zoratti, Jacqueline A. Pongracic, George T. O'Connor, Robert A. Wood, Gurjit K. Khurana Hershey, Carolyn M. Kerckmar, Rebecca S. Gruchalla, Meyer Kattan, Stephen J. Teach, Melanie Makhija, Dinesh Pillai, Carin I. Lamm, James E. Gern, Steven M. Sigelman, Peter J. Gergen, Alkis Togias, Cynthia M. Visness, and William W. Busse. 2016. "Pathways through Which Asthma Risk Factors Contribute to Asthma Severity in Inner-City Children." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 138(4):1042–50. doi: 10.1016/j.jaci.2016.06.060.
- Lonsdale, John, Jeffrey Thomas, Mike Salvatore, Rebecca Phillips, Edmund Lo, Saboor Shad, Richard Hasz, Gary Walters, Fernando Garcia, Nancy Young, Barbara Foster, Mike Moser, Ellen Karasik, Bryan Gillard, Kimberley Ramsey, Susan Sullivan, Jason Bridge, Harold Magazine, John Syron, Johnelle Fleming, Laura Siminoff, Heather Traino, Maghboeba Mosavel, Laura Barker, Scott Jewell, Dan Rohrer, Dan Maxim, Dana Filkins, Philip Harbach, Eddie Cortadillo, Bree Berghuis, Lisa Turner, Eric Hudson, Kristin Feenstra, Leslie Sobin, James Robb, Phillip Branton, Greg Korzeniewski, Charles Shive, David Tabor, Liqun Qi, Kevin Groch, Sreenath Nampally, Steve Buia, Angela Zimmerman, Anna Smith, Robin Burges, Karna Robinson, Kim Valentino, Deborah Bradbury, Mark Cosentino, Norma Diaz-Mayoral, Mary Kennedy, Theresa Engel, Penelope Williams, Kenyon Erickson, Kristin Ardlie, Wendy Winckler, Gad Getz, David DeLuca, Daniel MacArthur, Manolis Kellis, Alexander Thomson, Taylor

- Young, Ellen Gelfand, Molly Donovan, Yan Meng, George Grant, Deborah Mash, Yvonne Marcus, Margaret Basile, Jun Liu, Jun Zhu, Zhidong Tu, Nancy J. Cox, Dan L. Nicolae, Eric R. Gamazon, Hae Kyung Im, Anuar Konkashbaev, Jonathan Pritchard, Matthew Stevens, Timothée Flutre, Xiaoquan Wen, Emmanouil T. Dermitzakis, Tuuli Lappalainen, Roderic Guigo, Jean Monlong, Michael Sammeth, Daphne Koller, Alexis Battle, Sara Mostafavi, Mark McCarthy, Manuel Rivas, Julian Maller, Ivan Rusyn, Andrew Nobel, Fred Wright, Andrey Shabalín, Mike Feolo, Nataliya Sharopova, Anne Sturcke, Justin Paschal, James M. Anderson, Elizabeth L. Wilder, Leslie K. Derr, Eric D. Green, Jeffery P. Struewing, Gary Temple, Simona Volpi, Joy T. Boyer, Elizabeth J. Thomson, Mark S. Guyer, Cathy Ng, Assya Abdallah, Deborah Colantuoni, Thomas R. Insel, Susan E. Koester, A Roger Little, Patrick K. Bender, Thomas Lehner, Yin Yao, Carolyn C. Compton, Jimmie B. Vaught, Sherilyn Sawyer, Nicole C. Lockhart, Joanne Demchok, and Helen F. Moore. 2013. “The Genotype-Tissue Expression (GTEx) Project.” *Nature Genetics* 45(6):580–85. doi: 10.1038/ng.2653.
- Ma, Siyuan, Pattraporn Satitsuksanoa, Kirstin Jansen, Lacin Cevhertas, Willem van de Veen, and Mübeccel Akdis. 2021. “B Regulatory Cells in Allergy.” *Immunological Reviews* 299(1):10–30. doi: 10.1111/imr.12937.
- Ma, Yanyan, Xingli Liu, Zengtao Wei, Dong Xu, Shen Dai, Yan Li, Meng Gao, Changqin Ji, Chun Guo, Lining Zhang, and Xiaoyan Wang. 2014. “The Expression of a Novel Anti-Inflammatory Cytokine IL-35 and Its Possible Significance in Childhood Asthma.” *Immunology Letters* 162(1):11–17. doi: 10.1016/j.imlet.2014.06.002.
- Maciag, Michelle C., and Wanda Phipatanakul. 2020. “Prevention of Asthma: Targets for Intervention.” *Chest* 158(3):913–22. doi: 10.1016/j.chest.2020.04.011.
- Mansour, Amira Ibrahim, Eman Rateb Abd Almonaem, Ola Galal Behairy, and Tahany Mahmoud Gouda. 2017. “Predictive Value of IL-35 and IL-17 in Diagnosis of Childhood Asthma.” *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 77(5):373–78. doi: 10.1080/00365513.2017.1328739.
- Marques, Cintia Rodrigues, Bianca Sampaio Dotto Fiuza, Thiago Magalhães da Silva, Tamires Cana Brasil Carneiro, Ryan Santos Costa, Monica Francisca de Assis Silva, Wagma Lauane Luz Viana, Valdirene Leão Carneiro, Neuza Maria Alcantara-Neves, Maurício Lima Barreto, and Camila Alexandrina Figueiredo. 2022. “Impact of FOXP3 Gene Polymorphisms and Gene-Environment Interactions in Asthma and Atopy in a Brazilian Population.” *Gene* 838:146706. doi: 10.1016/J.GENE.2022.146706.
- Martín-Orozco, Elena, María Norte-Muñoz, and Javier Martínez-García. 2017. “Regulatory T Cells in Allergy and Asthma.” *Frontiers in Pediatrics* 5(May):1–18. doi: 10.3389/fped.2017.00117.
- Meiler, Flurina, Judith Zumkehr, Sven Klunker, Beate Rückert, Cezmi A. Akdis, and Mübeccel Akdis. 2008. “In Vivo Switch to IL-10-Secreting T Regulatory Cells in High Dose Allergen Exposure.” *The Journal of Experimental Medicine* 205(12):2887–98. doi: 10.1084/JEM.20080193.
- Mims, James W. 2015. “Asthma: Definitions and Pathophysiology.” *International Forum of Allergy and Rhinology* 5(June):S2–6. doi: 10.1002/alr.21609.
- Moffatt, Miriam F., Michael Kabesch, Liming Liang, Anna L. Dixon, David Strachan, Simon Heath, Martin Depner, Andrea Von Berg, Albrecht Bufe, Ernst Rietschel, Andrea Heinzmann, Burkard Simma, Thomas Frischer, Saffron A. G. Willis-Owen, Kenny C. C.

- Wong, Thomas Illig, Christian Vogelberg, Stephan K. Weiland, Erika Von Mutius, Gonçalo R. Abecasis, Martin Farrall, Ivo G. Gut, G. Mark Lathrop, and William O. C. Cookson. 2007. “Genetic Variants Regulating ORMDL3 Expression Contribute to the Risk of Childhood Asthma.” *Nature* 448(7152):470–73. doi: 10.1038/NATURE06014.
- Murdaca, Giuseppe, Monica Greco, Alessandro Tonacci, Simone Negrini, Matteo Borro, Francesco Puppo, and Sebastiano Gangemi. 2019. “IL-33/IL-31 Axis in Immune-Mediated and Allergic Diseases.” *International Journal of Molecular Sciences* 20(23):1–15. doi: 10.3390/ijms20235856.
- Network, Global Asthma. 2018. *The Global Asthma Report 2014*.
- Ntontsi, Polyxeni, Andreas Photiades, Eleftherios Zervas, Georgina Xanthou, and Konstantinos Samitas. 2021. “Genetics and Epigenetics in Asthma.” *International Journal of Molecular Sciences* 22(5):1–14. doi: 10.3390/ijms22052412.
- Oliveira, Pablo, Gustavo N. O. Costa, Andresa K. A. Damasceno, Fernando P. Hartwig, George C. G. Barbosa, Camila A. Figueiredo, Rita de C. Ribeiro-Silva, Alexandre Pereira, M. Fernanda Lima-Costa, Fernanda S. Kehdy, Eduardo Tarazona-Santos, Bernardo L. Horta, Laura C. Rodrigues, Rosemeire L. Fiaccone, and Maurício L. Barreto. 2018. “Genome-Wide Burden and Association Analyses Implicate Copy Number Variations in Asthma Risk among Children and Young Adults from Latin America.” *Scientific Reports* 8(1):1–10. doi: 10.1038/s41598-018-32837-w.
- Padem, Nurcicek, and Carol Saltoun. 2019. “Classification of Asthma.” *Allergy and Asthma Proceedings* 40(6):385–88. doi: 10.2500/aap.2019.40.4253.
- Palomares, Oscar, Mübeccel Akdis, Mar Martín-Fontecha, and Cezmi A. Akdis. 2017. “Mechanisms of Immune Regulation in Allergic Diseases: The Role of Regulatory T and B Cells.” *Immunological Reviews* 278(1):219–36. doi: 10.1111/imr.12555.
- Platts-Mills, Thomas, John Vaughan, Susan Squillace, Judith Woodfolk, and Richard Sporik. 2001. “Sensitisation, Asthma, and a Modified Th2 Response in Children Exposed to Cat Allergen: A Population-Based Cross-Sectional Study.” *Lancet (London, England)* 357(9258):752–56. doi: 10.1016/S0140-6736(00)04168-4.
- Posadas-Sánchez, Rosalinda, Nonanzit Pérez-Hernández, José Manuel Rodríguez-Pérez, Ramón M. Coral-Vázquez, Bladimir Roque-Ramírez, Luis Llorente, Guadalupe Lima, Carmina Flores-Dominguez, Teresa Villarreal-Molina, Carlos Posadas-Romero, and Gilberto Vargas-Alarcón. 2017. “Interleukin-27 Polymorphisms Are Associated with Premature Coronary Artery Disease and Metabolic Parameters in the Mexican Population: The Genetics of Atherosclerotic Disease (GEA) Mexican Study.” *Oncotarget* 8(38):64459–70. doi: 10.18632/oncotarget.16223.
- Purcell, Shaun, Benjamin Neale, Kathe Todd-Brown, Lori Thomas, Manuel A. R. Ferreira, David Bender, Julian Maller, Pamela Sklar, Paul I. W. De Bakker, Mark J. Daly, and Pak C. Sham. 2007. “PLINK: A Tool Set for Whole-Genome Association and Population-Based Linkage Analyses.” *American Journal of Human Genetics* 81(3):559–75. doi: 10.1086/519795.
- Sakaguchi, Shimon, Norihisa Mikami, James B. Wing, Atsushi Tanaka, Kenji Ichiyama, and Naganari Ohkura. 2020. “Regulatory T Cells and Human Disease.” *Annual Review of Immunology* 38:541–66. doi: 10.1146/ANNUREV-IMMUNOL-042718-041717.
- Schoettler, Nathan, and Mary E. Streck. 2020. “Recent Advances in Severe Asthma: From

- Phenotypes to Personalized Medicine.” *Chest* 157(3):516–28. doi: 10.1016/j.chest.2019.10.009.
- Shi, Fei, Yu Zhang, and Chen Qiu. 2022. “Gene Polymorphisms in Asthma: A Narrative Review.” *Annals of Translational Medicine* 10(12):711–711. doi: 10.21037/atm-22-2170.
- Shum, Bennett O. V., Michael S. Rolph, and William A. Sewell. 2008. “Mechanisms in Allergic Airway Inflammation - Lessons from Studies in the Mouse.” *Expert Reviews in Molecular Medicine* 10(15):1–18. doi: 10.1017/S1462399408000707.
- Stern, Jessica, Jennifer Pier, and Augusto A. Litonjua. 2020. “Asthma Epidemiology and Risk Factors.” *Seminars in Immunopathology* 42(1):5–15. doi: 10.1007/s00281-020-00785-1.
- Taniguchi, Tadatsugu. 1995. “Cytokine Signaling Through Nonreceptor Protein Tyrosine Kinases.” *Science* 268(April):1486.
- Thomsen, Simon F. 2015. “Epidemiology and Natural History of Atopic Diseases.” *European Clinical Respiratory Journal* 2(1):24642. doi: 10.3402/ecrj.v2.24642.
- Toskala, Elina, and David W. Kennedy. 2015. “Asthma Risk Factors.” *International Forum of Allergy and Rhinology* 5(September):S11–16. doi: 10.1002/alr.21557.
- Van De Veen, Willem, Barbara Stanic, Görkem Yaman, Marcin Wawrzyniak, Stefan Söllner, Deniz G. Akdis, Beate Rückert, Cezmi A. Akdis, and Mübeccel Akdis. 2013. “IgG4 Production Is Confined to Human IL-10-Producing Regulatory B Cells That Suppress Antigen-Specific Immune Responses.” *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 131(4):1204–12. doi: 10.1016/J.JACI.2013.01.014.
- Verschoor, Daniëlle, and Stephan Von Gunten. 2019. “Allergy and Atopic Diseases: An Update on Experimental Evidence.” *International Archives of Allergy and Immunology* 180(4):235–43. doi: 10.1159/000504439.
- Victor, Jefferson Russo, Guillaume Lezmi, and Maria Leite-de-Moraes. 2020. “New Insights into Asthma Inflammation: Focus on INKT, MAIT, and $\Gamma\delta$ T Cells.” *Clinical Reviews in Allergy and Immunology* 59(3):371–81. doi: 10.1007/s12016-020-08784-8.
- Vignali, Dario A. A., and Vijay K. Kuchroo. 2012. “IL-12 Family Cytokines: Immunological Playmakers.” *Nature Immunology* 13(8):722–28. doi: 10.1038/ni.2366.
- Vroman, Heleen, Bernt van den Blink, and Mirjam Kool. 2015. “Mode of Dendritic Cell Activation: The Decisive Hand in Th2/Th17 Cell Differentiation. Implications in Asthma Severity?” *Immunobiology* 220(2):254–61. doi: 10.1016/j.imbio.2014.09.016.
- Walker, Jennifer A., and Andrew N. J. McKenzie. 2018. “TH2 Cell Development and Function.” *Nature Reviews Immunology* 18(2):121–33. doi: 10.1038/nri.2017.118.
- Wan, J., Luo, Y., Yang, C., Liu, J., Du, Y., & Wang, K. 2014. “[Expression of IL-35, Epstein-Barr Virus-Induced Gene 3 mRNA and IL-12A mRNA in Peripheral Blood of Patients with Allergic Rhinitis] - PubMed.” *Journal of Clinical Otorhinolaryngology, Head, and Neck Surgery* 952–954.
- Wang, Wei, Ping Li, and Jiong Yang. 2015. “Decreased Circulating Interleukin-35 Levels Are Related to Interleukin-4-Producing CD8⁺ T Cells in Patients with Allergic Asthma.” *Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology* 14(4):379–85.
- Wang, Wei, Chaojie Wei, Zhenshun Cheng, and Jiong Yang. 2020. “Aberrant Th2 Immune

- Responses Are Associated with a Reduced Frequency of IL-35-Induced Regulatory T Cells after Allergen Exposure in Patients with Allergic Asthma.” *Allergy, Asthma and Immunology Research* 12(6):1029–45. doi: 10.4168/aair.2020.12.6.1029.
- Xie, Qiang, Wang Dong Xu, Min Pan, You Yu Lan, Xiao Yan Liu, Lin Chong Su, and An Fang Huang. 2021. “Association of IL-35 Expression and Gene Polymorphisms in Rheumatoid Arthritis.” *International Immunopharmacology* 90(August 2020):107231. doi: 10.1016/j.intimp.2020.107231.
- Zhang, Daoqi, and Jinxin Zheng. 2022. “The Burden of Childhood Asthma by Age Group, 1990–2019: A Systematic Analysis of Global Burden of Disease 2019 Data.” *Frontiers in Pediatrics* 10(February):1–12. doi: 10.3389/fped.2022.823399.
- Zhao, Sheng tao, and Chang zheng Wang. 2018. “Regulatory T Cells and Asthma.” *Journal of Zhejiang University: Science B* 19(9):663–73. doi: 10.1631/jzus.B1700346.
- Zheng, Song Guo, Juhua Wang, Pu Wang, J. Dixon Gray, and David A. Horwitz. 2007. “IL-2 Is Essential for TGF-Beta to Convert Naive CD4+CD25- Cells to CD25+Foxp3+ Regulatory T Cells and for Expansion of These Cells.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 178(4):2018–27. doi: 10.4049/JIMMUNOL.178.4.2018.
- Zhu, Xi Chen, Lan Tan, Teng Jiang, Meng Shan Tan, Wei Zhang, and Jin Tai Yu. 2014. “Association of IL-12A and IL-12B Polymorphisms with Alzheimer’s Disease Susceptibility in a Han Chinese Population.” *Journal of Neuroimmunology* 274(1–2):180–84. doi: 10.1016/j.jneuroim.2014.06.026.