

## Association of TGF- $\beta_1$ , CD14, IL-4, IL-4R and ADAM33 gene polymorphisms with asthma severity in children and adolescents

*Associação dos polimorfismos dos genes TGF- $\beta_1$ , CD14, IL-4, IL-4R e ADAM33 com a gravidade da asma em crianças e adolescentes*

Isabel C. J. de Faria<sup>1</sup>, Elisangela J. de Faria<sup>1</sup>, Adyléia A. D. C. Toro<sup>2</sup>, José Dirceu Ribeiro<sup>3</sup>, Carmen Silvia Bertuzzo<sup>4</sup>

### Resumo

**Objetivo:** Verificar, em uma amostra de pacientes com asma atópica persistente leve, moderada e grave, a associação entre os polimorfismos dos genes fator de crescimento transformante- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) (C-509T e T869C), CD14 (C-159T), IL-4 (C-590T), IL-4R (ILe50Val) e ADAM33 (S\_2) com a gravidade da asma.

**Métodos:** Realizou-se um estudo clínico laboratorial prospectivo em pacientes com asma atópica persistente, comparados a um grupo controle no Hospital Universitário da Universidade Estadual de Campinas nos anos de 2006 e 2007. A análise do polimorfismo T869C do gene TGF- $\beta_1$  foi realizada pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) + sistema de amplificação refratária de mutação (ARMS). Os outros polimorfismos, C-509T do gene TGF- $\beta_1$ , C-159T do gene CD14, C-590T da IL-4, ILe50Val da IL-4Ra e S2 do gene ADAM33, foram detectados por PCR e enzima de restrição.

**Resultados:** Foram incluídos 88 pacientes com asma atópica persistente (27 leves, 23 moderados e 38 graves) e 202 indivíduos saudáveis, doadores de sangue. Em relação ao polimorfismo T869C (TGF- $\beta_1$ ), observou-se uma associação entre o genótipo CC e os pacientes com asma grave. Nenhuma associação foi encontrada com os polimorfismos C-509T (TGF- $\beta_1$ ), C-590T (IL4) e S\_2 (ADAM33). Quando se comparou a distribuição da frequência genotípica do polimorfismo C-159T (CD14) na asma grave com o grupo controle, foi observado um resultado significativo com o genótipo TT. Houve associação significativa do genótipo Val/Val (IL-4R) com a asma leve.

**Conclusão:** Nossos resultados indicam que os polimorfismos T869C (TGF- $\beta_1$ ), C-159T (CD14) e Val/Val (IL-4R) podem estar envolvidos na modulação da gravidade da asma.

*J Pediatr (Rio J). 2008;84(3):203-210: Genes da asma, polimorfismos, SNP, ADAM33, CD14, TGF- $\beta_1$ .*

### Abstract

**Objective:** To verify the association of transforming growth factor- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) (C-509T and T869C), CD14 (C-159T), IL-4 (C-590T), IL-4R (ILe50Val) and ADAM33 (S\_2) gene polymorphisms with asthma severity in a sample of patients with mild, moderate and severe persistent atopic asthma.

**Methods:** A clinical, laboratory, prospective study was performed in patients with persistent atopic asthma, compared to a control group at Hospital Universitário da Universidade Estadual de Campinas between 2006 and 2007. Analysis of the TGF- $\beta_1$  T869C gene polymorphism was performed using the technique polymerase chain reaction (PCR) + amplification refractory mutation system (ARMS). TGF- $\beta_1$  C-509T, CD14 C-159T, IL-4 C-590T, IL-4Ra ILe50Val, and ADAM33 S2 gene polymorphisms were detected by PCR and restriction enzyme.

**Results:** This study included 88 patients with persistent atopic asthma (27 mild, 23 moderate and 38 severe) and 202 healthy blood donors. As to T869C polymorphism (TGF- $\beta_1$ ), there was an association between the CC genotype and patients with severe asthma. There was no association in polymorphisms C-509T (TGF- $\beta_1$ ), C-590T (IL-4) and S\_2 (ADAM33). When distribution of C-159T polymorphism genotype frequency (CD14) in severe asthma was compared with the control group, there was a significant result with the TT genotype. There was significant association of the Val/Val genotype (IL-4R) with mild asthma.

**Conclusion:** Our results indicate that T869C (TGF- $\beta_1$ ), C-159T (CD14) and Val/Val (IL-4R) polymorphisms might be involved in modulation of asthma severity.

*J Pediatr (Rio J). 2008;84(3):203-210: Asthma genes, polymorphisms, SNP, ADAM33, CD14, TGF- $\beta_1$ .*

1. Doutora. Bióloga, Departamento de Genética, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP.
2. Mestre. Médica assistente, Departamento de Pediatria, Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP, Campinas, SP. Centro de Investigação em Pediatria, UNICAMP, Campinas, SP.
3. Professor livre docente, Departamento de Pediatria, Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP, Campinas, SP. Pesquisador, Centro de Investigação em Pediatria, UNICAMP, Campinas, SP.
4. Doutora. Bióloga. Professora livre docente, Departamento de Genética, Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP, Campinas, SP.

Não foram declarados conflitos de interesse associados à publicação deste artigo.

**Como citar este artigo:** de Faria IC, de Faria EJ, Toro AA, Ribeiro JD, Bertuzzo CS. Association of TGF- $\beta_1$ , CD14, IL-4, IL-4R and ADAM33 gene polymorphisms with asthma severity in children and adolescents. *J Pediatr (Rio J)*. 2008;84(3):203-210.

Artigo submetido em 17.10.07, aceito em 28.02.08.

doi:10.2223/JPED.1783

## Introdução

A asma é a doença crônica mais comum na infância e adolescência. É causada por fatores genéticos e ambientais, e vários genes têm sido implicados na sua patogenia<sup>1</sup>.

Alguns estudos, incluindo com gêmeos<sup>2</sup>, têm mostrado que uma série de genes e seus polimorfismos influenciam os desenvolvimentos imune e pulmonar e a resposta a fatores ambientais, contribuindo para o aparecimento e/ou gravidade da asma. O gene fator de crescimento transformante- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) está localizado no cromossomo 19q13<sup>3,4</sup>.

Estudos sobre a associação dos polimorfismos C-509T e T869C do gene TGF- $\beta_1$  com o risco de asma têm sido controversos, sendo que alguns encontraram associação positiva<sup>5-8</sup> e outros negativa<sup>9,10</sup>, com níveis elevados de TGF- $\beta_1$ , imunoglobulina E (IgE) no plasma e maior risco de asma.

A proteína TGF- $\beta_1$  é uma citocina multifuncional que está aumentada no fluido do lavado brônquico de asmáticos quando comparada à de indivíduos não asmáticos<sup>11,12</sup>. Ela é importante no crescimento, transformação, reparo de tecido, fibrose e modulação de respostas imune inflamatórias<sup>13</sup>. Sua função na asma ainda não é completamente conhecida.

O gene CD14 está localizado no cromossomo 5q. O polimorfismo (C-159T) tem sido associado com alterações nos níveis de CD14 e IgE em várias populações de diferentes etnias<sup>14,15</sup>.

CD14 é um receptor multifuncional, sendo expresso na superfície de monócitos, macrófagos e neutrófilos ou solúvel no soro<sup>16</sup>. É o principal receptor de lipopolissacarídeos (LPS) ou endotoxinas inaladas, que são potentes indutoras da inflamação pulmonar, podendo ativar o sistema imune e promover a diferenciação de Th1 e/ou supressão de Th2<sup>17</sup>.

Tem sido proposto que expressões alteradas de CD14, mais aumentadas nos asmáticos depois da inalação com LPS<sup>18</sup>, possam alterar o balanço de células Th1-Th2, influenciando os níveis de IgE e a inflamação nas doenças alérgicas como a asma<sup>14</sup>.

Assim, as alterações na expressão de CD14 parecem ser importantes, particularmente na asma alérgica, e esta expressão é regulada, ao menos parcialmente, pelo gene.

O gene interleucina 4 (IL-4), localizado na região do cromossomo 5q31, também tem sido associado com atopia. A IL-4 é a principal citocina responsável pela mudança de expressão do linfócito B de imunoglobulina M (IgM) para IgE<sup>19</sup>.

A substituição do nucleotídeo (C-T) na posição -590 da região promotora do gene da IL4 está presente em aproximadamente 27% dos caucásios. O alelo IL4-590T foi associado com a expressão aumentada do gene *in vitro* e com maiores níveis de IgE *in vivo*<sup>20</sup>. O alelo IL4-590T foi associado com asma, rinite e atopia em um estudo com crianças com risco para doenças alérgicas<sup>19</sup>. Esse alelo também tem

sido associado com baixos valores de volume expiratório forçado do primeiro segundo (VEF<sub>1</sub>) em uma população caucásica com asma<sup>21</sup>. Esses dados sugerem que o polimorfismo C-590T poderia influenciar a gravidade da asma.

O gene receptor da interleucina 4 (IL-4R) está localizado no cromossomo 16 p12.1-p11.2, uma região ligada a aumento de respostas de IgE. Tem papel crucial na inflamação alérgica através de sua função na sinalização de IL-4 e IL-13<sup>22</sup>.

Vários polimorfismos de base única (SNP), identificados na região codificante deste gene, foram associados com asma e atopia<sup>23,24</sup>. O polimorfismo Ile50Val tem sido extensamente estudado e associado com níveis de IgE e asma atópica<sup>23</sup>; no entanto, nem todas as associações foram replicadas em outras populações<sup>25,26</sup>.

O gene desintegrina e metaloprotease 33 (ADAM33) está localizado no cromossomo 20p13, sendo inicialmente identificados 37 SNP<sup>27</sup>. Desde o primeiro relato de associação entre os polimorfismos de ADAM33 e asma em duas populações caucásicas do Reino Unido e dos EUA, um grande número de estudos tem sido publicado com diversos resultados. Várias associações entre diferentes fenótipos de asma, bem como hiperresponsividade brônquica (HRB) e diferentes SNP no gene, têm sido demonstradas<sup>28-30</sup>.

O ADAM33 foi o primeiro gene identificado por clonagem posicional a ser publicado como um possível candidato para o desenvolvimento de asma e HRB<sup>27</sup>. A proteína ADAM33 é expressa em células do músculo liso dos brônquios e fibroblastos pulmonares, exercendo importante função no remodelamento das vias aéreas<sup>31</sup>.

A asma tem sido descrita como um grupo heterogêneo de síndromes, mas poucos avanços têm sido encontrados para distinguir os numerosos fenótipos clínicos do ponto de vista genético-molecular.

O objetivo deste estudo foi verificar a associação entre os polimorfismos dos genes TGF- $\beta_1$  (C-509T e T869C), CD14 (C-159T), IL-4 (C-590T), IL-4R (Ile50Val) e ADAM33 (S<sub>2</sub>) com a gravidade da asma.

## Métodos

Realizou-se um estudo clínico laboratorial e prospectivo nos departamentos de genética médica e de pediatria (setor de pneumologia pediátrica) da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) nos anos de 2006-2007.

O estudo foi avaliado e aprovado pelo comitê de ética da instituição (parecer 172/2006), e todos os pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido antes de iniciarem o estudo.

Foram incluídas crianças e adolescentes, de ambos os gêneros, com asma atópica persistente (AAP) (leve, moderada e grave).

**Tabela 1** - Descrição do método, seqüências de *primers*, enzimas de restrição utilizadas e tamanho dos fragmentos gerados pelos polimorfismos dos genes TGF- $\beta_1$ , CD14, IL-4, IL-4R, ADAM33

Polimorfismos	Método	Primers	Fragmento amplificado (pb)	Enzimas de restrição e fragmentos (pb)	Referência
Gene TGF- $\beta_1$ (T869C)	PCR-ARMS	Primer geral ( <i>sense</i> ): 5'-tccgtgggatactgagacac-3'	241		34
		Primer C ( <i>antisense</i> ): 5'-gcagcggtagcagcagcg-3'			
		Primer T ( <i>antisense</i> ): 5'-agcagcggtagcagcagca-3'			
	PCR	Controle interno <i>primer</i> 1: 5'-gcctccaaccattccctta-3'	429		34
		Controle interno <i>primer</i> 2: 5'-tcacggatttctgtgttctc-3'			
(C-509T)	PCR + ER	5'-ccgcttctgtcctttctagg-3'			
		5' aaagcgggtgatccagatg-3'	406	Eco 81I (SauI), 223 e 183	6
Gene CD14 (C-159T)	PCR + ER	5'-gtgccaacagatgaggttcac-3'			
		5'-gcctctgacagttttatgtaatc-3'	497	AvaII, 144 e 353	35
Gene IL-4 (C-590T)	PCR + ER	5'-taaactgggagaacatggt-3'			
		5'-tggggaaagatagagtaata-3'	195	AvaII, 177 e 19	36
Gene IL-4R (Ile50Val)	PCR + ER	5'-ggcaggtgtgaggagcatcc-3'			
		5'-gcctccgtgttctcagga-3'	273	RsaI, 254 e 19	36
Gene ADAM33 (S_2)	PCR + ER	5'-cgagaccatgacaccttct-3'			
		5'-gcacgcagggtccctct-3'	148	Hinp I, 63 e 85	37

ARMS = sistema de amplificação refratária de mutação; ER = enzima de restrição; PCR = reação em cadeia da polimerase.

Os pacientes foram diagnosticados conforme o grau de gravidade da asma segundo os critérios da *Global Initiative for Asthma*<sup>32</sup> (GINA), e todos apresentavam evidência espirométrica de resposta ao uso de medicamentos beta-agonistas, reatividade positiva nos testes cutâneos de hipersensibilidade imediata para antígenos inalatórios e aumento dos níveis séricos de IgE.

O DNA foi extraído de células de sangue periférico, de acordo com o método clássico de fenol/clorofórmio<sup>33</sup>.

Os métodos, as seqüências de *primers* e as enzimas de restrição utilizadas, bem como o tamanho dos fragmentos gerados pelos polimorfismos<sup>34-37</sup> dos genes TGF- $\beta_1$ , CD14, IL-4, IL-4R, ADAM33, estão descritos na Tabela 1.

#### Análise estatística

As análises da associação das variações entre os pacientes asmáticos e o grupo controle foram feitas através do teste

qui-quadrado de Pearson, sendo que, em determinadas análises, devido ao valor das caselas, foram agregados genótipos e utilizado o teste exato de Fisher. Foi realizado o cálculo de *odds ratio* (OR) pelo teste exato de Fisher. A diferença entre os grupos foi estatisticamente significativa quando o valor do teste aplicado foi  $p < 0,05$ . O programa estatístico utilizado foi o Epi-Info 2000, versão 1.1.2.

#### Resultados

Foram avaliadas 88 crianças e adolescentes asmáticos, 53% femininos, 7-18 anos de idade, média de idade de  $10,3 \pm 2,79$  anos e grupo étnico composto de 92% caucasóides, 7% pardos e 1% negróides. O grupo controle foi constituído de 202 sujeitos (média de idade de  $34 \pm 11,3$  anos), doadores de sangue, sendo 79,2% caucasóides, 20,3% negróides e 0,5% de etnia oriental.

**Tabela 2** - Distribuição genotípica dos polimorfismos: T869C, C-509T (TGF- $\beta_1$ ), C-159T (CD14), Ile50Val (IL-4Ra), C-590T (IL-4), S\_2 (ADAM33) em pacientes asmáticos e controles

Genótipos	Asma leve (n = 27)	Asma moderada (n = 23)	Asma grave (n = 38)	Controle (n = 202)
<b>TGF-<math>\beta_1</math> (T869C)</b>				
TT	4 (14,8%)	4 (17,4%)	10 (26,3%)	43 (21,3%)
TC	21 (77,7%)	18 (78,2%)	16 (42,1%)	132 (65,3%)
CC	2 (7,4%)	1 (4,3%)	12 (31,6%)	27 (13,4%)
Total	27	23	38	202
<b>TGF-<math>\beta_1</math> (C-509T)</b>				
CC	12 (44,4%)	6 (26%)	14 (36,9%)	58 (28,7%)
CT	13 (48,1%)	12 (52,2%)	17 (44,7%)	112 (55,4%)
TT	2 (7,4%)	5 (21,7%)	7 (30,4%)	32 (15,8%)
Total	27	23	38	202
<b>CD14 (C-159T)</b>				
TT	4 (14,8%)	4 (17,4%)	12 (31,6%)	8 (4%)
TC	16 (59,2%)	11 (47,8%)	14 (36,8%)	131 (64,8%)
CC	7 (26%)	8 (34,8%)	12 (31,6%)	63 (31,2%)
Total	27	23	38	202
<b>IL-4Ra (Ile50Val)</b>				
Val/Val	9 (33,3%)	5 (21,7%)	2 (5,2%)	39 (19,3%)
Val/Ile	14 (51,9%)	13 (56,5%)	25 (65,8%)	96 (47,5%)
Ile/Ile	4 (14,8%)	5 (21,7%)	11 (29%)	67 (33,2%)
Total	27	23	38	202
<b>IL-4 (C-590T)</b>				
CC	9 (33,3%)	10 (43,5%)	19 (50%)	67 (33,1%)
CT	13 (48,1%)	11 (47,8%)	17 (44,7%)	108 (53,5%)
TT	5 (18,5%)	2 (8,7%)	2 (5,3%)	27 (13,4%)
Total	27	23	38	202
<b>ADAM33 (S_2)</b>				
CC	5 (18,5%)	1 (4,3%)	5 (13,2%)	11 (5,4%)
CG	9 (33,3%)	12 (52,1%)	17 (44,7%)	136 (67,3%)
GG	13 (48,1%)	10 (43,5%)	16 (42,1%)	55 (27,2%)
Total	27	23	38	202

Dentre os pacientes com AAP, havia 27 leves, 23 moderadas e 38 graves (Tabela 2).

Com relação ao polimorfismo T869C (TGF- $\beta_1$ ), a amostra de pacientes asmáticos encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) ( $\chi^2_{(2)} = 2,83$ ;  $p = 0,24$ ), o que não acontece com a amostra controle ( $\chi^2_{(2)} = 10,58$ ;  $p = 0,005$ ). Não foi encontrada diferença na distribuição genotípica entre asmáticos e grupo controle ( $\chi^2_{(2)} = 0,67$ ;  $p = 0,71$ ), o mesmo ocorrendo entre os grupos de gravidade variável. No entanto, na comparação de cada grupo de gravidade com o grupo controle, observou-se uma diferença significativa em relação à

asma grave e o grupo controle ( $\chi^2_{(2)} = 9,70$ ;  $p = 0,007$ ). Essa diferença ocorria devido a um acúmulo de indivíduos com genótipo CC entre asmáticos graves em relação ao grupo controle. Portanto, o genótipo CC poderia ser um fator de gravidade para a asma ( $\chi^2 = 7,80$ ;  $p = 0,005$ ; OR = 2,99, 1,25-7,09).

Para o polimorfismo C-509T do gene TGF- $\beta_1$ , a amostra de pacientes asmáticos estava em EHW ( $\chi^2_{(2)} = 0$ ;  $p = 1$ ), bem como a amostra controle ( $\chi^2_{(2)} = 1,79$ ;  $p = 0,41$ ). Os genótipos CT e TT foram agrupados quando mostravam valor  $< 5$  para a análise estatística. Não houve diferenças significativas com relação à presença e gravidade da asma.

Com relação ao polimorfismo C-159T (CD14), a amostra de pacientes estava em EHW ( $\chi^2_{(2)} = 0,21$ ;  $p = 0,90$ ), o mesmo não acontecendo com a amostra controle ( $\chi^2_{(2)} = 18,72$ ;  $p = 0,00008$ ). A distribuição genotípica por grupo de gravidade não mostrou diferença estatística.

Quando se comparou a distribuição genotípica da asma grave com o grupo controle, foi observado resultado significativo com acúmulo do genótipo TT em relação à asma grave ( $\chi^2_{(2)} = 44,02$ ;  $p = 0,000000$ ). Constatou-se que o genótipo TT representou um fator de risco para a asma grave ( $\chi^2 = 31,94$ ;  $p = 0,000$ ; OR = 11,19, 3,74-34,24).

Com relação ao polimorfismo Ile50Val (IL-4R), a amostra de pacientes ( $\chi^2_{(2)} = 1,47$ ;  $p = 0,47$ ) e de controles ( $\chi^2_{(2)} = 0,11$ ;  $p = 0,94$ ) estava em EHW. Quando foi realizada a distribuição genotípica por gravidade da asma, na comparação entre a asma leve e grave, foi observada diferença estatística significativa com o aumento de portadores do genótipo Val/Val entre asmáticos do grupo leve. Verificou-se que o genótipo Val/Val representou um fator de proteção para a gravidade da asma ( $\chi^2_{(2)} = 8,85$ ;  $p = 0,004$ ; OR = 9,0, 1,54-90,89).

Considerando o polimorfismo C-590T (IL-4), a amostra de pacientes ( $\chi^2_{(2)} = 0,06$ ;  $p = 0,96$ ) e controles ( $\chi^2_{(2)} = 1,27$ ;  $p = 0,53$ ) estava em EHW, e não houve diferenças significativas com relação à presença e gravidade da asma.

Para o polimorfismo S-2 (ADAM33), a amostra de pacientes estava em EHW ( $\chi^2_{(2)} = 0,11$ ;  $p = 0,94$ ), ao passo que a amostra controle não estava ( $\chi^2_{(2)} = 19,50$ ;  $p = 0,000058$ ). Quando foi comparada a distribuição genotípica entre os grupos de gravidade, nenhuma alteração foi encontrada.

## Discussão

Este é o primeiro estudo no Brasil a verificar a associação entre os polimorfismos dos genes TGF- $\beta_1$  (C-509T e T869C), CD14 (C-159T), IL-4 (C-590T), IL-4R (Ile50Val) e ADAM33 (S\_2) com a gravidade da asma.

A asma pode ser denominada uma doença genética complexa em que há múltiplos efeitos genéticos interagindo com o ambiente para modificar a susceptibilidade e a gravidade da doença<sup>38</sup>.

Em alguns polimorfismos, a amostra controle não se encontrava em EHW. Acredita-se que isso se deva ao fato de que, na Lei, preconiza-se uma população ideal, e nossa amostra controle foi constituída por doadores de sangue, entre os quais são selecionados indivíduos saudáveis. Nos casos dos polimorfismos estudados, por interferirem em mecanismos relacionados com a inflamação, ao utilizar doadores de sangue, estaremos excluindo indivíduos que tenham genótipos desfavoráveis. Com isso, acabamos por utilizar uma população mais homogênea e antagônica em termos fenotípicos em relação à de asmáticos e, portanto, pequenas alterações poderiam ser melhor evidenciadas. De qualquer maneira, houve uma maior valorização dos resultados encontrados entre os grupos de gravidade.

Pulleyn et al.<sup>5</sup> encontraram uma associação entre o polimorfismo C-509T do gene TGF- $\beta_1$  e a gravidade da asma, sendo que houve diferença significativa na frequência de genótipos de C-509T quando o grupo leve, grave e os controles eram comparados. Houve um alto nível de homocigotos para o alelo -509T no grupo grave. Quase duas vezes mais (1,8 vezes) asmáticos graves tinham o genótipo TT, quando comparados a asmáticos do grupo leve, e esta diferença aumentava para 5,6 vezes quando comparados aos controles. Uma diferença significativa também existiu quando somente os grupos leve e grave foram comparados. Esses resultados sugerem que este alelo está mais associado com a gravidade preferencialmente do que com o início da asma ou atopia, em contraste com estudos nos quais os polimorfismos têm sido comparados entre asmáticos e controles, como na IL-13<sup>39</sup>.

Há evidências de que os polimorfismos C-509T e T869C de TGF- $\beta_1$  estejam associados à atividade transcricional do gene. O polimorfismo C-509T, em homocigose, foi associado com níveis baixos da concentração de TGF- $\beta_1$  circulante, quando comparado com outros genótipos, em mulheres brancas e na população indiana<sup>3</sup>. Por outro lado, o genótipo CC do polimorfismo T869C foi relacionado com uma alta concentração de TGF- $\beta_1$  em japoneses<sup>40</sup>, mas não em indivíduos brancos<sup>41</sup>. Em outro estudo, Li et al.<sup>8</sup> verificaram que os polimorfismos C-509T e T869C aumentavam o risco de asma e atopia em crianças no México.

Tem sido sugerido que o aumento da expressão de TGF- $\beta_1$  deve ser prejudicial para as vias aéreas de indivíduos com asma, estimulando o remodelamento das mesmas. Sobre este paradigma, variantes genéticas que estão associadas com níveis elevados de TGF- $\beta_1$ , como o alelo T de C-509T e o alelo C de T869C, deveriam estar associadas à alta prevalência ou ao aumento da gravidade da asma<sup>7</sup>.

O polimorfismo T869C do gene TGF- $\beta_1$ , em nossa amostra, mostrou uma associação entre o genótipo CC e os pacientes portadores de asma grave. Não houve diferença significativa entre o grupo total de asmáticos e o grupo controle saudável com relação ao genótipo CC. No entanto, Mak et al.<sup>7</sup>, estudando 250 chineses portadores de asma, demonstraram que os indivíduos com genótipo CC teriam maior susceptibilidade à asma. Com relação ao polimorfismo C-509T, em nosso estudo, nenhuma associação foi encontrada.

O polimorfismo C-159T do gene CD14 tem sido associado ao aumento da expressão de CD14 *in vitro* e no soro de crianças<sup>14</sup>, com níveis séricos alterados de IgE e testes alérgicos positivos em diferentes populações<sup>14,15</sup>. Kedda et al.<sup>35</sup> confirmaram associações entre C-159T e atopia, mas não encontraram associação entre este polimorfismo e asma ou gravidade da asma em uma população australiana.

É possível que o polimorfismo C-159T tenha uma influência relacionada à idade no desenvolvimento de atopia. Este polimorfismo tem sido associado à expressão aumentada de CD14 no soro de crianças<sup>13</sup>, e não há diferenças nos níveis de

CD14 no soro de doadores de sangue adultos com diferentes genótipos para CD14<sup>35</sup>. Adicionalmente, em um estudo longitudinal em indivíduos brancos da Austrália com idade entre 8-25 anos, foi encontrado que os portadores do genótipo CC eram provavelmente os que tinham atopia mais cedo, sugerindo que a influência do polimorfismo -159C na atopia pode ser específico da idade<sup>42</sup>. Existem evidências que atopia e asma são entidades próximas e estão relacionadas à associação positiva entre o nível sérico de IgE, testes alérgicos positivos, hiperresponsividade e desenvolvimento de asma<sup>43</sup>. Espera-se, então, que alelos associados com atopia tenham prevalência mais alta entre asmáticos do que na população geral<sup>15</sup>. Não há publicações mostrando associação entre o polimorfismo C-159T e a gravidade da asma, embora tenha sido sugerido que este polimorfismo modifique a gravidade da obstrução do fluxo aéreo em asmáticos<sup>35</sup>.

No presente estudo, quando se comparou a distribuição genotípica do polimorfismo C-159T na asma grave com o grupo controle, foi observado um resultado significativo com genótipo TT em relação à asma grave. Constatamos que o genótipo TT representou um fator de risco para a asma grave.

No polimorfismo C-590T do gene da IL-4, sua variante está relacionada com o aumento da transcrição do gene. A incidência deste polimorfismo em um estudo com estadunidenses foi de 40%, e o alelo T esteve associado ao aumento da produção de IgE, testes alérgicos positivos e asma<sup>20</sup>. Essa associação não foi encontrada em australianos, britânicos<sup>44</sup> e italianos<sup>45</sup>. Estudos em japoneses confirmaram a associação deste polimorfismo com asma<sup>25</sup> e dermatite atópica<sup>20</sup>. Esse polimorfismo também foi relacionado com atopia<sup>20</sup> e decréscimo da função pulmonar<sup>44</sup>. Kamali-Sarvestani et al.<sup>46</sup>, ao analisarem o polimorfismo C-590T em asmáticos do Irã, verificaram que esse polimorfismo estava associado com a asma e poderia modular sua gravidade.

A IL-4 exerce suas funções através da ligação com seu receptor, a IL-4R. No polimorfismo Ile50Val do gene da IL-4Ra, a variante Ile50 foi associada com asma atópica e não teve associação com a não atópica em japoneses. Inversamente, Noguchi et al.<sup>25</sup> verificaram que o polimorfismo Ile50Val não exerce função na predisposição genética da etiologia da atopia ou asma em outra população japonesa. Outros estudos não encontraram associação entre este polimorfismo e asma em outros grupos étnicos<sup>26,47,48</sup>. Zhang et al.<sup>49</sup>, ao investigarem uma associação entre o polimorfismo Ile50Val com a asma e níveis altos de IgE, em três populações asiáticas provenientes da China, Malásia e Índia, verificaram que, na China, a prevalência do genótipo Ile50/Ile50 era significativamente menor que na Malásia, sendo que este genótipo está relacionado com o aumento de IgE somente na Malásia. Esse estudo mostrou que a associação entre este polimorfismo e a asma difere nesses grupos étnicos. Howard et al.<sup>50</sup> analisaram os polimorfismos do gene IL-4R em famílias da Alemanha e não observaram evidências de que o polimorfismo Ile50Val seja o principal responsável pela susceptibilidade

da alergia, sugerindo que outros polimorfismos da IL-4R estariam associados com asma e atopia.

Com relação ao polimorfismo C-590T do gene IL-4, em nosso estudo, nenhuma associação foi encontrada. Com relação ao polimorfismo Ile50Val do gene IL-4R, verificou-se que o genótipo Val/Val representou um fator de proteção para a gravidade da asma.

Hirota et al.<sup>51</sup> encontraram uma significativa associação com a susceptibilidade de asma em uma população japonesa para três SNP (S\_2, T\_1, T\_2). Esses resultados são consistentes com outro estudo em uma população caucasóide dos EUA<sup>52</sup>.

Jongepier et al.<sup>28</sup> investigaram fatores genéticos e ambientais que possam ter contribuído para esse declínio acelerado em 200 pacientes com asma crônica, os quais foram estudados anualmente por 25 anos. Esses autores mostraram que a variante do polimorfismo do alelo S\_2 estava significativamente associada com o declínio dos valores VEF<sub>1</sub> e concluíram que esta variante de ADAM33 não era somente importante no desenvolvimento da asma, mas também na progressão da doença e aumento do remodelamento das vias aéreas.

Simpson et al.<sup>53</sup> verificaram recentemente que polimorfismos em ADAM33 poderiam influenciar a função pulmonar na infância e concluíram que a mesma, no início da vida, é geneticamente determinada, podendo aumentar o risco de asma. Neste estudo, nenhuma associação foi encontrada em relação ao ADAM33 e a alergia.

No presente estudo, quando foi comparada a distribuição genotípica do polimorfismo S\_2 entre os grupos de gravidade, nenhuma alteração foi encontrada.

É possível que resultados diferentes possam ser encontrados em outras populações ou grupos raciais. Como diferenças étnicas e raciais são comuns em sistemas polimórficos, alelos variantes ou grupos de genes interagindo induzem a expressão do fenótipo clínico em diferentes populações.

Portanto, em nosso estudo, os polimorfismos T869C do gene TGF- $\beta_1$ , C-159T do gene CD14 e Ile50Val do gene IL-4R podem ser moduladores da gravidade da asma. Embora nosso estudo tenha incluído vários genes e seus polimorfismos e tenha mostrado que genótipos distintos podem ter expressões clínicas diferentes, outros estudos com populações maiores poderão esclarecer o real papel dos polimorfismos genéticos nos vários graus de gravidade da asma.

## Referências

1. Sandford A, Weir T, Paré P. [The genetics of asthma](#). *Am Resp Crit Care Med*. 1996;153:1749-65.
2. Sarafino EP, Goldfeder J. [Genetic factors in the presence, severity, and triggers of asthma](#). *Arch Dis Child*. 1995;73:112-6.

3. Grainger DJ, Heathcote K, Chiano M, Snieder H, Kemp PR, Metcalfe JC, et al. [Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type  \$\beta\$ 1](#). *Hum Mol Genet*. 1999; 8:93-7.
4. Watanabe Y, Kinoshita A, Yamada T, Ohta T, Kishino T, Matsumoto N, et al. [A catalog of 106 single-nucleotide polymorphisms \(SNPs\) and 11 other types of variations in genes for transforming growth factor- \$\beta\$ 1 \(TGF- \$\beta\$ 1\) and its signaling pathway](#). *J Hum Genet*. 2002;47:478-83.
5. Pulleyn LJ, Newton R, Adcock IM, Barnes PJ. [TGF- \$\beta\$ 1 allele association with asthma severity](#). *Hum Genet*. 2001;109:623-7.
6. Silverman ES, Palmer LJ, Subramaniam V, Hallock A, Mathew S, Vallone J, et al. [Transforming growth factor- \$\beta\$ 1 promoter polymorphism C-509T is associated with asthma](#). *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;169:214-9.
7. Mak JC, Leung HC, Ho SP, Law BK, Ho AS, Lam WK, et al. [Analysis of TGF-beta \(1\) gene polymorphisms in Hong Kong Chinese patients with asthma](#). *J Allergy Clin Immunol*. 2006; 117:92-6.
8. Li H, Romieu I, Wu H, Sienra-Monge JJ, Ramírez-Aguilar M, del Rio-Navarro BE. [Genetic polymorphisms in transforming growth factor beta-1 \(TGFB1\) and childhood asthma and atopy](#). *Hum Genet*. 2007;121:529-38.
9. Buckova D, Izakovicová HL, Benes P, Znojil V, Vácha J. [TGF-beta1 gene polymorphisms](#). *Allergy*. 2001;56:1236-7.
10. Heinzmann A, Bauer E, Ganter K, Kurz T, Deichmann KA. [Polymorphisms of the TGF-beta1 gene are not associated with bronchial asthma in Caucasian children](#). *Pediatr Allergy Immunol*. 2005;16:310-4.
11. Minshall EM, Leung DY, Martin RJ, Song YL, Cameron L, Ernst P, et al. [Eosinophil-associated TGF-beta1 mRNA expression and airways fibrosis in bronchial asthma](#). *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1997;17:326-33.
12. Redington AE, Madden J, Frew AJ, Djukanovic R, Roche WR, Holgate ST, et al. [Transforming growth factor-beta1 in asthma. Measurement in bronchoalveolar lavage fluid](#). *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;156:642-7.
13. Blobe GC, Schiemann WP, Lodish HF. [Role of transforming growth factor beta in human disease](#). *N Engl J Med*. 2000; 342:1350-8.
14. Baldini M, Lohman IC, Halonen M, Erickson RP, Holt PG, Martinez FD. [A polymorphism\\* in the 5' flanking region of the CD14 gene is associated with circulating soluble CD14 levels and with total serum immunoglobulin E](#). *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1999;20:976-83.
15. Koppelman GH, Reijmerink NE, Colin Stine O, Howard TD, Whittaker PA, Meyers DA, et al. [Association of a promoter polymorphism of the CD14 gene and atopy](#). *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;163:965-9.
16. Ulevitch RJ, Tobias PS. [Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin](#). *Annu Rev Immunol*. 1995; 13:437-57.
17. Macatonia SE, Hosken NA, Litton M, Vieira P, Hsieh CS, Culpepper JA, et al. [Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+T cells](#). *J Immunol*. 1995;154:5071-9.
18. Alexis N, Eldridge M, Reed W, Bromberg P, Peden DB. [CD14-dependent airway neutrophil response to inhaled LPS: role of atopy](#). *J Allergy Clin Immunol*. 2001;107:31-5.
19. Marsh DG, Neely JD, Breazeale DR, Ghosh B, Freidhoff LR, Ehrlich-Kautzky E, et al. [Linkage analysis of IL4 and other chromosome 5q31.1 markers and total serum immunoglobulin E concentrations](#). *Science*. 1994;264:1152-6.
20. Rosenwasser LJ, Klemm DJ, Dresback JK, Inamura H, Mascali JJ, Klinnert M, et al. [Promoter polymorphisms in the chromosome 5 gene cluster in asthma and atopy](#). *Clin Exp Allergy*. 1995;25 Suppl 2:74-8.
21. Burchard EG, Silverman EK, Rosenwasser LJ, Borish L, Yandava C, Pillari A, et al. [Association between a sequence variant in the IL4 gene promoter and FEV \(1\) in asthma](#). *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160:912-22.
22. Daniels SE, Bhattacharya S, James A, Leaves NI, Young A, Hill MR, et al. [A genome-wide search for quantitative trait loci underlying asthma](#). *Nature*. 1996;383:247-50.
23. Mitsuyasu H, Izuhara K, Mao XQ, Gao PS, Arinobu Y, Enomoto T, et al. [Ile50Val variant of IL4R alpha upregulates IgE synthesis and associates with atopic asthma](#). *Nat Genet*. 1998; 19: 119-20.
24. Kruse S, Japha T, Tedner M, Sparholt SH, Forster J, Kuehr J, et al. [The polymorphisms S503P and Q576R in the interleukin-4 receptor alpha gene are associated with atopy and influence the signal transduction](#). *Immunology*.1999;96:365-71.
25. Noguchi E, Shibasaki M, Arinami T, Takeda K, Yokouchi Y, Kobayashi K, et al. [No association between atopy/asthma and the Ile50Val polymorphism of IL-4 receptor](#). *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160:342-5.
26. Migliaccio C, Patuzzo C, Malerba G, Trabetti E, Galavotti R, Pescolliderung L, et al. [No linkage or association of five polymorphisms in the interleukin-4 receptor alpha gene with atopic asthma in Italian families](#). *Eur J Immunogenet*. 2003; 30:349-53.
27. Van Eerdewegh P, Little RD, Dupuis J, Del Mastro RG, Falls K, Simon J, et al. [Association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness](#). *Nature*. 2002;418:426-30.
28. Jongepier H, Boezen HM, Dijkstra A, Howard TD, Vonk JM, Koppelman GH, et al. [Polymorphisms of the ADAM33 gene are associated with accelerated lung function decline in asthma](#). *Clin Exp Allergy*. 2004;34:757-60.
29. Raby BA, Silverman EK, Kwiatkowski DJ, Lange C, Lazarus R, Weiss ST. [ADAM33 polymorphisms and phenotype associations in childhood asthma](#). *J Allergy Clin Immunol*. 2004;113:1071-8.
30. Werner M, Herbon N, Gohlke H, Altmüller J, Knapp M, Heinrich J, et al. [Asthma is associated with single-nucleotide polymorphisms in ADAM33](#). *Clin Exp Allergy*. 2004;34:26-31.
31. Postma DS, Howard T. [ADAM33 gene: confirming a gene without linkage](#). *Clin Exp Allergy*. 2004;34:1-3.
32. GINA Workshop Report. Global strategy for asthma Management and Prevention. [updated 2002 April; cited 2003 Oct 18]. Scientific information and recommendations for asthma programs. NIH Publication Nº 02-3659. <http://www.ginasthma.com>.
33. Woodhead JL, Fallon R, Figuered H, Longdale J, Malcon ADB. Alternative methodology of gene diagnosis. In: Davies KE, editor. *Human Genetic diseases - a practical approach*. Oxford: IRL Press; 1986. p. 51-64.
34. Perrey C, Turner SJ, Pravica V, Howell WM, Hutchinson IV. [ARMS-PCR methodologies to determine IL-10, TNF-alpha, TNF-beta, and TGF-beta 1 gene polymorphisms](#). *Transp Immunol*. 1999;7:127-8.
35. Kedda MA, Lose F, Duffy D, Bell E, Thompson PJ, Upham J. [The CD14 C-159T polymorphism is not associated with asthma or asthma severity in an Australian adult population](#). *Thorax*. 2005; 60:211-4.

36. Hoebee B, Rietveld E, Bont L, Oosten M, Hodemaekers HM, Nagelkerke NJ, et al. [Association of severe respiratory syncytial virus bronchiolitis with interleukin-4 and interleukin-4 receptor alpha polymorphisms](#). *J Infect Dis*. 2003;187:2-11.
37. van Diemen CC, Postma DS, Vonk JM, Bruinenberg M, Schouten JP, Boezen HM. [A disintegrin and metalloprotease 33 polymorphisms and lung function decline in the general population](#). *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;172:329-33.
38. Holloway JW, Beghe B, Holgate ST. [The genetic basis of atopic asthma](#). *Clin Exp Allergy*. 1999;29:1023-32.
39. Heinzmann A, Mao XQ, Akaiwa M, Kreomer RT, Gao PS, Ohshima K, et al. [Genetic variants of IL-13 signalling and human asthma and atopy](#). *Hum Mol Genet*. 2000;9:549-59.
40. Yamada Y, Miyauchi A, Goto J, Takagi Y, Okuizumi H, Kanematsu M, et al. [Association of a polymorphism of the transforming growth factor-beta1 gene with genetic susceptibility to osteoporosis in postmenopausal Japanese women](#). *J Bone Miner Res*. 1998;13:1569-76.
41. Perrey C, Pravica V, Sinnott PJ, Hutchinson IV. [Genotyping for polymorphisms in interferon-gamma, interleukin10, transforming growth factor-beta1 and tumor necrosis factor-alpha genes: a technical report](#). *Transpl Immunol*. 1998; 6:193-7.
42. O'Donnell AR, Toelle BG, Marks GB, Hayden CM, Laing IA, Peat JK, et al. [Age-specific relationship between CD14 and atopy in a cohort assessed from age 8 to 25 years](#). *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;169:615-22.
43. Burrows B, Martinez FD, Halonen M, Barbee RA, Cline MG. [Association of asthma with serum IgE levels and skin-test reactivity to allergens](#). *N Engl J Med*. 1989;320:271-7.
44. Walley AJ, Cookson WO. [Investigation of an interleukin-4 promoter polymorphism for associations with asthma and atopy](#). *J Med Genet*. 1996;33:689-92.
45. Rigoli L, Di Bella C, Procopio V, Barberio G, Barberi I, Caminiti L, et al. [Molecular analysis of sequence variants in the Fcepsilon receptor I beta gene and IL-4 gene promoter in Italian atopic families](#). *Allergy*. 2004;59:213-8.
46. Kamali-Sarvestani E, Ghayomi MA, Nekoe A. [Association of TNF-alpha -308 G/A and IL-4 -589 C/T gene promoter polymorphisms with asthma susceptibility in the south of Iran](#). *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2007;17:361-6.
47. Zhang H, Zhang Q, Wang L, Chen H, Li Y, Cui T, et al. [Association of IL4R gene polymorphisms with asthma in Chinese populations](#). *Hum Mutat*. 2007;28:1046.
48. Liu X, Beatty TH, Deindl P, Huang SK, Lau S, Sommerfeld C, et al. [Associations between specific serum IgE response and 6 variants within the genes IL4, IL13, and IL4RA in German children: the German Multicenter Atopy Study](#). *J Allergy Clin Immunol*. 2004;113:489-95.
49. Zhang W, Zhang X, Qiu D, Sandford A, Tan WC. [IL-4 receptor genetic polymorphisms and asthma in Asian populations](#). *Respir Med*. 2007;101:186-90.
50. Howard TD, Koppelman GH, Xu J, Zheng SL, Postma DS, Meyers DA, et al. [Gene-gene interaction in asthma: IL4RA and IL13 in a Dutch population with asthma](#). *Am J Hum Genet*. 2002;70: 230-6.
51. Hirota T, Hasegawa K, Obara K, Matsuda A, Akahoshi M, Nakashima K. [Association between ADAM33 polymorphisms and adult asthma in the Japanese population](#). *Clin Exp Allergy*. 2006; 36:884-91.
52. Howard TD, Postma DS, Jongepier H, Moore WC, Koppelman GH, Zheng SL, et al. [Association of a disintegrin and metalloprotease 33 \(ADAM33\) gene with asthma in ethnically diverse populations](#). *J Allergy Clin Immunol*. 2003;112:717-22.
53. Simpson A, Maniatis N, Jury F, Cakebread JA, Lowe LA, Holgate ST, et al. [Polymorphisms in a disintegrin and metalloprotease 33 \(ADAM33\) predict impaired early-life lung function](#). *Am J Resp Crit Care Med*. 2005;172:55-60.

## Correspondência:

Carmen Silvia Bertuzzo  
 Departamento de Genética Médica  
 Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP  
 Caixa Postal 6111, Bairro Cidade Universitária Zeferino Vaz  
 CEP 13083-970 – Campinas, SP  
 Tel.: (19) 3521.8907, (19) 3521.8904  
 Fax: (19) 3521.8909  
 E-mail: fariaicj@fcm.unicamp.br, bertuzzo@fcm.unicamp.br,  
 dirceu@fcm.unicamp.br