



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



**EPIDEMIOLOGIA GENÉTICA DOS SINTOMAS DE ASMA E DA ATOPIA EM  
CRIANÇAS DE UM CENTRO URBANO DA AMÉRICA LATINA.**

**GUSTAVO NUNES DE OLIVEIRA COSTA**

**TESE DE DOUTORADO**

**Salvador – Bahia**

**2014**

Ficha Catalográfica  
Elaboração Programa de Pós-Graduação em Saúde Coletiva

---

C837e Costa, Gustavo Nunes de Oliveira.

Epidemiologia genética dos sintomas de asma e da atopia em crianças de um centro urbano da América Latina / Gustavo Nunes de Oliveira Costa. -- Salvador: G.N.O.Costa, 2014.

98f.

Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Mauricio Lima Barreto.

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosemeire L. Fiaccone.

Tese (doutorado) – Instituto de Saúde Coletiva. Universidade Federal da Bahia.

1. Asma. 2. Atopia. 3. Doenças Complexas. 4. Epidemiologia Genética.  
I. Título.

CDU 616

---

**GUSTAVO NUNES DE OLIVEIRA COSTA**

**EPIDEMIOLOGIA GENÉTICA DOS SINTOMAS DE ASMA E DA ATOPIA EM  
CRIANÇAS DE UM CENTRO URBANO DA AMERICA LATINA**

Tese submetida ao programa de pós-graduação em Saúde Coletiva, da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Saúde Coletiva, área de concentração Epidemiologia.

**Orientador:** Prof. Dr. Mauricio L. Barreto

**Co-orientadora:** prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rosemeire L. Fiaccone

**Salvador – Bahia**

**2014**

**GUSTAVO NUNES DE OLIVEIRA COSTA**

**EPIDEMIOLOGIA GENÉTICA DOS SINTOMAS DE ASMA E ATOPIA:  
POPULAÇÃO DO SCAALA, SALVADOR – BRASIL.**

Tese submetida ao programa de pós-graduação em Saúde Coletiva, da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Saúde Coletiva, área de concentração Epidemiologia.

**Data da defesa:** 30/04/2014

**Prof. Dr. Mauricio L. Barreto (Orientador)**

Instituto de Saúde Coletiva  
Universidade Federal da Bahia

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rosemeire L. Fiaccone (Co-orientadora)**

Instituto de Matemática  
Universidade Federal da Bahia.

**Prof. Álvaro A. Cruz**

Faculdade de Medicina  
Universidade Federal da Bahia.

**Prof. Guilherme de S. Ribeiro**

Instituto de Saúde Coletiva  
Universidade Federal da Bahia

**Dr. Alexandre da Costa Pereira**

Médico assistente do Instituto do Coração (Incor) HC-FMUSP  
Universidade de São Paulo

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pelas oportunidades que me tem dado. Agradeço aos meus amados pais, Reginaldo Costa e Maria Isabel, pelo apoio incondicional às minhas decisões; à minha irmã Danielli Costa, por compartilhar tanto os momentos bons quanto os momentos mais críticos da minha vida; à minha noiva Aline Palmeira pela compreensão e apoio nos momentos em que estive distante e a todos os familiares que de uma forma ou de outra foram responsáveis pelo que sou hoje.

Agradeço aos colegas de mestrado e doutorado do ISC, em especial a Yeimi Alzate, Yukari Misse, Priscila Ribas, Azenildo Santos, Davide Rassela, Joilda Nery, Daiane Machado, Deborah Carneiro, Luciana Cardin, Yaná Magalhães, Maria Yuri, Nedja dos Santos, Carol Feitosa e Thiago Magalhães pelos momentos de descontração, pelas cervejas no meio de semana, compartilhamento de ideias e frustrações.

Agradeço ao Agostino Strina pelo compartilhamento de sua sabedoria. À equipe do EPIGEN, pela intensa troca de conhecimento e que sem uma verdadeira colaboração, esta tese tornar-se-ia inviável. Aos novos amigos Democrito Filho, Josenir Astarci, Noêmia Siqueira e Julia Mortimer pelo acolhimento, solidariedade e companheirismo em Londres.

Também agradeço ao corpo docente do ISC pelas aulas, contribuição na organização do pensamento científico e pela intensa vivência interdisciplinar nos diversos campos da Saúde Coletiva. Aos professores Laura Rodrigues e Frank Dudbridge pelos ensinamentos, Aos funcionários do ISC, em especial a Lane Maria e Luciana Paranhos e, por fim, aos professores Maurício Barreto e Rosemeire Fiaccone por terem me ensinado, orientado e confiado para iniciar este trabalho em Epidemiologia Genética.

A todos, um muito obrigado!

## RESUMO

As doenças complexas são aquelas cujas manifestações, dependem da exposição a múltiplos fatores ambientais e sociais e a fatores genéticos. Os estudos epidemiológicos clássicos são incapazes de abranger todos estes fatores que determinam uma doença complexa. Houve a necessidade de novas abordagens metodológicas que preenchesse esta lacuna. Neste contexto, a epidemiologia genética surgiu como uma área com grandes perspectivas de avanços no que corresponde a melhor compreensão destas doenças. É um campo que busca ampliar o conhecimento tradicional da epidemiologia nos determinantes de doenças e, em especial, nos efeitos conjuntos de determinantes genéticos, ambientais e sociais. Este campo se ampliou com o desenvolvimento da genômica e de suas técnicas de varredura do material genético dos indivíduos.

Grandes esforços da comunidade científica internacional têm sido feitos para determinar a arquitetura genética de diversas doenças complexas. A mãe da criança, entre as quais incluem-se a asma e as alergias. A causalidade genética vem ganhando cada vez mais importância no entendimento da asma e alergias e apesar da descoberta de diversos genes associados a estes desfechos a reprodutibilidade nos estudos de gene candidato é baixa. No Brasil, o projeto SCAALA (*Social Changes, Asthma and Allergy in Latin America Programme*) vem contribuindo com informações importantes para a compreensão dos fatores ambientais e sociais relacionados a prevalência de asma e alergias em uma população miscigenada. Isto criou oportunidade para desenvolvermos um estudo sobre fatores genéticos que possa contribuir para o entendimento da alta ocorrência de asma e alergias nesta população.

A tese foi desenvolvida sob a forma de três artigos, o primeiro teve como objetivos estudar os efeitos de fatores de risco genéticos no desenvolvimento dos sintomas de asma, através de uma análise exploratória, por varredura genômica, além disso, visava estimar a herdabilidade e identificar possíveis rotas metabólicas associadas a sintomas de asma. O segundo artigo teve como objetivo estudar os efeitos de fatores de risco genéticos no surgimento da atopia através da análise de um painel com alta densidade de polimorfismos genéticos numa população susceptível a níveis elevados de IgE específica, estimar pequenos efeitos genéticos e inferir rotas metabólicas associadas a atopia. O terceiro artigo teve como objetivo confirmar o papel das variantes genéticas da região 17q21 nos sintomas de asma na infância em uma população urbana de crianças latino-americanas, e explorar as interações com atopia e outras exposições selecionadas pela sua relevância.

## LISTA DE FIGURAS

### Artigo 1

Figura 1: Manhattan plot para sintomas de asma em crianças, ajustado pela estratificação populacional. Em vermelho destaca-se as regiões dos genes mais associados. ....	25
Figura 2: QQ-plot para sintomas de asma em crianças, ajustado pela estratificação populacional. ....	26
Figura 3: Regional plot do cromossomo 14, região mais associada com sintomas de asma em crianças.....	27
Figura 4: Regional plot do cromossomo 15, segunda região mais associada com sintomas de asma em crianças.....	28
Figura 5: Variância fenotípica explicada por cada cromossoma.....	29
Figura S1: Análise de componentes principais na população SCAALA com todos os SNPs, para inferir estrutura populacional. ....	34

### Artigo 2

Figura 1: <i>Manhattan plot</i> para atopia, ajustada pela estratificação populacional. ....	48
Figura 2: <i>QQ-plot</i> para atopia.....	49
Figura 3: <i>Regional plot</i> para as regiões genômicas mais associadas com atopia.....	50

### Artigo 3

Figura S1: Haplótipos* da região 17q21 nas populações SCAALA, Europeia (CEU: Hapmap-release 27) e Yoruba (YRI: Hapmap-release 27).79	
--	--

## LISTA DE TABELAS

### Artigo 1

Tabela 1: Os 20 SNPs mais associados com asma, corrigido pelas três primeiras componentes principais da análise de ancestralidade.....	21
Tabela 2: Análise de variância genômica dos sintomas de asma*.....	22
Tabela 3: Rotas metabólicas associadas com sintomas de asma sugeridas pela análise de enriquecimento. ....	23
Tabela S1: Os 100 SNPs mais associados com sintomas de asma na infância.....	30

### Artigo 2

Tabela 1: Fatores associados a atopia, identificados por regressão logística e corrigidos pela estratificação populacional. ....	46
Tabela 2: Análise de rotas metabólicas para atopia. ....	47

### Artigo 3

Tabela 1: Descrição e frequências das variantes genéticas na região 17q21. ....	67
Tabela 2: Regressão logística entre as variantes genéticas na região 17q21 e sintomas de asma, ajustado por sexo, idade e ancestralidade, na população total.....	68
Tabela 3: Regressão logística no modelo aditivo para sintomas de asma atópica e sintomas de asma não atópica, ajustada por sexo, idade e ancestralidade. ....	69
Tabela 4: Regressão logística para sintomas de asma e genótipos de risco, estratificada por soropositividade para <i>Varicella zoster</i> e histórico de tabagismo dos pais.....	70
Tabela S1: Descrição da população SCAALA. ....	71
Tabela S2: Teste de associação entre as variantes genéticas e sibilância. ....	72
Tabela S3: Teste de associação entre as variantes genéticas e sintomas de asma.....	73
Tabela S4: Teste de associação entre as variantes genéticas e asma pouco controlada .....	74



<b>Tabela S5: Teste de associação entre as variantes genéticas e atopia. ...</b>	<b>75</b>
<b>Tabela S6: Regressão logística para os sintomas da asma atópica do grupo de comparação constituído por crianças atópicas não asmáticas ou todas as crianças não-asmáticas. Ajustado por sexo, idade e ascendência.....</b>	<b>76</b>
<b>Tabela S7: Associação dos pares de haplótipos e sintomas de asma para as variantes rs7224129 e rs4378650.....</b>	<b>77</b>
<b>Tabela S8: Regressão logística para sintomas de asma, soropositividade para VZV e tabagismo dos pais, estratificados por genótipos de risco....</b>	<b>78</b>

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

<b>3q26</b>	Região 26 do braço longo do cromossomo 3
<b>5q34</b>	Região 34 do braço longo do cromossomo 5
<b>8q22</b>	Região 22 do braço longo do cromossomo 8
<b>14q11</b>	Região 11 do braço longo do cromossomo 14
<b>15q22</b>	Região 22 do braço longo do cromossomo 15
<b>17q21</b>	Região 21 do braço longo do cromossomo 17
<b>21q21</b>	Região 21 do braço longo do cromossomo 21
<b>CEP</b>	Comitê de Ética em Pesquisa
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>GCTA</b>	Genome-wide Complex Trait Analysis
<b>GO</b>	<i>Gene Ontology</i>
<b>GWAS</b>	<i>Genome Wide Association Study</i> (Estudo de associação por varredura genômica)
<b>IBD</b>	<i>Identity by descent</i> (Identidade por descendência)
<b>IgE</b>	Imunoglobulina E
<b>IL-13</b>	Interleucina 13
<b>IL-4</b>	Interleucina 4
<b>IL-5</b>	Interleucina 5
<b>ISAAC</b>	<i>The International Study of Asthma and Allergies in Childhood</i>
<b>LD</b>	<i>Linkage Disequilibrium</i> (Desequilíbrio de ligação)
<b>MAF</b>	<i>Minor Allele Frequency</i> (Alelo de menor frequência na população)
<b>MIAs</b>	Marcadores Informativos de ancestralidade
<b>MLM</b>	Modelo Linear Misto
<b>PCA</b>	Análise de Componente Principal
<b>OR</b>	<i>Odds ratio</i> ( <i>Razão de chances</i> )
<b>ORG</b>	Razão de chances generalizada
<b>QQ</b>	Quantil-quantil
<b>SCAALA</b>	<i>Social Changes, Asthma and Allergy in Latin America</i>
<b>sIgE</b>	Imunoglobulina E específica
<b>SNPs</b>	Polimorfismos de única base
<b>SPT</b>	<i>Skin prick test</i> (Teste cutâneo)
<b>TH1</b>	Linfócito T auxiliar 1
<b>TH2</b>	Linfócito T auxiliar 2
<b>VZV</b>	Virus da <i>Varicela Zoster</i>

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO:</b> .....	<b>3</b>
<b>ARTIGO 1</b> .....	<b>6</b>
<b>ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO POR VARREDURA GENÔMICA APONTAM DOIS NOVOS LOCI, 14q11 E 15q22, ASSOCIADOS COM SINTOMAS DE ASMA EM CRIANÇAS NA AMERICA LATINA.</b> .....	<b>6</b>
RESUMO: .....	7
INTRODUÇÃO .....	7
METODOLOGIA.....	9
RESULTADOS: .....	12
DISCUSSÃO: .....	13
REFERÊNCIAS.....	16
<b>Material suplementar do artigo 1</b> .....	<b>30</b>
<b>Artigo 2</b> .....	<b>35</b>
<b>ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO POR VARREDURA GENÔMICA SUGERE UMA ASSOCIAÇÃO DA REGIÃO 21q21 COM ATOPIA NUMA POPULACAO DE CRIANÇAS NA AMERICA LATINA</b> .....	<b>35</b>
RESUMO: .....	36
Palavras chave: GWAS, IgE, atopia, herdabilidade.....	36
INTRODUÇÃO: .....	37
METODOLOGIA:.....	38
RESULTADOS: .....	40
DISCUSSÃO: .....	41
REFERÊNCIAS.....	43
<b>Artigo 3</b> .....	<b>51</b>
<b>EFEITO DE VARIAÇÕES GENÉTICAS NO CROMOSSOMO 17q21 EM SINTOMAS DE ASMA EM CRIANÇAS: INTERAÇÃO COM A SOROPOSITIVIDADE PARA O VÍRUS DA VARICELA ZOSTER E A EXPOSIÇÃO AO TABAGISMO DOS PAIS.</b> .....	<b>51</b>
RESUMO .....	52
INTRODUÇÃO: .....	53
MATERIAL E MÉTODOS .....	54
RESULTADOS .....	57

DISCUSSÃO .....	59
REFERÊNCIAS:.....	62
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS DA TESE .....</b>	<b>80</b>
<b>REFERÊNCIAS DAS CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>81</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>82</b>
Anexo 1 – Formulário de aprovação no CEP –UFBA/ ISC.....	83
Anexo 2 – Termo de consentimento livre e esclarecido - SCAALA .....	84
Anexo 3 – questionário sobre problemas respiratórios.....	87

## INTRODUÇÃO

A epidemiologia tem um longo histórico de uso de marcadores biológicos mesmo antes da era “ômica”, tais como os títulos de anticorpos, na epidemiologia das doenças infecciosas, ou a dosagem de lipídios no sangue, na epidemiologia de doenças cardiovasculares. A integração de marcadores biológicos de exposição em pesquisa epidemiológica tem sido referida como "epidemiologia molecular". O termo epidemiologia genética é muitas vezes utilizado para designar o estudo dos fatores genéticos na ocorrência de doenças em populações, centrado, principalmente, nos métodos estatísticos para a descoberta de genes em estudos familiares<sup>1</sup>.

Investigações do efeito etiológico de variantes genéticas evoluem paralelamente aos avanços da tecnologia e do conhecimento biológico. Hoje, existe um crescente interesse pela compreensão das doenças complexas, que se caracterizam por uma multiplicidade de interações entre determinantes genéticos e ambientais<sup>2</sup>. Dentro deste contexto, destaca-se a asma e as alergias, as quais possuem grande impacto na qualidade de vida das populações e nos serviços de assistência à saúde<sup>3</sup>.

A asma, doença inflamatória crônica das vias aéreas, é uma doença complexa, com distintos fenótipos, a qual tem um enorme impacto sobre a mortalidade, morbidade e qualidade de vida da população humana<sup>4</sup>. Enquanto que a atopia é uma tendência pessoal ou familiar, para se tornar sensibilizado e produzir IgE em resposta a exposições a alérgenos de diversas naturezas<sup>5</sup>. Os levantamentos do ISAAC (*The International Study of Asthma and Allergies in Childhood*), realizados em meados de 1990 em numerosos países forneceram evidências de que a prevalência de asma em cidades da América Latina encontrava-se em níveis observados em muitos países desenvolvidos<sup>6</sup>. De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), duzentos e trinta e cinco milhões de pessoas sofrem desta doença, sua morbidade e mortalidade são elevadas e sua prevalência vem aumentando principalmente em crianças<sup>7</sup>.

A asma apresenta diferentes mecanismos biológicos, dentre eles, a produção de Imunoglobulina E específicas. Também apresenta riscos ambientais e psicossociais que se expressam ao longo da vida e interage com

uma base genética, que parece agir tanto ao nível do epitélio brônquico, como através de mecanismos imunológicos e inflamatórios. A epidemia de asma que vem ocorrendo nas últimas décadas, enquanto não tenha sido explicada, tem sido atribuída essencialmente a mudanças sociais e ambientais ocorridas em recentes décadas e de maneira generalizada em diferentes partes do globo<sup>8; 9</sup>. A elevação da prevalência de asma tem sido atribuída a um “padrão de vida ocidental”, e para alguns explicado pela chamada “hipótese da higiene”, que atribui um efeito de proteção no início da vida a exposições microbianas<sup>10</sup>. Ambientes mais limpos, com menos infecções (virais, bacterianas ou parasitárias) na população e determinados padrões de estímulos ao sistema imunológico ainda imaturo, levam a uma resposta inflamatória anormal a alérgenos ambientais mediada por linfócitos TH2. Estes estímulos proporciona uma maior produção de IgE e conseqüentemente, doenças alérgicas incluindo a asma<sup>11</sup>.

As mudanças ambientais, para se expressarem, precisam atuar sobre indivíduos ou populações com clara suscetibilidade genética, e com isto a contribuição da genética na causalidade da asma está ganhando importância cada vez maior. De acordo com alguns trabalhos de revisão<sup>12; 13; 14</sup> cerca de 200 genes têm sido relatados por estar associados com asma ou traços relacionados. Muitas destas associações não foram replicadas, devido a falsas identificações, um baixo poder de replicação ou por causa de interações gene-ambiente<sup>15</sup>. Recentes estudos genéticos, com as técnicas de varredura genômica e de base populacional, confirmaram a importância de genes relacionados a modulação dos níveis plasmáticos de IgE, **FCεRI** e **STAT6**<sup>16</sup> e apresentaram novos genes de importância no estudo da asma, **ORMDL3**<sup>17</sup>. Estes achados vêm sendo reproduzidos por diferentes grupos de pesquisa, confirmando-os como de importância epidemiológica.

Em países desenvolvidos perto de metade dos casos de asma na população são de não atópicos, porém em países subdesenvolvidos esta proporção é bem maior chegando a mais de 80%. Entre crianças da cidade de Salvador – Bahia, Brasil, os achados foram confirmados, mostrando que dentre as crianças com asma a fração atribuível a alergia foi de apenas 24,5%<sup>18</sup>. No máximo 50% dos casos de asma são atribuíveis a inflamação das vias aéreas

mediada por eosinófilos, ou seja, a via atópica. Nos casos restantes a inflamação destas vias, pode ser devido a presença de neutrófilos e desencadeada por exposição ambiental a endotoxina bacteriana, poluição do ar, ozônio e infecções virais dentre outros<sup>19</sup>.

O estudo dos determinantes genéticos em fenótipo definidos com precisão, baseados em consenso internacional, representa uma das prioridades de investigação para compreender as causas da asma e atopia, além de compreender como elas interagem.

O objetivo geral desta tese foi avaliar os fatores de risco genéticos envolvidos no desenvolvimento de asma e atopia em uma população de crianças da cidade de Salvador.

A tese foi desenvolvida na forma de três artigos, onde no primeiro realizamos uma abordagem de varredura genômica para explorar possíveis regiões cromossômicas associadas com sintomas de asma. No segundo, realizamos outra análise de varredura genômica na busca de regiões cromossômicas associadas com atopia. No terceiro artigo realizamos um estudo de gene candidato, analisando o risco dos genes da região cromossômica 17q21 provocarem asma e suas interações com fatores de risco ambiental.

## REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO:

- 1 ROTHMAN, K. J.; GREENLAND, S.; LASH, T. L. **Modern epidemiology**. Lippincott Williams & Wilkins, 2008. ISBN 0781755646.
- 2 SMITH, G. D.; BURTON, P. R.; PALMER, L. J. **An introduction to genetic epidemiology**. Bristol: The Policy Press, 2011.
- 3 DAMASCENO, E. *et al.* Custos diretos e indiretos da asma: revisão de literatura. **Rev. bras. alerg. imunopatol.–Vol**, v. 35, n. 6, p. 235, 2012.
- 4 HOLGATE, S. T. Asthma: a simple concept but in reality a complex disease. **Eur J Clin Invest**, v. 41, n. 12, p. 1339-52, Dec 2011.
- 5 JOHANSSON, S. G. O. *et al.* Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy

- Organization, October 2003. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 113, n. 5, p. 832-836, May 2004.
- 6 ASHER, M. I. *et al.* Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. **Lancet**, v. 368, n. 9537, p. 733-743, Aug-Sep 2006.
- 7 OMS - Organização Mundial de Saúde, N. **Global surveillance, prevention and control of chronic respiratory diseases: a comprehensive approach.** World Health Organization, 2007.
- 8 BARRETO, M. L. *et al.* Poverty, dirt, infections and non-atopic wheezing in children from a Brazilian urban center. **Respir Res**, v. 11, p. 167, 2010.
- 9 COOPER, P. J. *et al.* Risk factors for asthma and allergy associated with urban migration: background and methodology of a cross-sectional study in Afro-Ecuadorian school children in Northeastern Ecuador (Esmeraldas-SCAALA Study). **BMC Pulm Med**, v. 6, p. 24, 2006.
- 10 YAZDANBAKHSH, M.; KREMSNER, P. G.; VAN REE, R. Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. **Science**, v. 296, n. 5567, p. 490-4, Apr 19 2002.
- 11 OKADA, H. *et al.* The 'hygiene hypothesis' for autoimmune and allergic diseases: an update. **Clin Exp Immunol**, v. 160, n. 1, p. 1-9, Apr 2010.
- 12 PINTO, L. A.; STEIN, R. T.; KABESCH, M. Impact of genetics in childhood asthma. **J Pediatr (Rio J)**, v. 84, n. 4 Suppl, p. S68-75, Aug 2008.
- 13 OBER, C.; HOFFJAN, S. Asthma genetics 2006: the long and winding road to gene discovery. **Genes and Immunity**, v. 7, n. 2, p. 95-100, Mar 2006.
- 14 HALAPI, E.; BJORNSDOTTIR, U. S. Overview on the current status of asthma genetics. **Clin Respir J**, v. 3, n. 1, p. 2-7, Jan 2009.
- 15 CORDELL, H. J.; CLAYTON, D. G. Genetic association studies. **Lancet**, v. 366, n. 9491, p. 1121-31, Sep 24-30 2005.
- 16 WEIDINGER, S. *et al.* Genome-wide scan on total serum IgE levels identifies FCER1A as novel susceptibility locus. **PLoS Genet**, v. 4, n. 8, p. e1000166, Aug 2008.



- 17 MOFFATT, M. F. *et al.* Genetic variants regulating ORMDL3 expression contribute to the risk of childhood asthma. **Nature**, v. 448, n. 7152, p. 470-3, Jul 26 2007.
- 18 SOUZA DA CUNHA, S. *et al.* Asthma cases in childhood attributed to atopy in tropical area in Brazil. **Rev Panam Salud Publica**, v. 28, n. 6, p. 405-11, Dec 2010.
- 19 KIM, B. J. *et al.* Association of ozone exposure with asthma, allergic rhinitis, and allergic sensitization. **Ann Allergy Asthma Immunol**, v. 107, n. 3, p. 214-9 e1, Sep 2011.

## **ARTIGO 1**

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO POR VARREDURA GENÔMICA APONTAM DOIS NOVOS LOCI, 14q11 E 15q22, ASSOCIADOS COM SINTOMAS DE ASMA EM CRIANÇAS NA AMERICA LATINA.**

## RESUMO:

**Introdução:** asma é uma doença crônica das vias aéreas cujos mecanismos genéticos ainda são pouco conhecidos apesar de bastante explorados. Nos últimos anos foram realizados dezenas de estudos de associação por varredura genômica, porém nenhum com populações sul-americanas e com elevado grau de miscigenação como na população brasileira. **Métodos:** 1248 crianças foram recrutadas de uma coorte em Salvador, Brasil. Sintomas de asma foram identificados de acordo com o questionário ISAAC (*International Study of Asthma and Allergies in Childhood*). Após controle de qualidade 1.877.526 SNPs autossômicos foram testados para associação com sintomas de asma na infância através de uma regressão logística num modelo genético aditivo. Complementamos a análise com a estimação da variância fenotípica explicadas por variantes genéticas comuns. **Resultados:** Duas regiões cromossômicas foram associadas com sintomas de asma na infância, a região 14q11 (rs1999071, OR: 1.78; 95%CI: 1.45-2.18; valor de  $p$ :  $2.83 \times 10^{-8}$ ), flanqueando os genes *DAD1* e *OXA1L* e região 15q22, variante rs10519031 (OR: 3.0; 95%CI: 2.02-4.49; valor de  $p$ :  $6.68 \times 10^{-8}$ ) e rs8029377 (OR: 2.49; 95%CI: 1.76-3.53; valor de  $p$ :  $2.45 \times 10^{-7}$ ), ambos flanqueando o gene *FOXB1*. Entretanto as 20 variantes mais associadas com sintomas de asma explicam menos de 14% da variância fenotípica total, que foi de 70%. **Conclusão:** As regiões 14q11 e 15q22 estão associadas com sintomas de asma na infância, porém o seu efeito é pequeno devido à natureza poligênica deste fenótipo.

**Palavras chave:** sintomas de asma, varredura genômica, natureza poligênica.

## INTRODUÇÃO

A asma é classificada como uma doença complexa, crônica e inflamatória do trato respiratório, com fenótipos distintos e com grande impacto na mortalidade, morbidade e qualidade de vida. Para refletir toda a sua complexidade, no entanto, é preciso levar em conta a área geográfica em que ela ocorre. Na América Latina, sua ocorrência vem aumentando e alguns autores atribuem parte deste aumento às desigualdades sociais e urbanas presentes nestes países<sup>1</sup>.

Revisões recentes sugerem que grande parte da asma na infância pode ser atribuída à herança genética<sup>2</sup>. Na tentativa de compreender os mecanismos genéticos da asma, foram realizados muitos estudos de gene candidatos nos últimos anos, com diversos resultados falso positivos. Além disso, muitos genes candidatos foram selecionados com base no entendimento imunológico da asma, que ainda é limitado<sup>3</sup>. Outra observação importante é que os estudos de associação entre genética e asma, foram desenvolvidos predominantemente em populações de origem norte americana e europeias<sup>4</sup>, cujo perfil é muito diferente do da asma estabelecido em populações latino-americanas.

Com o desenvolvimento das técnicas de análise genômica, tornou-se possível a utilização dos estudos de associação por escaneamento genômico (*Genome Wide Association - GWAS*) como alternativa às análises de associação por gene candidato. GWAS é uma forma de estudo de associação genética em que centenas de milhares de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) são avaliados por relações com um fenótipo específico, sem a existência de hipótese causal prévia<sup>5</sup>.

O primeiro grande estudo de asma através de varredura do genoma (GWAs) identificou vários marcadores na região 17q21, com variantes comuns, que parecem contribuir para uma proporção substancial dos casos de asma na população de crianças investigadas<sup>6</sup>. Estudos posteriores revelaram que esta região é importante apenas na asma em crianças e destacaram a importância de outros genes, por exemplo, o *IL1RL1/IL18R1* em adultos<sup>7</sup> e o *PDE11A* em crianças<sup>8</sup>, dentre outros. Por sua vez, GWAs em populações não-brancas têm indicado diferentes SNPs para a asma, como *ADRA1B*, *RPPN*, e *DPP10*<sup>9</sup>.

Este estudo diferencia-se dos demais por contemplar uma população muito miscigenada, não correspondente ao eixo EUA-Europa e busca compreender os sintomas de asma por técnicas de varredura genômica.

O objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos de fatores de risco genéticos na ocorrência de sintomas de asma, através de uma análise exploratória de uma varredura genômica em uma população de crianças da cidade de Salvador. Em seguida, estimar a herdabilidade e investigar possíveis rotas metabólicas associadas aos sintomas de asma.

## **METODOLOGIA**

### ***Desenho do estudo e as características da população:***

Os dados analisados aqui sobre sintomas de asma e genética foram coletados em um único momento, como parte do projeto *SCAALA (Social Changes, Asthma and Allergy in Latin America)*. O desenho da coorte original e a coleta de dados para a asma foram bem descritos em outra publicação<sup>10</sup>. Nesta análise, a população consiste de 1.327 crianças residentes na cidade de Salvador – Bahia. Uma cidade com mais de 2,6 milhões de habitantes, com 80% da população autodeclarada preta ou parda<sup>11</sup>. O projeto foi aprovado pelos comitês de ética da Universidade Federal da Bahia; registro CEP: 003-05/CEP-ISC e Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP, resolução número 15.895/2011).

### ***Coleta de dados:***

Foi utilizado um questionário baseado na segunda fase do estudo ISAAC<sup>12</sup>, com questões sobre os sintomas da asma, traduzido para o Português do Brasil, que foi aplicado por pesquisadores devidamente treinados, durante visitas domiciliares na pesquisa que realizavam do projeto SCAALA. As entrevistas poderiam ser realizadas com a família da criança ou com o cuidador, contanto que o informante soubesse relatar sobre a possível presença de sinais e sintomas compatíveis com asma e alergias, além de seus fatores de risco.

### ***Definição de sintomas de asma:***

As crianças foram classificadas como asmáticas quando os pais ou cuidadores relataram sibilos nos 12 meses anteriores à aplicação do questionário e qualquer uma das seguintes situações: diagnóstico de asma em algum momento de suas vidas, sibilância durante o exercício nos últimos 12 meses, quatro ou mais episódios de sibilância nos últimos 12 meses, ou acordar no meio da noite devido a episódios de sibilância nos últimos 12 meses. Estes critérios são mais específicos do que apenas sibilos nos últimos 12 meses, critério mais utilizado na ISAAC. Todas as outras crianças foram classificadas como não-asmáticas.

### ***Genotipagem e controle de qualidade:***

Os SNPs genotipados para população SCAALA foi realizada com o painel comercial *Illumina HumanOmni2.5-8 Kit BeadChip* ([www.illumina.com](http://www.illumina.com)). Um indivíduo foi excluído da análise por inconsistência entre o sexo registrado e o sexo genético, com base em SNPs do cromossoma X. Sessenta e um indivíduos foram removidos da amostra pelo grau de parentesco determinado pela estimativa da identidade por descendência (IBD). O controle de qualidade foi realizado em etapas: taxa de chamada da genotipagem (*call rate*) inferior a 0,98; desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg com valor de  $p$  inferior a  $10^{-4}$  e valor de  $p$  para o alelo de menor frequência (*Minor Allele Frequency – MAF*) inferior a 1%<sup>13</sup>.

### ***Análise Estatística:***

**Associação por varredura genômica:** A regressão logística foi utilizada para examinar a associação com sintomas de asma, assumindo-se um modelo genético aditivo. Convencionalmente, uma associação é considerada sugestiva quando o valor de  $p$  estiver entre  $10^{-6}$  e  $10^{-8}$  e verdadeiramente associados quando o valor de  $p$  foi inferior a  $10^{-8}$ . A análise de Componente Principal foi realizada e suas três primeiras componentes foram utilizadas como covariáveis para controlar o confundimento, além do cálculo do fator de inflação genômico

( $\lambda$ ), com a função de visualizar e evitar estatísticas de teste inflacionadas nos resultados<sup>14</sup>.

**Imputação de SNPs:** Os genótipos foram imputados com a utilização do pacote estatístico IMPUTE2<sup>15; 16</sup>, o qual foi realizado com painéis da própria população do SCAALA, a partir dos resultados de sequenciamento de genoma completo (dados não mostrados). Após a imputação, o controle de qualidade foi feito e excluíram-se os SNPs que apresentavam MAF inferior a 1%, desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $p < 10^{-4}$ ), ou tiveram uma taxa de genotipagem abaixo de 95%<sup>17</sup>.

**Estimação da Herdabilidade:** A proporção da variância fenotípica explicada por todos os SNPs significativos foi estimada como ( $V_g/V_p$ ) em que  $V_g$  é o componente de variação atribuível à variação genética nos SNPs genotipados e  $V_p$  é a variância total fenotípica observada. Utilizou-se o pacote de software GCTA, que usa dados de variantes do genoma para estimar relações genéticas aditivas (correlações) entre indivíduos essencialmente não relacionados. O método consiste em ajustar o efeito de todos os SNPs como um efeito aleatório por um Modelo Linear Misto - MLM<sup>18</sup>.

**Análise de enriquecimento baseada num conjunto definido de genes:** Primeiramente foi realizada uma análise de agregação baseada no desequilíbrio de ligação, para identificar uma lista de regiões genicas associadas ao desfecho (parâmetros = clump-p1 = 0.005; clump-p2 = 0.05; clump-r2 = 0.5; clump-kb = 250). Em seguida foram definidas regiões a 20kb up/downstream dos sítios de início e final da transcrição para 17.529 genes nos cromossomos autossômicos, de acordo com o banco de dados público de genes catalogados, GRCh37/hg19<sup>20</sup>. A análise de enriquecimento baseada no programa INRICH<sup>19</sup> é constituída de duas etapas. Na primeira etapa é contabilizado o número de vezes que os intervalos genômicos, identificados a priori, englobam um conjunto de genes pré-determinados. Uma segunda etapa é realizada para corrigir a taxa de falso-positivos, através de um procedimento permutacional baseado em um certo número de repetições de forma a obter um valor de p empírico representando a proporção de vezes que este intervalo genômico engloba um determinado gene.

## RESULTADOS:

Inicialmente, tinha-se 1.327 crianças e, após a exclusão de 61 crianças por alto grau de parentesco na população e 14 por baixa qualidade do DNA genotipado, foram analisadas 1248 crianças com idade entre 5 e 12 anos. Destas, 675 eram do sexo masculino e 573 do sexo feminino. Deste total 280 (22%) apresentaram sintomas de asma, foram definidos como casos e 966 (78%), como controles.

**Teste de associação:** Após o ajuste por PCA para ancestralidade (figura S1), o fator de inflação genômica ( $\lambda$ ) foi de 1,04, indicando uma baixa possibilidade de associações falso-positivas resultantes da estratificação populacional. Os SNPs mais fortemente associados encontraram-se no cromossoma 14 (figura 1), variante rs1999071 (OR: 1.78; 95%CI: 1.45-2.18; valor de  $p$ :  $2.83 \times 10^{-8}$ ) na região intergênica próxima do gene *OXA1L* (*oxidase (cytochrome c) assembly 1-like*). A segunda região cromossômica mais associada foi do cromossoma 15, variante rs10519031 (OR: 3.0; 95%CI: 2.02-4.49; valor de  $p$ :  $6.68 \times 10^{-8}$ ) e rs8029377 (OR: 2.49; 95%CI: 1.76-3.53; valor de  $p$ :  $2.45 \times 10^{-7}$ ), ambos na região intergênica. A tabela 1 relaciona os 20 SNPs mais significativos, com informação do cromossomo, gene, posição (bp), o alelo de risco, razão de chances (OR), intervalo de confiança de 95% e valor de  $p$  (*para mais informações, vide tabela S1*). O gráfico quantil-quantil (QQ-plot) comparando valores de  $p$  observados na associação genotípica aditiva com os resultados esperados numa distribuição nula (ausência de associação) revelou alguns desvios de medidas na cauda, o que indica que os SNPs verdadeiramente associados com sintomas de asma podem estar presentes (figura 2). Observou-se que, após imputação nos cromossomos 14 e 15, os SNPs associados e com maior significância estatística na análise de varredura genômica permaneceram e foram identificados como pertencentes a regiões flangeadoras dos genes *DAD1* e *OXA1L* no cromossomo 14 e *FOXB1* no cromossomo 15 (figura 3).

### **A proporção da variância fenotípica explicada pelo genoma:**

Na tabela 2 observa-se que 70,7% da variação fenotípica total (sintomas de asma) foi explicada pela estimativa da variância genética (valor  $p$ : 0,001). Com a retirada dos 20 SNPs mais associados, esta variância caiu para 69% e na análise com apenas os 20 SNP mais associados, a variância caiu para 12%. Na



análise separada por cromossoma, os cromossomas 4, 7, 13 e 15, respectivamente, foram os que mais explicaram os sintomas de asma (figura 4).

**Análise de enriquecimento:** Esta análise complementa os testes de associação. Baseia-se no conhecimento prévio de genes envolvidos nas rotas biológicas já conhecidas, testando-se a associação entre essas rotas com o fenótipo de interesse. Examinou-se todas as rotas metabólicas das quais 20 tinham valores  $p$  empíricos inferiores a 0,05 e a rota da hematopoiese que tinha um valor de  $p$  empírico inferior a  $10^{-4}$ : (GO:0030097,  $p$ -empírico:  $7.9 \times 10^{-4}$ ). No entanto, estas rotas perderam significância estatística após correção para múltiplos testes (tabela 3).

## DISCUSSÃO:

Neste estudo foi realizado um teste de associação por varredura genômica para sintomas de asma em 1248 crianças na população de Salvador-BA, Brasil. As regiões 14q11 e 15q21 foram associadas com sintomas de asma. Também foi possível ter uma noção da possível herdabilidade dos sintomas de asma, sendo que o genoma pode ter explicado até 70% dos casos.

A região 14q11 já foi relatada em diferentes estudos de GWAs associada com desenvolvimento dental<sup>21</sup>, obesidade<sup>22</sup>, problemas cardíacos<sup>23</sup>, narcolepsia<sup>24</sup> e câncer<sup>25</sup>. Entretanto, ainda não há relato dessa associação em estudos de asma.

Estudos de genes candidatos nesta região encontraram associação de regiões gênicas envolvidas na modulação de respostas inflamatórias e imunológica. O gene **LTB4** (*receptor beta 4 de leucotrieno*) foi associado com asma<sup>26</sup> e **TRA** (Receptor alfa de célula T) associado com teste cutâneo positivo (*skin prick test* - SPT) em um estudo de *linkage* num grupo de famílias asmáticas<sup>27</sup> e associado com asma em estudo de rotas metabólicas em GWAs<sup>28</sup>. Ademais, com base nas funções biológicas previamente descritas, é razoável supor que nessa região possam estar localizados genes potencialmente associados com sintomas de asma, a exemplo de SLC7A7, MMP14 e DAD1. O gene **SLC7A7** está envolvido no processo de diferenciação de macrófagos<sup>29</sup>, cuja associação com asma já é bem descrita<sup>30</sup>. **MMP14** está envolvido com remodelagem da matriz

extracelular<sup>31</sup> e, conseqüentemente, à remodelagem do epitélio das vias aéreas<sup>32</sup>. **DAD1** está ativo em processo de regulação da apoptose<sup>33</sup>, cuja falha neste processo pode levar ao aumento de linfócitos em pacientes com asma<sup>34</sup>. A variante mais associada neste estudo, rs1999071, está na região flanqueadora do gene **OXA1L**, cuja proteína é membro da família de proteínas evolutivamente conservadas Oxa1/Alb3/YidC, que está envolvida na biogênese de proteínas de membrana em mitocôndrias, cloroplastos e bactérias<sup>35</sup>. Apesar da asma não ser considerada como uma síndrome mitocondrial, existe uma considerável sobreposição entre a patofisiologia da asma e a biologia mitocondrial nos aspectos de apoptose, estresse oxidativo e de homeostasia dos íons de cálcio<sup>36</sup>. Alterações no estresse oxidativo podem levar ao desenvolvimento de asma por ativação de rotas pró-inflamatórias<sup>37</sup>. Alteração da homeostasia do Ca<sup>++</sup> nas células da musculatura lisa dos brônquios aumenta a biogênese de mitocôndrias, proliferação celular e, conseqüentemente, a remodelagem das vias aéreas em pacientes asmáticos<sup>38</sup>.

A segunda região mais associada neste estudo foi a 15q21, já descrita em estudos de GWAs com asma, cujos genes mais associados foram *RORA*, *SMAD3* e *SCG3*<sup>39</sup>; <sup>40</sup>. **RORA** é um fator de transcrição que pertence à superfamília do receptor do hormônio nuclear (NR1) e se liga como monômeros para elementos de resposta hormonal específica no DNA<sup>41</sup>. Pode aumentar ou reprimir a transcrição de genes alvo<sup>42</sup> e é diferencialmente expresso durante o desenvolvimento do pulmão humano<sup>43</sup>. Em um modelo de inflamação das vias aéreas induzida por ovalbumina, os camundongos deficientes nesta proteína tiveram infiltração pulmonar atenuada, redução da hiperplasia da mucosa e níveis reduzidos de Th2, IL-4, IL-5, e IL-13 <sup>44</sup>. Também pode modificar as respostas de inflamação das vias aéreas e de interleucina que são cruciais para o desenvolvimento de asma<sup>39</sup>. Já **SMAD3** (membro 3 da família de proteínas SMAD) é um fator de transcrição *downstream* (após) do TGFβ e importante para rotas metabólicas de células T reguladoras e células TH17<sup>45</sup>. Está relacionado com a rota metabólica de células T reguladoras, que faz parte do processo comum de regulação negativa de TH1 e TH2<sup>46</sup>. O bloqueio da sinalização SMAD3–TNFβ em células T maduras potencializa a reação inflamatória das vias aéreas<sup>47</sup>. **SCG3** (secretogranina 3) codifica uma proteína membro da família de

proteínas secretoras neuroendócrinas, cromogranina/secretogranina, que são proteínas ubíquas reguladoras de secreção protéica<sup>48</sup>. Entretanto, suas funções ainda foram pouco estudadas.

A segunda variante mais associada a sintomas de asma no presente estudo, rs10519031, flanqueia o gene **FOXB1**, que pertence à família dos fatores de transcrição *forkhead box (FOX)* com mais de 40 membros expressos em mamíferos. Mutações neste grupo de genes têm importantes efeitos em doenças humanas<sup>49</sup>. Entretanto, até o momento, a proteína FOXB1 só foi descrita como envolvida na regulação do desenvolvimento embrionário<sup>50</sup>.

Uma discordância importante nestes achados de GWAs foi a completa ausência de genes na região 17q21 entre os 100 SNPs mais associados com sintomas de asma<sup>6</sup>, acredita-se que este fato possa estar relacionado à maior associação desta região com asma atópica, como se demonstrou no terceiro artigo desta tese e a população utilizada para este artigo não apresenta esta característica como a mais importante.

Para a maioria das doenças complexas, os SNPs associados provenientes de estudos de varredura genômica (GWAs) só explicam uma pequena fração da herdabilidade. Neste artigo, a estimativa da variância atribuída aos sintomas de asma foi de 70%, valor elevado e consistente com achados prévios em estudos de herança familiar para asma<sup>51</sup> e em estudo de coorte<sup>52</sup>. Esses resultados reforçam a ideia de que a asma é uma doença complexa e com herança poligênica, em que, individualmente diferentes genes e seus polimorfismos contribuem pouco para o desfecho, porém, quando analisados em conjunto, o efeito é grande. A análise com GCTA explicou uma proporção substancial do efeito genético conhecido como "herdabilidade perdida" e forneceu evidências de que a influência genética aditiva de vários SNPs comuns é uma poderosa determinante de asma na infância.

É importante compreender que os estudos de varredura genômica possuem limitações de análise como, por exemplo, não detectar variantes raras. Portanto, necessitam de outras abordagens complementares como resequenciamento, análise de expressão gênica e replicação em outras populações<sup>53</sup>. A principal limitação deste estudo está relacionada ao poder, isto não nos permitiu

diferenciar asma atópica da não atópica. A amostra utilizada foi considerada adequada para estudos epidemiológicos clássicos, contudo estudos de varredura genômica ou enriquecimento têm uma demanda por uma população amostral maior do que nas análises clássicas e, provavelmente por conta disto, não foi encontrada nenhuma rota metabólica associada a sintomas de asma.

Por fim, conclui-se que na população estudada, as regiões 14q11 e 15q21 estão associadas com sintomas de asma na infância, entretanto estas regiões explicam menos de 12% deste fenótipo. No total, até 70% destes podem ser explicados por variantes genéticas comuns, confirmando a natureza poligênica da asma.

## REFERÊNCIAS

- 1 COOPER, P. J. *et al.* Asthma in Latin America: a public health challenge and research opportunity. **Allergy**, v. 64, n. 1, p. 5-17, Jan 2009.
- 2 THOMSEN, S. F. *et al.* Estimates of asthma heritability in a large twin sample. **Clin Exp Allergy**, v. 40, n. 7, p. 1054-61, Jul 2010.
- 3 KABESCH, M. Novel asthma-associated genes from genome-wide association studies: what is their significance? **Chest**, v. 137, n. 4, p. 909-15, Apr 2010.
- 4 MCCARTHY, M. I. *et al.* Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges. **Nat Rev Genet**, v. 9, n. 5, p. 356-69, May 2008.
- 5 WEISS, S. T.; SILVERMAN, E. K. Pro: Genome-wide association studies (GWAS) in asthma. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 184, n. 6, p. 631-3, Sep 15 2011.
- 6 MOFFATT, M. F. *et al.* Genetic variants regulating ORMDL3 expression contribute to the risk of childhood asthma. **Nature**, v. 448, n. 7152, p. 470-3, Jul 26 2007.
- 7 WAN, Y. I. *et al.* Genome-wide association study to identify genetic determinants of severe asthma. **Thorax**, v. 67, n. 9, p. 762-8, 2012.
- 8 DEWAN, A. T. *et al.* PDE11A associations with asthma: Results of a genome-wide association scan. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 126, n. 4, p. 871-U321, Oct 2010.

- 9 MATHIAS, R. A. *et al.* A genome-wide association study on African-ancestry populations for asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 2, p. 336-346, Feb 2010.
- 10 BARRETO, M. L. *et al.* 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 Pulm Med**, v. 6, p. 15, 2006.
- 11 IBGE. Instituto Brasileiro de geografia e Estatística - Sistema SIDRA. 2014. Disponível em: <  
<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?z=cd&o=4&i=P&c=3145>>. Acesso em: 01/04/2014.
- 12 ASHER, M. I. *et al.* International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC): rationale and methods. **Eur Respir J**, v. 8, n. 3, p. 483-91, Mar 1995.
- 13 LAURIE, C. C. *et al.* Quality control and quality assurance in genotypic data for genome-wide association studies. **Genet Epidemiol**, v. 34, n. 6, p. 591-602, Sep 2010.
- 14 PRICE, A. L. *et al.* Principal components analysis corrects for stratification in genome-wide association studies. **Nat Genet**, v. 38, n. 8, p. 904-9, Aug 2006.
- 15 HOWIE, B. N.; DONNELLY, P.; MARCHINI, J. A flexible and accurate genotype imputation method for the next generation of genome-wide association studies. **PLoS Genet**, v. 5, n. 6, p. e1000529, Jun 2009.
- 16 MARCHINI, J. *et al.* A new multipoint method for genome-wide association studies by imputation of genotypes. **Nat Genet**, v. 39, n. 7, p. 906-13, Jul 2007.
- 17 MARCHINI, J.; HOWIE, B. Genotype imputation for genome-wide association studies. **Nat Rev Genet**, v. 11, n. 7, p. 499-511, Jul 2010.
- 18 YANG, J. *et al.* Common SNPs explain a large proportion of the heritability for human height. **Nat Genet**, v. 42, n. 7, p. 565-9, Jul 2010.
- 19 LEE, P. H. *et al.* Multi-locus genome-wide association analysis supports the role of glutamatergic synaptic transmission in the etiology of major depressive disorder. **Transl Psychiatry**, v. 2, p. e184, 2012.
- 20 DRESZER, T. R. *et al.* The UCSC Genome Browser database: extensions and updates 2011. **Nucleic acids research**, v. 40, n. D1, p. D918-D923, 2012.

- 21 FATEMIFAR, G. *et al.* Genome-wide association study of primary tooth eruption identifies pleiotropic loci associated with height and craniofacial distances. **Hum Mol Genet**, v. 22, n. 18, p. 3807-17, Sep 15 2013.
- 22 COMUZZIE, A. G. *et al.* Novel genetic loci identified for the pathophysiology of childhood obesity in the Hispanic population. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e51954, 2012.
- 23 AOUIZERAT, B. E. *et al.* GWAS for discovery and replication of genetic loci associated with sudden cardiac arrest in patients with coronary artery disease. **BMC Cardiovasc Disord**, v. 11, p. 29, 2011.
- 24 HALLMAYER, J. *et al.* Narcolepsy is strongly associated with the T-cell receptor alpha locus. **Nature genetics**, v. 41, n. 6, p. 708-711, 2009.
- 25 PAPAEMMANUIL, E. *et al.* Loci on 7p12.2, 10q21.2 and 14q11.2 are associated with risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. **Nat Genet**, v. 41, n. 9, p. 1006-10, Sep 2009.
- 26 TULAH, A. S. *et al.* Leukotriene B4 receptor locus gene characterisation and association studies in asthma. **BMC Med Genet**, v. 13, p. 110, 2012.
- 27 MANSUR, A. H. *et al.* Suggestive evidence for genetic linkage between IgE phenotypes and chromosome 14q markers. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 159, n. 6, p. 1796-1802, 1999.
- 28 SONG, G. G.; LEE, Y. H. Pathway analysis of genome-wide association study on asthma. **Hum Immunol**, v. 74, n. 2, p. 256-60, Feb 2013.
- 29 BARILLI, A. *et al.* Arginine transport in human monocytic leukemia THP-1 cells during macrophage differentiation. **J Leukoc Biol**, v. 90, n. 2, p. 293-303, Aug 2011.
- 30 SHIREY, K. A. *et al.* Control of RSV-induced lung injury by alternatively activated macrophages is IL-4R alpha-, TLR4-, and IFN-beta-dependent. **Mucosal Immunol**, v. 3, n. 3, p. 291-300, May 2010.
- 31 NIARAKIS, A. *et al.* Detection of a latent soluble form of membrane type 1 matrix metalloprotease bound with tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-2 in periprosthetic tissues and fluids from loose arthroplasty endoprostheses. **FEBS J**, v. 280, n. 24, p. 6541-55, Dec 2013.
- 32 ROBERTS, M. E. *et al.* Discoidin domain receptor 1 regulates bronchial epithelial repair and matrix metalloproteinase production. **Eur Respir J**, v. 37, n. 6, p. 1482-93, Jun 2011.
- 33 KELLEHER, D. J.; GILMORE, R. DAD1, the defender against apoptotic cell death, is a subunit of the mammalian oligosaccharyltransferase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 10, p. 4994-9, May 13 1997.

- 34 PERSSON, C. Airway, apoptosis, and asthma. **Clin Exp Allergy**, v. 43, n. 9, p. 1083-5, Sep 2013.
- 35 STIBUREK, L. *et al.* Knockdown of human Oxa1l impairs the biogenesis of F1Fo-ATP synthase and NADH:ubiquinone oxidoreductase. **J Mol Biol**, v. 374, n. 2, p. 506-16, Nov 23 2007.
- 36 MABALIRAJAN, U.; GHOSH, B. Mitochondrial dysfunction in metabolic syndrome and asthma. **J Allergy (Cairo)**, v. 2013, p. 340476, 2013.
- 37 NANDEDKAR, S. D. *et al.* D-4F, an apoA-1 mimetic, decreases airway hyperresponsiveness, inflammation, and oxidative stress in a murine model of asthma. **J Lipid Res**, v. 52, n. 3, p. 499-508, Mar 2011.
- 38 TRIAN, T. *et al.* Bronchial smooth muscle remodeling involves calcium-dependent enhanced mitochondrial biogenesis in asthma. **J Exp Med**, v. 204, n. 13, p. 3173-81, Dec 24 2007.
- 39 MOFFATT, M. F. *et al.* A large-scale, consortium-based genomewide association study of asthma. **N Engl J Med**, v. 363, n. 13, p. 1211-21, Sep 23 2010.
- 40 LI, X. N. *et al.* Genome-wide association study of asthma identifies RAD50-IL13 and HLA-DR/DQ regions. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 2, p. 328-335, Feb 2010.
- 41 JETTEN, A. M. Retinoid-related orphan receptors (RORs): critical roles in development, immunity, circadian rhythm, and cellular metabolism. **Nucl Recept Signal**, v. 7, p. e003, 2009.
- 42 SATO, T. K. *et al.* A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock. **Neuron**, v. 43, n. 4, p. 527-37, Aug 19 2004.
- 43 MELEN, E. *et al.* Expression analysis of asthma candidate genes during human and murine lung development. **Respir Res**, v. 12, p. 86, 2011.
- 44 JARADAT, M. *et al.* Modulatory role for retinoid-related orphan receptor alpha in allergen-induced lung inflammation. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 174, n. 12, p. 1299-309, Dec 15 2006.
- 45 MARTINEZ, G. J. *et al.* Smad3 differentially regulates the induction of regulatory and inflammatory T cell differentiation. **J Biol Chem**, v. 284, n. 51, p. 35283-6, Dec 18 2009.
- 46 LI, X. *et al.* Genome-wide association studies of asthma indicate opposite immunopathogenesis direction from autoimmune diseases. **J Allergy Clin Immunol**, v. 130, n. 4, p. 861-8 e7, Oct 2012.

- 47 NAKAO, A. *et al.* Blockade of transforming growth factor beta/Smad signaling in T cells by overexpression of Smad7 enhances antigen-induced airway inflammation and airway reactivity. **J Exp Med**, v. 192, n. 2, p. 151-8, Jul 17 2000.
- 48 BARTOLOMUCCI, A. *et al.* The extended granin family: structure, function, and biomedical implications. **Endocr Rev**, v. 32, n. 6, p. 755-97, Dec 2011.
- 49 HANNENHALLI, S.; KAESTNER, K. H. The evolution of Fox genes and their role in development and disease. **Nat Rev Genet**, v. 10, n. 4, p. 233-40, Apr 2009.
- 50 ZHAO, T. *et al.* Genetic mapping of Foxb1-cell lineage shows migration from caudal diencephalon to telencephalon and lateral hypothalamus. **Eur J Neurosci**, v. 28, n. 10, p. 1941-55, Nov 2008.
- 51 LAITINEN, T. *et al.* Importance of genetic factors in adolescent asthma: a population-based twin-family study. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 157, n. 4 Pt 1, p. 1073-8, Apr 1998.
- 52 MCGEACHIE, M. J. *et al.* Polygenic heritability estimates in pharmacogenetics: focus on asthma and related phenotypes. **Pharmacogenet Genomics**, v. 23, n. 6, p. 324-8, Jun 2013.
- 53 WANG, K.; LI, M.; HAKONARSON, H. Analysing biological pathways in genome-wide association studies. **Nat Rev Genet**, v. 11, n. 12, p. 843-54, Dec 2010.



**Tabela 1:** Os 20 SNPs mais associados com asma, corrigido pelas três primeiras componentes principais da análise de ancestralidade.

Rank	Cromossoma	SNP	Posição (bp)	Alelo de risco	Gene	Odds ratio	IC (95%)	p
1	14	rs1999071	23129207	C	INTERGÊNICA	1,782	(1,453 - 2,185)	2,834e-08
2	15	rs10519031	60183005	C	INTERGÊNICA	3,008	(2,017 - 4,487)	6,676e-08
3	15	rs8029377	60191985	C	INTERGÊNICA	2,495	(1,763 - 3,53)	2,454e-07
4	3	rs77165709	159452876	T	IQCJ-SCHIP1	2,275	(1,661 - 3,117)	3,045e-07
5	10	rs10159952	77562470	A	C10orf11	2,041	(1,533 - 2,717)	1,016e-06
6	9	rs1329568	37037976	T	LOC100130458	1,933	(1,473 - 2,537)	2,02e-06
7	7	rs1425883	49754984	T	INTERGÊNICA	0,6043	(0,4908 - 0,7439)	2,037e-06
8	7	rs1543902	49754752	G	INTERGÊNICA	0,6044	(0,4907 - 0,7444)	2,164e-06
9	18	rs76227669	10787366	T	PIEZO2	4,063	(2,241 - 7,366)	3,881e-06
10	9	rs4878674	37036329	T	INTERGÊNICAX5	1,9	(1,446 - 2,497)	4,027e-06
11	10	rs1244495	7881339	G	TAF3	0,6137	(0,4985 - 0,7555)	4,169e-06
12	1	rs269330	68548590	T	GNG12-AS1	1,749	(1,377 - 2,221)	4,669e-06
13	7	rs10268364	28708465	C	CREB5	1,593	(1,305 - 1,945)	4,671e-06
14	7	rs41335	28704468	C	CREB6	0,6373	(0,5254 - 0,773)	4,793e-06
15	4	rs72998173	173715118	G	GALNTL6	1,758	(1,38 - 2,239)	4,848e-06
16	3	rs4373023	34077223	T	INTERGÊNICA	1,57	(1,294 - 1,906)	4,977e-06
17	9	rs1329567	37038326	A	LOC100130458	1,969	(1,47 - 2,636)	5,46e-06
18	9	rs2381598	37041246	C	INTERGÊNICA	1,968	(1,47 - 2,636)	5,474e-06
19	15	rs12901887	56941976	G	ZNF280D	0,5567	(0,4318 - 0,7177)	6,224e-06
20	1	rs79530846	171950308	T	vDNM3	3,078	(1,882 - 5,035)	7,542e-06

**Tabela 2:** Análise de variância genômica dos sintomas de asma\*.

	<b>Vg/Vp</b>	<b>Erro padrão</b>	<b>Valor de <math>p</math></b>
Todos os SNPs	0,70	0,25	0,001
Todos os SNPs, excluído os 20 mais associados com o desfecho.	0,69	0,25	0,001
Apenas dos 20 SNPs mais associados no estudo de GWAs	0,12	0,04	0

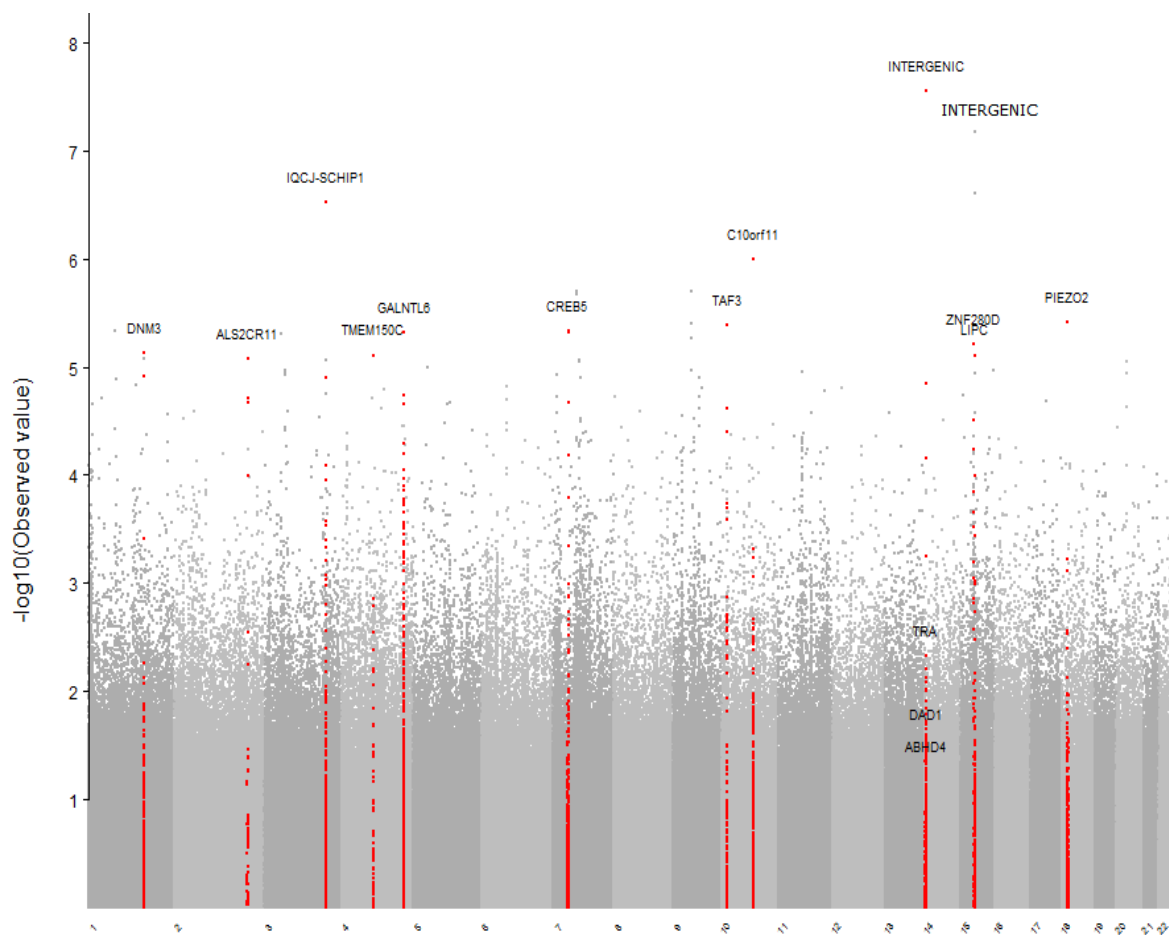
\* corrigido por sexo e pelas três primeiras componentes principais da análise de ancestralidade.

**Tabela 3:** Rotas metabólicas associadas com sintomas de asma sugeridas pela análise de enriquecimento.

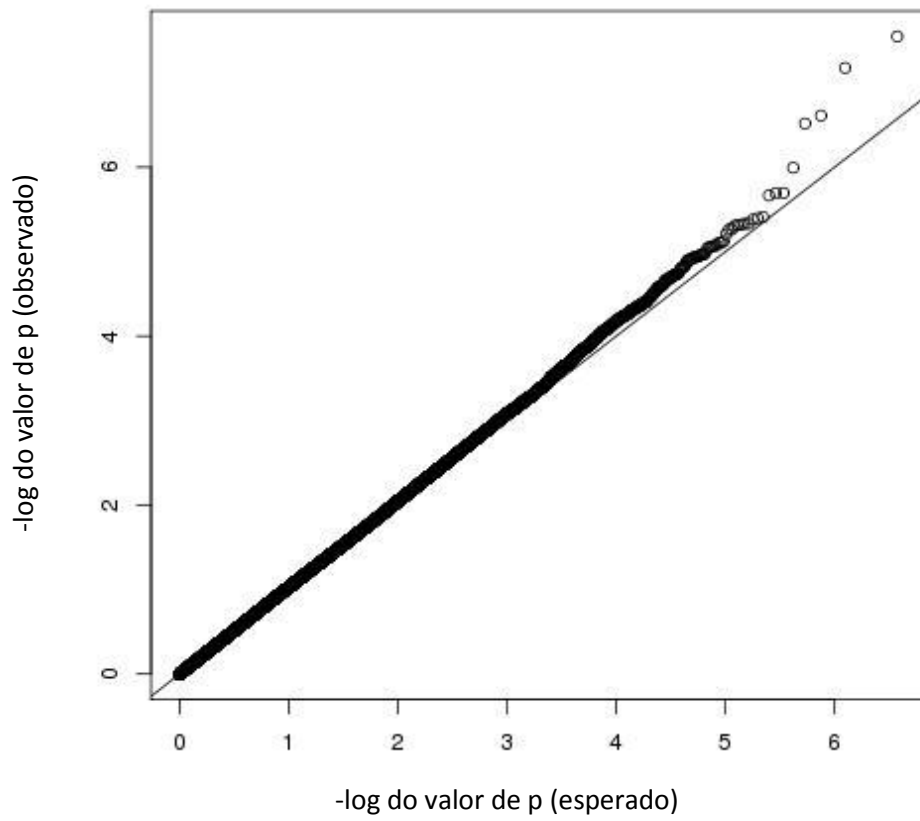
Rota Metabólica	Total de genes no intervalo	Nº de Genes associados no intervalo	Genes	p-empírico	p-corrigido
GO:0030097: hemopoiesis	52	7	<i>CD164</i> (chr6), <i>KIRREL3</i> (chr11), <i>BRCA2</i> (chr13), <i>RPA1</i> (chr17), <i>BCL11A</i> (chr2), <i>PKNOX1</i> (chr21), <i>IKZF1</i> (chr7).	0,00079	0,757243
GO:0070935: 3'-UTR-mediated mRNA stabilization	3	2	<i>TARDBP</i> (chr1), <i>ELAVL1</i> (chr19).	0,00139	0,94106
GO:001961: flagellum	1	4	<i>CATSPERB</i> (chr11), <i>SPAG16</i> (chr2), <i>SPAG17</i> (chr1), <i>CATSPER1</i> (chr14).	0,00139	0,94106
GO:0043922: negative regulation by host of viral transcription	4	2	<i>POU2F3</i> (chr11), <i>TARDBP</i> (chr1).	0,00179	0,943057
GO:000369: DNA clamp loader activity	5	2	<i>RFC2</i> (chr7), <i>RFC5</i> (chr12).	0,00419	0,999001
GO:0030212: hyaluronan metabolic process	6	2	<i>ITIH5</i> (chr10), <i>ITIH2</i> (chr10).	0,00419	0,999001
GO:0050291: sphingosine N-acyltransferase activity	5	2	<i>LASS4</i> (chr19), <i>LASS3</i> (chr15).	0,00459	0,999001
GO:0005663: DNA replication factor C complex	6	2	<i>RFC2</i> (chr7), <i>RFC5</i> (chr12).	0,00519	0,999001
GO:004649: S-adenosylhomocysteine metabolic process	6	2	<i>TPMT</i> (chr6), <i>DNMT3A</i> (chr2).	0,00519	0,999001
GO:0006297: nucleotide-excision repair, DNA gap filling	17	3	<i>RPA1</i> (chr17), <i>RFC5</i> (chr12), <i>RFC2</i> (chr7).	0,00579	1

**Continuação da tabela 3:**

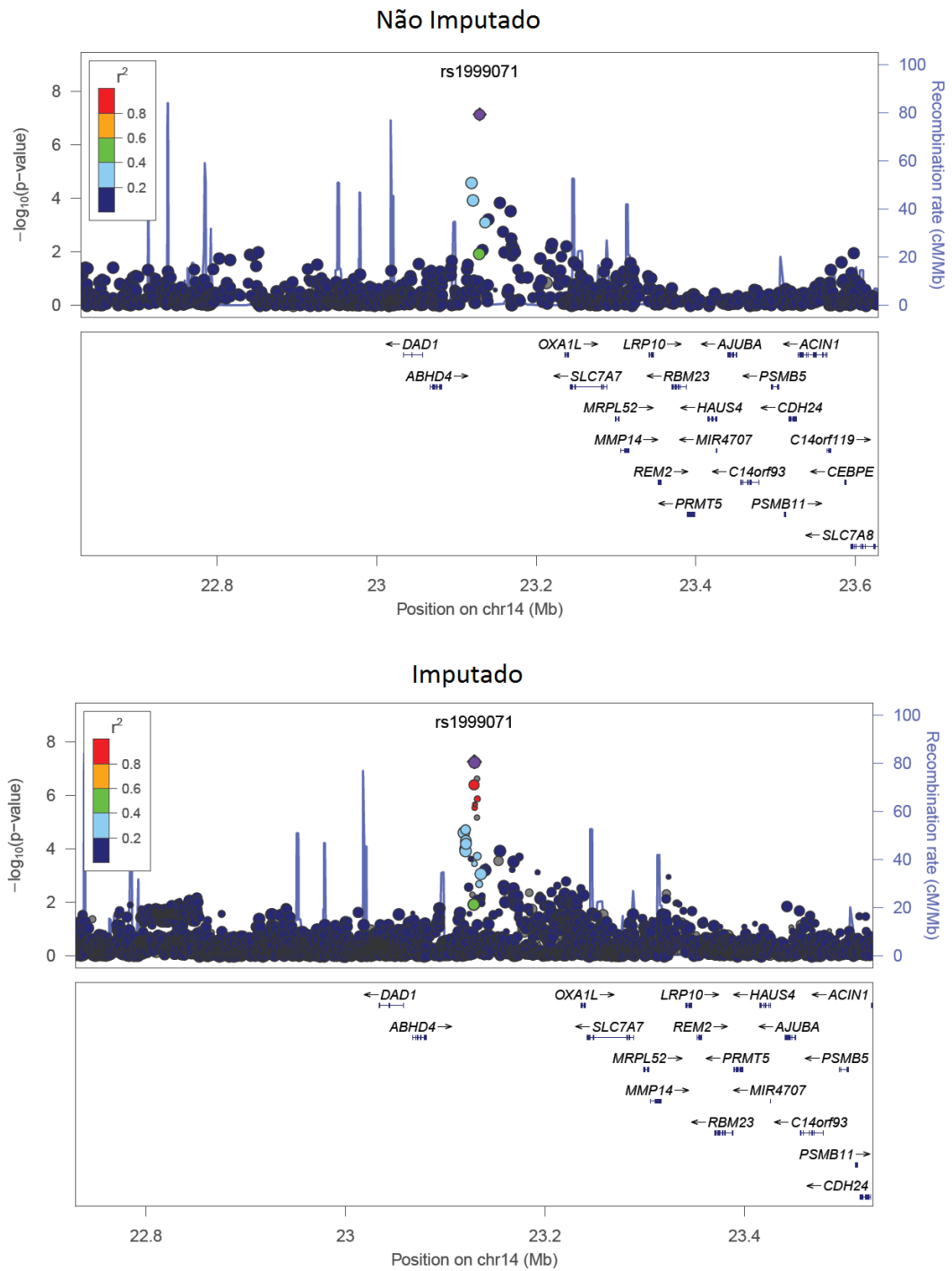
GO:0030217: T cell differentiation	19	3	<i>BCL11A</i> (chr2), <i>PKNOX1</i> (chr21), <i>IKZF1</i> (chr7).	0,00619	1
GO:0016010: dystrophin-associated glycoprotein complex	14	3	<i>SGCD</i> (chr5), <i>SGCE</i> (chr7), <i>SNTB1</i> (chr).	0,00719	1
GO:0017111: nucleoside-triphosphatase activity	60	5	<i>AFG3L2</i> (chr18), <i>NAV3</i> (chr12), <i>RAD51L1</i> (chr14), <i>RFC2</i> (chr7), <i>RFC5</i> (chr12).	0,00779	1
GO:0015279: store-operated calcium channel activity	6	2	<i>TRPC3</i> (chr4), <i>TRPC6</i> (chr11).	0,00959	1
GO:0031513: nonmotile primary cilium	7	2	<i>PCM1</i> (chr8), <i>SSTR3</i> (chr22).	0,00999	1
GO:0035094: response to nicotine	15	3	<i>ABAT</i> (chr16), <i>CHRNA4</i> (chr20), <i>GNAT3</i> (chr7).	0,01079	1
GO:005053: B cell receptor signaling pathway	9	2	<i>KLHL6</i> (chr3), <i>LAT2</i> (chr7).	0,01219	1
GO:004535: lymph node development	10	2	<i>CXCR5</i> (chr11), <i>IKZF1</i> (chr7)	0,01239	1
GO:000610: lipid biosynthetic process	22	3	<i>FAR2</i> (chr12), <i>LASS3</i> (chr15), <i>LASS4</i> (chr19).	0,01339	1
GO:0014911: positive regulation of smooth muscle cell migration	10	2	<i>IL6ST</i> (chr5), <i>ITGA2</i> (chr5).	0,01579	1



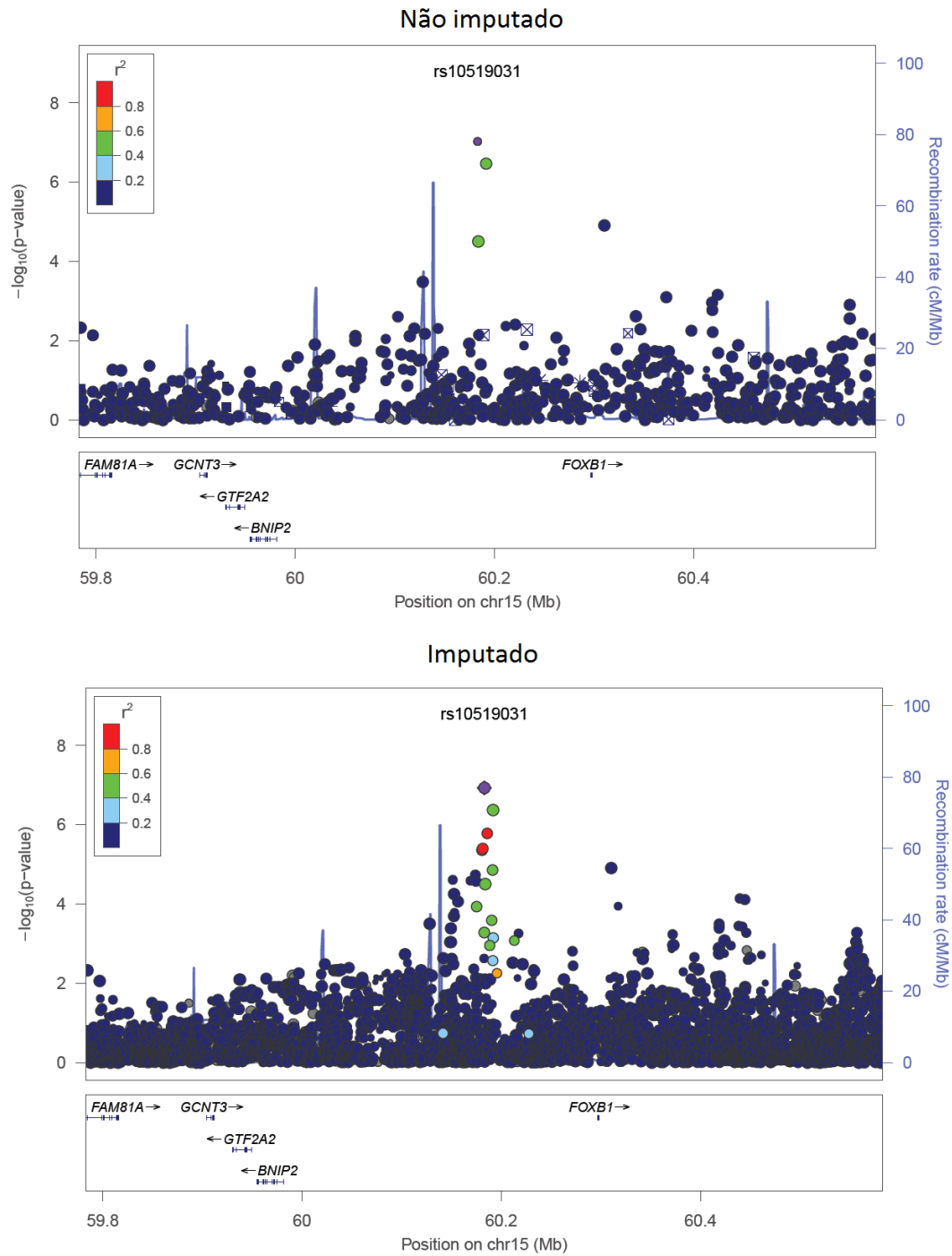
**Figura 1:** Manhattan plot para sintomas de asma em crianças, ajustado pela estratificação populacional. Em vermelho destaca-se as regiões dos genes mais associados.



**Figura 2:** QQ-plot para sintomas de asma em crianças, ajustado pela estratificação populacional.

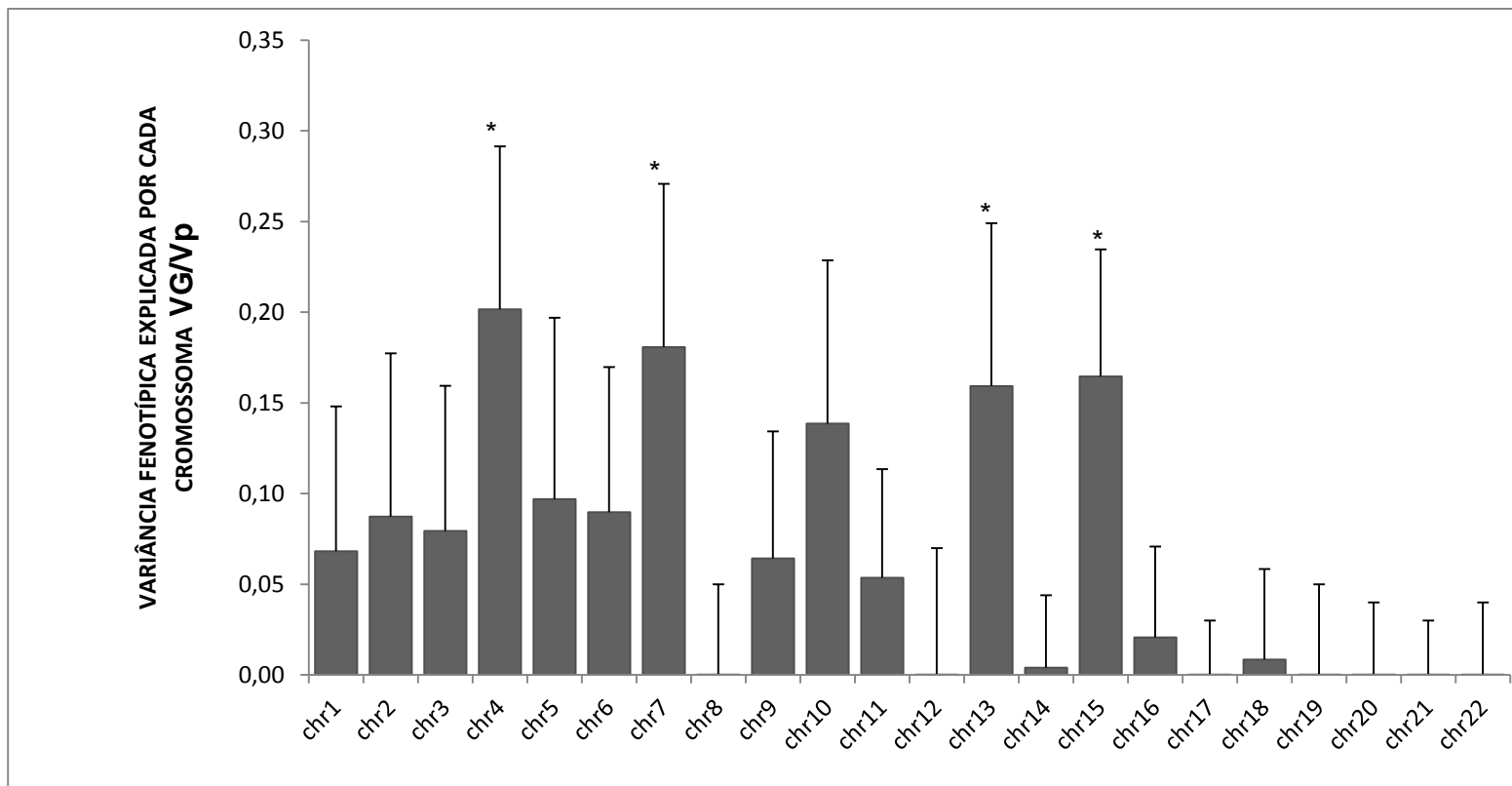


**Figura 3:** Regional plot do cromossomo 14, região mais associada com sintomas de asma em crianças.



**Figura 4:** Regional plot do cromossomo 15, segunda região mais associada com sintomas de asma em crianças.





**Figura 5:** Variância fenotípica explicada por cada cromossoma.

## Material suplementar do artigo 1

**Tabela S1:** Os 100 SNPs mais associados com sintomas de asma na infância.

Rank	Cromossoma	SNP	Posição (bp)	Alelo de risco	Gene	Odds ratio	CI(95%)	p
1	14	rs1999071	23129207	C	INTERGÊNICA	1,782	(1,453 - 2,185)	2,834e-08
2	15	rs10519031	60183005	C	INTERGÊNICA	3,008	(2,017 - 4,487)	6,676e-08
3	15	rs8029377	60191985	C	INTERGÊNICA	2,495	(1,763 - 3,53)	2,454e-07
4	3	rs77165709	159452876	T	IQCJ-SCHIP1	2,275	(1,661 - 3,117)	3,045e-07
5	10	rs10159952	77562470	A	C10orf11	2,041	(1,533 - 2,717)	1,016e-06
6	9	rs1329568	37037976	T	LOC100130458	1,933	(1,473 - 2,537)	2,02e-06
7	7	rs1425883	49754984	T	INTERGÊNICA	0,6043	(0,4908 - 0,7439)	2,037e-06
8	7	rs1543902	49754752	G	INTERGÊNICA	0,6044	(0,4907 - 0,7444)	2,164e-06
9	18	rs76227669	10787366	T	PIEZO2	4,063	(2,241 - 7,366)	3,881e-06
10	9	rs4878674	37036329	T	INTERGÊNICA X5	1,9	(1,446 - 2,497)	4,027e-06
11	10	rs1244495	7881339	G	TAF3	0,6137	(0,4985 - 0,7555)	4,169e-06
12	1	rs269330	68548590	T	GNG12-AS1	1,749	(1,377 - 2,221)	4,669e-06
13	7	rs10268364	28708465	C	CREB5	1,593	(1,305 - 1,945)	4,671e-06
14	7	rs41335	28704468	C	CREB6	0,6373	(0,5254 - 0,773)	4,793e-06
15	4	rs72998173	173715118	G	GALNTL6	1,758	(1,38 - 2,239)	4,848e-06
16	3	rs4373023	34077223	T	INTERGÊNICA	1,57	(1,294 - 1,906)	4,977e-06
17	9	rs1329567	37038326	A	LOC100130458	1,969	(1,47 - 2,636)	5,46e-06
18	9	rs2381598	37041246	C	INTERGÊNICA	1,968	(1,47 - 2,636)	5,474e-06
19	15	rs12901887	56941976	G	ZNF280D	0,5567	(0,4318 - 0,7177)	6,224e-06
20	1	rs79530846	171950308	T	vDNM3	3,078	(1,882 - 5,035)	7,542e-06
21	4	rs6535350	83439160	G	TMEM150C	1,593	(1,299 - 1,954)	7,816e-06
22	15	rs1968687	58822697	G	LIPC	1,542	(1,275 - 1,864)	7,826e-06
23	2	rs113750103	202398743	T	ALS2CR11	2,391	(1,629 - 3,509)	8,431e-06

**Continuação da tabela S1:**

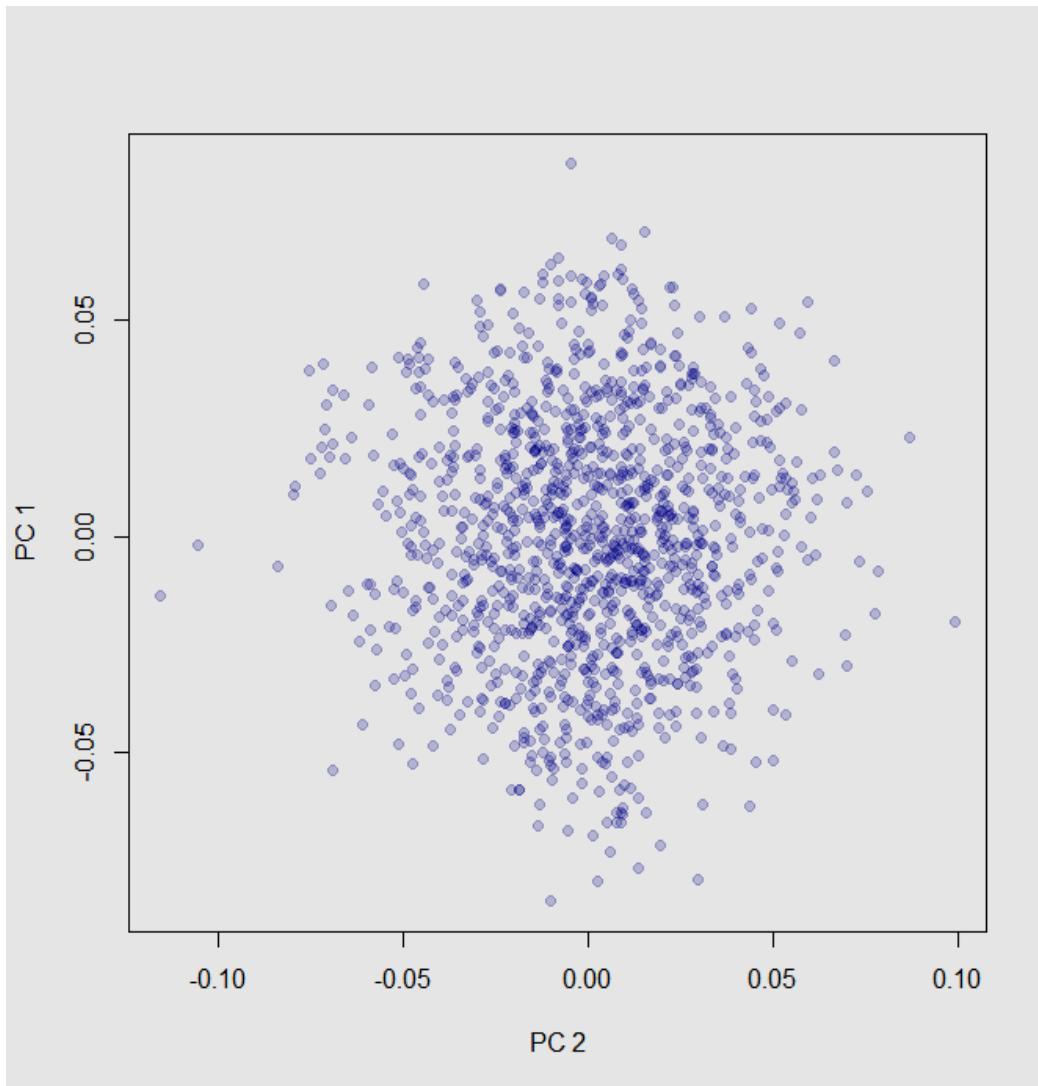
24	1	rs78521816	171414740	A	INTERGÊNICA	2,299	(1,594 - 3,317)	8,483e-06
25	7	rs114576775	54243876	A	INTERGÊNICA	4,023	(2,179 - 7,428)	8,642e-06
26	3	rs80316500	159982507	C	IFT80	1,594	(1,298 - 1,958)	8,742e-06
27	20	rs1555852	19536127	T	SLC24A3	1,72	(1,354 - 2,186)	8,959e-06
28	7	rs78980017	54227948	G	INTERGÊNICA	4,008	(2,171 - 7,4)	9,092e-06
29	5	rs10069226	31271333	A	CDH6	2,344	(1,606 - 3,421)	1,013e-05
30	9	rs4880052	37036285	A	INTERGÊNICA	1,893	(1,425 - 2,515)	1,078e-05
31	3	rs7622659	45357777	A	INTERGÊNICA	2,324	(1,596 - 3,383)	1,083e-05
32	15	rs35743173	101324457	A	LOC440313	2,498	(1,661 - 3,756)	1,09e-05
33	11	rs7928089	68574429	A	CPT1A	1,55	(1,275 - 1,886)	1,118e-05
34	15	rs4775232	60310375	C	INTERGÊNICA	1,525	(1,263 - 1,842)	1,143e-05
35	3	rs9827639	45342749	T	INTERGÊNICA	2,372	(1,612 - 3,49)	1,159e-05
36	20	rs942992	19564963	T	SLC24A3	1,787	(1,378 - 2,316)	1,161e-05
37	7	rs58285948	7305712	C	INTERGÊNICA	2,222	(1,555 - 3,176)	1,172e-05
38	3	rs9815657	45345904	T	INTERGÊNICA	2,37	(1,611 - 3,486)	1,187e-05
39	1	rs78063878	172018390	G	DNM3	3,126	(1,875 - 5,211)	1,233e-05
40	3	rs6767038	159453369	T	SCHIP1	1,561	(1,278 - 1,906)	1,245e-05
41	7	rs77188806	64926662	T	INTERGÊNICA	4,664	(2,337 - 9,307)	1,252e-05
42	9	rs1948308	87616257	T	NTRK2	0,6569	(0,544 - 0,7932)	1,259e-05
43	1	rs17097444	69918002	C	INTERGÊNICA	3,487	(1,988 - 6,116)	1,316e-05
44	14	rs1681581	23118663	G	INTERGÊNICA	1,694	(1,335 - 2,149)	1,435e-05
45	1	rs116375634	154273469	T	INTERGÊNICA	3,085	(1,853 - 5,136)	1,482e-05
46	6	rs113623387	43162490	G	CUL9	1,535	(1,264 - 1,864)	1,51e-05
47	12	rs78201583	20700554	C	PDE3A	2,644	(1,701 - 4,109)	1,546e-05
48	9	rs2774241	93665453	A	INTERGÊNICA	1,758	(1,361 - 2,271)	1,56e-05
49	4	rs75957247	114692320	T	INTERGÊNICA	1,664	(1,32 - 2,097)	1,62e-05
50	11	rs58478357	119628335	C	LOC101929156	1,664	(1,32 - 2,099)	1,67e-05
51	3	rs16831149	159976271	T	IFT80	1,564	(1,275 - 1,919)	1,801e-05

**Continuação da tabela S1:**

52	15	rs8042498	29605931	A	FAM189A1	2,654	(1,698 - 4,148)	1,824e-05
53	4	rs13124037	173085238	T	GALNTL6	0,6454	(0,5283 - 0,7886)	1,831e-05
54	8	rs59811079	1625732	G	DLGAP2	0,6484	(0,5317 - 0,7907)	1,863e-05
55	9	rs7860117	87770429	G	INTERGÊNICA	1,801	(1,376 - 2,359)	1,87e-05
56	7	rs77053500	7903345	A	LOC729852	4,725	(2,319 - 9,629)	1,907e-05
57	1	rs115763417	30939086	A	INTERGÊNICA	2,705	(1,714 - 4,271)	1,928e-05
58	2	rs77540829	202400872	A	ALS2CR11	2,582	(1,67 - 3,991)	1,971e-05
59	4	rs78129004	81117017	A	PRDM8	4,149	(2,159 - 7,975)	1,975e-05
60	6	rs2273709	43184132	C	CUL9	1,525	(1,256 - 1,851)	2e-05
61	17	rs115798120	43405024	T	INTERGÊNICA	1,574	(1,278 - 1,94)	2,049e-05
62	2	rs75681688	202383927	A	ALS2CR11	2,623	(1,682 - 4,091)	2,111e-05
63	7	rs982947	28708856	C	CREB5	0,6451	(0,5271 - 0,7896)	2,122e-05
64	5	rs17341817	103579857	T	INTERGÊNICA	2,543	(1,654 - 3,911)	2,126e-05
65	5	rs11950703	103576747	T	INTERGÊNICA	2,543	(1,654 - 3,911)	2,126e-05
66	5	rs2162716	94762306	C	FAM81B	1,559	(1,27 - 1,913)	2,196e-05
67	4	rs12506762	173712840	T	GALNTL6	1,513	(1,25 - 1,833)	2,207e-05
68	1	rs3004245	9111626	A	SLC2A5	0,6425	(0,5237 - 0,7882)	2,215e-05
69	20	rs6046176	19532518	C	SLC24A3	1,665	(1,315 - 2,11)	2,378e-05
70	4	rs7655284	105869702	G	INTERGÊNICA	1,517	(1,25 - 1,841)	2,438e-05
71	10	rs1244480	7870324	T	TAF3	1,515	(1,249 - 1,837)	2,439e-05
72	9	rs11140831	87647454	G	INTERGÊNICA	0,6083	(0,4828 - 0,7663)	2,463e-05
73	3	rs74887681	52890196	T	TMEM110-MUSTN1	5,34	(2,448 - 11,65)	2,557e-05
74	2	rs114446331	43225774	C	INTERGÊNICA	3,541	(1,965 - 6,379)	2,567e-05
75	8	rs115506651	56047932	G	XKR4	3,407	(1,924 - 6,032)	2,616e-05
76	15	rs115302036	60183951	T	INTERGÊNICA	3,186	(1,856 - 5,468)	2,626e-05
77	11	rs7127256	90525490	A	INTERGÊNICA	1,507	(1,245 - 1,825)	2,652e-05
78	7	rs7780465	7076459	T	INTERGÊNICA	1,538	(1,258 - 1,881)	2,652e-05
79	13	rs56087514	27778960	C	INTERGÊNICA	0,6346	(0,5133 - 0,7846)	2,654e-05

**Continuação da tabela S1:**

80	1	rs80295800	235771726	G	GNG4	1,925	(1,418 - 2,614)	2,718e-05
81	9	rs424539	14442595	C	INTERGÊNICA	0,6509	(0,5323 - 0,7958)	2,833e-05
82	3	rs116448590	142841697	G	CHST2	5,27	(2,417 - 11,49)	2,929e-05
83	2	rs16986498	19665812	G	NA	0,4067	(0,2665 - 0,6204)	2,983e-05
84	9	rs7873362	74918896	T	NA	1,765	(1,352 - 2,306)	3,031e-05
85	7	rs6956273	63435537	T	NA	1,6	(1,283 - 1,995)	3,046e-05
86	14	rs1465118	68032874	A	PLEKHH1	1,508	(1,243 - 1,829)	3,074e-05
87	15	rs10518870	57017888	G	ZNF280D	0,5888	(0,459 - 0,7554)	3,085e-05
88	7	rs115972708	65372483	A	VKORC1L1	4,399	(2,187 - 8,85)	3,261e-05
89	5	rs73767458	82346803	A	NA	2,574	(1,648 - 4,022)	3,287e-05
90	6	rs9472022	43152573	G	CUL9	1,506	(1,241 - 1,828)	3,357e-05
91	10	rs79846008	128542978	A	LOC728065	2,679	(1,681 - 4,268)	3,368e-05
92	4	rs74426337	170929983	T	MFAP3L	3,031	(1,793 - 5,123)	3,477e-05
93	9	rs4419891	87609384	T	NTRK2	1,531	(1,251 - 1,872)	3,477e-05
94	4	rs77924825	170923535	C	MFAP3L	3,027	(1,791 - 5,118)	3,538e-05
95	8	rs2952238	10095328	A	MSRA	1,735	(1,336 - 2,253)	3,587e-05
96	3	rs76336861	45368350	G	NA	2,055	(1,46 - 2,892)	3,61e-05
97	20	rs529058	926945	A	NA	2,098	(1,475 - 2,982)	3,678e-05
98	1	rs74081353	68544206	G	LOC100289178	2,02	(1,446 - 2,821)	3,696e-05
99	3	rs9867680	45361222	T	NA	2,046	(1,455 - 2,878)	3,917e-05
100	6	rs6914964	43146387	G	SRF	1,615	(1,285 - 2,029)	3,927e-05



**Figura S1:** Análise de componentes principais na população SCAALA com todos os SNPs, para inferir estrutura populacional.

## Artigo 2

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO POR VARREDURA GENÔMICA SUGERE UMA ASSOCIAÇÃO DA REGIÃO 21q21 COM ATOPIA NUMA POPULACAO DE CRIANCAS NA AMERICA LATINA**

## RESUMO:

**Introdução:** Imunoglobulina-E alérgeno-específica tem um papel central na patogênese da atopia e, conseqüentemente no surgimento de doenças alérgicas. Nas últimas décadas a prevalência destas doenças aumentou nos países em desenvolvimento. Tornaram-se necessários mais estudos com novas abordagens analíticas na compreensão dos fatores que delineiam este desfecho.

**Objetivo:** Nosso objetivo foi identificar fatores de risco genéticos, através de uma análise de varredura genômica, envolvidos no desenvolvimento de atopia.

**Metodologia:** Um total de 1.878.141 SNPs foram testados para associação com atopia, definida como um aumento dos níveis séricos de IgE específica (>0,70 kU/L) numa população de 1248 crianças de Salvador, Brasil. **Resultados:**

Nenhum SNP teve significância estatística para varredura genômica ( $p < 10^{-8}$ ). Contudo dois SNPs apresentaram valores de  $p$  sugestivos ( $10^{-8} < p < 10^{-6}$ ), na região cromossômica 21q21, variante rs9981028 (OR: 2.73; 95%CI: 1.83-4.06; valor de  $p$ :  $8.59 \times 10^{-7}$ ) e rs9977241 (OR: 2.73; 95%CI: 1.83-4.06; valor de  $p$ :  $8.60 \times 10^{-7}$ ). Outras cinco regiões genômicas, 3q26, 5q34, 8q22, 1q42 e 9q21, mostraram uma associação mais fraca com atopia. Também demonstramos que 27% da atopia pode ser explicada por todos os SNPs simultaneamente.

**Conclusão:** Seis regiões genômicas demonstraram associação com atopia, entretanto nenhuma com nível de significância para varredura genômica. Sugerimos que novos estudos sejam realizados nestas regiões para melhor compreender suas relações causais com atopia em populações miscigenadas.

**Palavras chave:** GWAS, IgE, atopia, herdabilidade



## INTRODUÇÃO:

Atopia é uma tendência individual ou familiar a tornar-se sensibilizado e produzir anticorpos do tipo IgE em resposta a exposição primária a alérgenos comuns<sup>1</sup>. Em países desenvolvidos alergias e asma são associados com altos níveis de IgE, contudo, em países em desenvolvimento esta associação é mais recente<sup>2</sup>. De acordo com a hipótese da higiene, o aumento dos níveis plasmáticos de IgE pode ser devido à redução das infecções durante a infância, modulando a resposta imunológica de T<sub>H</sub>1 para T<sub>H</sub>2<sup>3</sup>. Contudo esta hipótese não se aplica a populações com alta carga de infecções helmínticas, como as de regiões pobres da América Latina<sup>4</sup>.

A atopia é uma condição que pode ser considerada complexa e os fatores de risco genético que levam à desregulação dos níveis de IgE têm sido estudados<sup>5</sup>, mas os resultados existentes até o momento são inconclusivos<sup>6</sup>. Estudos em famílias e em gêmeos têm demonstrado que o aumento dos níveis séricos de IgE é fortemente influenciado por determinantes genéticos familiares<sup>7; 8</sup>.

Muitos estudos de associação de genes candidatos para os níveis totais de IgE no soro têm demonstrado associação de diversos polimorfismos em regiões genéticas relacionadas com rotas biológicas dependentes de células T<sub>H</sub>2. Porém muitos destes são réplicas de pesquisas anteriores, que direcionavam para onde os novos estudos deveriam ser focados. Neste contexto, os estudos de associação por varredura genômica (*Genome Wide Association Studies* - GWAS) apareceram como uma alternativa aos estudos genéticos clássicos, na tentativa de sugerir novas associações potencialmente causais para doenças complexas em geral<sup>9</sup>. Até o momento, poucos GWAs foram realizados para IgE, sendo que a maioria deles foram direcionados para os níveis de IgE totais<sup>10</sup> e apenas dois deles trabalharam com níveis de IgE específica<sup>11; 12</sup>.

O objetivo deste trabalho foi explorar possíveis efeitos de fatores genéticos na ocorrência da atopia. Além disso, busca-se ainda, através da análise um painel com alta densidade de polimorfismos genéticos do genoma humano, susceptíveis a níveis elevados de IgE específica, estimar efeitos genéticos, ainda que pequenos, e inferir possíveis rotas metabólicas associadas a atopia.

## **METODOLOGIA:**

### ***Desenho do estudo e as características da população:***

Os dados analisados aqui sobre atopia e genética foram coletados em um único momento, como parte do projeto de “*Social Changes, Asthma and Allergy in Latin America (SCAALA)*”<sup>13</sup>. Nesta análise, a população consistiu de 1.245 crianças, com idade entre 4 e 12 anos, aleatoriamente selecionadas em diferentes zonas sanitárias na periferia da cidade de Salvador – Bahia. Uma cidade com mais de 2,6 milhões de habitantes, cuja maioria, 80% da população, se declara preta ou parda<sup>14</sup>. Portanto, este foi um estudo pioneiro em compreender a atopia por técnicas de varredura genômica numa população altamente miscigenada. O projeto foi aprovado pelos comitês de ética da Universidade Federal da Bahia; registro CEP: 003-05/CEP-ISC e Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), resolução número 15.895/2011.

### ***Coleta de dados e definição de atopia:***

O questionário, baseado na segunda fase do estudo ISAAC<sup>15</sup>, com questões centrais sobre os sintomas da asma e traduzido para o português do Brasil, foi aplicado durante visitas domiciliares por entrevistadores treinados. As entrevistas foram realizadas com a família da criança ou cuidador com informação sobre os sinais e sintomas compatíveis com asma e alergias, além de seus fatores de risco. Atopia foi definida como a presença de nível sérico de anti-IgE de 0,70 kU/L ou maior para pelo menos um dos aeroalergênicos<sup>16</sup>.

A presença de IgE específica contra aeroalergênicos (sIgE) foi mensurada para quatro alergênicos: *Dermatophagoides pteronissynus*, *Blomia tropicalis*, *Periplaneta americana* e *Blattella Germanica*, com o kit ImmunoCAP system IgE (Phadia, Uppsala, Swedan).

### ***Genotipagem e controle de qualidade:***

A genotipagem da população SCAALA foi realizada com o painel comercial *Illumina HumanOmni2.5-8 Kit BeadChip* ([www.illumina.com](http://www.illumina.com)), no qual sessenta e

dois indivíduos foram removidos pelo grau de parentesco determinado pela estimativa da identidade por descendência (*Identical By Decendent* - IBD); quinze, pela baixa taxa de eficiência da genotipagem (*call rate*), inferior a 0,98; e três, pela taxa de heterozigose ( $|z\text{-score}| > 5$ ).

Os SNPs foram excluídos por desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg com valor de  $p$  inferior a  $10^{-4}$ , perdas genóticas superiores a 10% e alelo de menor frequência (Minor Allele Frequency – MAF) inferior a 1%<sup>17</sup>.

### **Análise Estatística:**

**Associação por varredura genômica:** A Regressão logística foi utilizada para examinar a associação, assumindo um modelo aditivo para a doença. Considerou-se uma associação sugestiva quando o valor de  $p$  foi entre  $10^{-6}$  e  $10^{-8}$  e realmente associados quando o valor de  $p$  foi inferior a  $10^{-8}$ . A análise de Componente Principal foi realizada para controlar o confundimento, além do cálculo do fator de inflação genômico ( $\lambda$ ), com a função de visualizar e evitar estatísticas de teste inflacionadas nos resultados<sup>18</sup>.

**Estimação da Herdabilidade:** A proporção da variância fenotípica explicada pela variância genômica foi estimada como ( $V_g/V_p$ ) onde  $V_g$  é o componente de variação atribuível à variação genética de todos os SNPs genotipados e  $V_p$  é a variância total fenotípica observada. Utilizou-se o pacote de software GCTA, que usa dados de variantes do genoma para estimar relações genéticas aditivas (correlações) entre indivíduos essencialmente não relacionados. Este método permite ajustar o efeito de todos os SNPs como um efeito aleatório por um Modelo Linear Misto - MLM<sup>19</sup>.

**Análise de enriquecimento baseada num conjunto definido de genes:** Primeiramente foi realizada uma análise de agregação baseada no desequilíbrio de ligação, para identificar uma lista de regiões genicas associadas ao desfecho (parâmetros = clump-p1 = 0.005; clump-p2 = 0.05; clump-r2 = 0.5; clump-kb = 250). Em seguida foram definidas regiões a 20kb up/downstream dos sítios de início e final da transcrição para 17.529 genes nos cromossomos autossômicos, de acordo com o banco de dados público de genes catalogados, GRCh37/hg19<sup>21</sup>. A análise de enriquecimento baseada no programa INRICH<sup>20</sup> é constituída

de duas etapas. Na primeira etapa é contabilizado o número de vezes que os intervalos genômicos, identificados a priori, englobam um conjunto de genes pré-determinados. Uma segunda etapa é realizada para corrigir a taxa de falso-positivos, através de um procedimento permutacional baseado em um certo número de repetições de forma a obter um valor de  $p$  empírico representando a proporção de vezes que este intervalo genômico engloba um determinado gene.

## RESULTADOS:

Das 1245 crianças estudadas, 477 (38%) apresentavam atopia. Após o ajuste pela PCA para ancestralidade, o fator de inflação genômica ( $\lambda$ ) foi de 1,03, indicando uma baixa possibilidade de associações falso-positivas resultantes da estratificação populacional. Nenhum SNP teve significância em termos de varredura genômica ( $p < 10^{-8}$ ). Entretanto, 8 SNPs apresentaram valores de  $p$  sugestivos ( $10^{-8} < p < 10^{-6}$ ). Os SNPs mais fortemente associados encontram-se na região cromossômica 21q21 (figura 1), variante rs9981028 (OR: 2.73; 95%CI: 1.83-4.06; valor de  $p$ :  $8.59 \times 10^{-7}$ ) e rs9977241 (OR: 2.73; 95%CI: 1.83-4.06; valor de  $p$ :  $8.60 \times 10^{-7}$ ), numa região intergênica pobre em genes, onde o mais próximo é *TNPRSS15* (*transmembrane protease, serine 15*). Em seguida, a região cromossômica mais associada a atopia foi 3q26, variante rs9836306 (OR: 0,58; 95%CI: 0.47-0.73; valor de  $p$ :  $1.66 \times 10^{-6}$ ), flanqueando o gene *PSAT1P4* (*phosphoserine aminotransferase 1 pseudogene 4*). A tabela 1 relaciona os 20 SNPs mais associados com atopia, com informação do cromossomo, gene, posição (bp), alelo de risco, razão de chances (OR), intervalo de confiança de 95% e valor de  $p$ . O gráfico quantil-quantil (*QQ-plot*), comparando valores de  $p$  observados na associação genotípica aditiva com os resultados esperados numa distribuição nula, não evidenciaram uma associação forte (figura 2). As informações das regiões genômicas a qual pertence os SNPs mais associados e o desequilíbrio de ligação com SNPs vizinhos foram demonstrados na figura 3.

### **A proporção da variância fenotípica explicada pelo genoma:**

Observou-se que até 22,7% dos sintomas de atopia puderam ser explicados pelo genoma (SE: 0,22; valor  $p$ : 0.025). O teste de variância para os SNPs mais associados não foi realizado por considerar-se que não houve uma forte associação.

**Análise de enriquecimento:** 13 rotas metabólicas apresentaram valores de  $p$  empírico inferior a 0,05, sendo que a rota da membrana do endossomo precoce (*Early endosome membrane*) tinha um valor de  $p$  empírico inferior a  $10^{-4}$ : (GO:0031901,  $p$ -empírico:  $3,9 \times 10^{-4}$ ). No entanto, esta rota perdeu significância estatística após correção para múltiplos testes (tabela 2).

## **DISCUSSÃO:**

Uma análise genética em larga escala e exploratória foi conduzida numa coorte brasileira com tradição em estudos de asma e atopia. Nesta, 477 crianças de um total de 1245 tiveram os níveis plasmáticos de IgE específica elevados, para, pelo menos, um dos quatro aeroalergênicos testados. Apesar de não ter sido identificado nenhum loci com forte evidência de associação com atopia num nível de significância para varredura genômica, os resultados sugerem que a região 21q21 pode estar envolvida com mecanismos patofisiológicos da atopia.

A região 21q21 já foi associada à dermatite atópica num estudo de famílias (*linkage*) na população sueca<sup>22</sup>, reatividade a pólen sazonal numa população de diferentes origens étnicas dos EUA<sup>23</sup>, contudo os autores acreditam que esta associação tenha uma importante étno-especificidade, já que a região 21q21 se apresentou mais fortemente associada a reatividade ao polén em norte-americanos de origem hispânica. De certa forma, isto corrobora com este estudo, cuja população também é altamente miscigenada. Num outro estudo de expressão do gene *MIR-155*, nesta mesma região, foi demonstrado que este gene estava associado com o aumento da resposta de células pró-inflamatórias em pacientes com dermatite atópica<sup>24</sup>.

Outras cinco regiões apresentaram resultados discretos para associação com atopia e foram representadas na figura 3: a) um SNP numa região cromossômica intergênica 3q26, ainda não associada com atopia; b) região 5q34, já conhecida por apresentar genes responsáveis pela produção de citocinas como IL-4, IL-13, IL-5 e IL3, importantes na modulação das respostas alérgicas<sup>25</sup>; c) a região 8q22, já associada à atopia num estudo de GWAS<sup>11</sup>; d) a região 17q21 foi muito bem descrita por sua associação com asma<sup>26</sup>, entretanto, apesar de sua falta de associação com atopia, ela segue associada com algumas doenças alérgicas<sup>27</sup>;

<sup>28</sup>; e) por fim, há uma associação discreta na região 9q21, já associada à asma numa população de crianças mexicana<sup>29</sup>.

Este é o primeiro estudo de GWAS a apresentar uma análise de herdabilidade para atopia numa população não parental, pois até o presente momento todas as publicações com análise de herdabilidade foram realizadas em núcleos familiares. Quanto à interpretação dos resultados para herdabilidade, é necessário ter cautela quanto à comparação com outros achados, pois há muita discrepância entre as publicações. Em geral, os estudos de núcleos familiares com IgE específica para diferentes alérgenos apresentam uma herdabilidade elevada<sup>30</sup>, porém não tão elevada se comparada, por exemplo, a alta herdabilidade da asma<sup>31</sup>. Tais resultados são compatíveis com os gerados por este estudo, apesar de que as associações encontradas neste estudo apresentaram valores de herdabilidade inferiores aos estudos familiares. Esta característica pode ser explicada por diferentes vertentes, desde diferença nos níveis séricos de IgE adotado por diferentes estudos, diferenças da especificidade que podem ativar genes diferentes e o fato de que há ainda alguns autores que defendem que estudos com gêmeos podem superestimar a herdabilidade<sup>32</sup>.

O presente estudo possui limitações de poder e, possivelmente, isto pode ter influenciado o encontro de associações fracas entre os SNPs e atopia. Esperava-se superar esta limitação com a análise de enriquecimento, contudo acredita-se que qualquer estudo que tente estabelecer rotas metabólicas a partir de dados de GWAs está previamente limitado pelo amplo desconhecimento das funções dos genes humanos encontrados nos estudos de GWAs. Serão necessários mais alguns anos de estudos destes novos genes para inseri-los num contexto de rotas metabólicas conhecidas.

Por fim, sugere-se que a região 21q21 está associada à atopia e que o genoma humano explica até 22,7% deste fenótipo nesta população. Supõe-se que outros fatores, como os ambientais e mecanismos epigenéticos, contribuam de maneira expressiva para o desenvolvimento da atopia.

## REFERÊNCIAS

- 1 JOHANSSON, S. G. O. *et al.* Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 113, n. 5, p. 832-836, May 2004.
- 2 COOPER, P. J. *et al.* Asthma in Latin America: a public health challenge and research opportunity. **Allergy**, v. 64, n. 1, p. 5-17, Jan 2009.
- 3 YAZDANBAKHSH, M.; KREMSNER, P. G.; VAN REE, R. Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. **Science**, v. 296, n. 5567, p. 490-4, Apr 19 2002.
- 4 FIGUEIREDO, C. A. *et al.* Coassociations between IL10 polymorphisms, IL-10 production, helminth infection, and asthma/wheeze in an urban tropical population in Brazil. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 131, n. 6, p. 1683-1690, Jun 2013.
- 5 GRANADA, M. *et al.* A genome-wide association study of plasma total IgE concentrations in the Framingham Heart Study. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 129, n. 3, p. 840-U371, Mar 2012.
- 6 LIAO, M. *et al.* Genome-wide scan on total serum IgE levels identifies no common variants in a healthy Chinese male population. **Immunogenetics**, v. 65, n. 8, p. 561-568, Aug 2013.
- 7 JACOBSEN, H. P. *et al.* IgE in unselected like-sexed monozygotic and dizygotic twins at birth and at 6 to 9 years of age: High but dissimilar genetic influence on IgE levels. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 107, n. 4, p. 659-663, Apr 2001.
- 8 THOMSEN, S. F. *et al.* Findings on the atopic triad from a Danish twin registry. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 10, n. 11, p. 1268-1272, Nov 2006.
- 9 MCCARTHY, M. I. *et al.* Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges. **Nat Rev Genet**, v. 9, n. 5, p. 356-69, May 2008.
- 10 LEVIN, A. M. *et al.* A meta-analysis of genome-wide association studies for serum total IgE in diverse study populations. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 131, n. 4, p. 1176-1184, Apr 2013.
- 11 WAN, Y. Z. I. *et al.* A genome-wide association study to identify genetic determinants of atopy in subjects from the United Kingdom. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 127, n. 1, p. 223-U358, Jan 2011.

- 12 KIM, J. H. *et al.* A Genome-Wide Association Study of Total Serum and Mite-Specific IgEs in Asthma Patients. **Plos One**, v. 8, n. 8, Aug 13 2013.
- 13 BARRETO, M. L. *et al.* 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 Pulm Med**, v. 6, p. 15, 2006.
- 14 IBGE. Instituto Brasileiro de geografia e Estatística - Sistema SIDRA. 2014. Disponível em: <  
<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?z=cd&o=4&i=P&c=3145>>. Acesso em: 01/04/2014.
- 15 ASHER, M. I. *et al.* International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC): rationale and methods. **Eur Respir J**, v. 8, n. 3, p. 483-91, Mar 1995.
- 16 ALCANTARA-NEVES, N. M. *et al.* The effect of single and multiple infections on atopy and wheezing in children. **J Allergy Clin Immunol**, v. 129, n. 2, p. 359-67, 367 e1-3, Feb 2012.
- 17 LAURIE, C. C. *et al.* Quality control and quality assurance in genotypic data for genome-wide association studies. **Genet Epidemiol**, v. 34, n. 6, p. 591-602, Sep 2010.
- 18 PRICE, A. L. *et al.* Principal components analysis corrects for stratification in genome-wide association studies. **Nat Genet**, v. 38, n. 8, p. 904-9, Aug 2006.
- 19 YANG, J. *et al.* Common SNPs explain a large proportion of the heritability for human height. **Nat Genet**, v. 42, n. 7, p. 565-9, Jul 2010.
- 20 LEE, P. H. *et al.* Multi-locus genome-wide association analysis supports the role of glutamatergic synaptic transmission in the etiology of major depressive disorder. **Transl Psychiatry**, v. 2, p. e184, 2012.
- 21 DRESZER, T. R. *et al.* The UCSC Genome Browser database: extensions and updates 2011. **Nucleic acids research**, v. 40, n. D1, p. D918-D923, 2012.
- 22 BU, L. M. *et al.* Susceptibility loci for atopic dermatitis on chromosome 21 in a Swedish population. **Allergy**, v. 61, n. 5, p. 617-21, May 2006.
- 23 BLUMENTHAL, M. N. *et al.* A genome-wide search for quantitative trait loci contributing to variation in seasonal pollen reactivity. **J Allergy Clin Immunol**, v. 117, n. 1, p. 79-85, Jan 2006.
- 24 SONKOLY, E. *et al.* MiR-155 is overexpressed in patients with atopic dermatitis and modulates T-cell proliferative responses by targeting



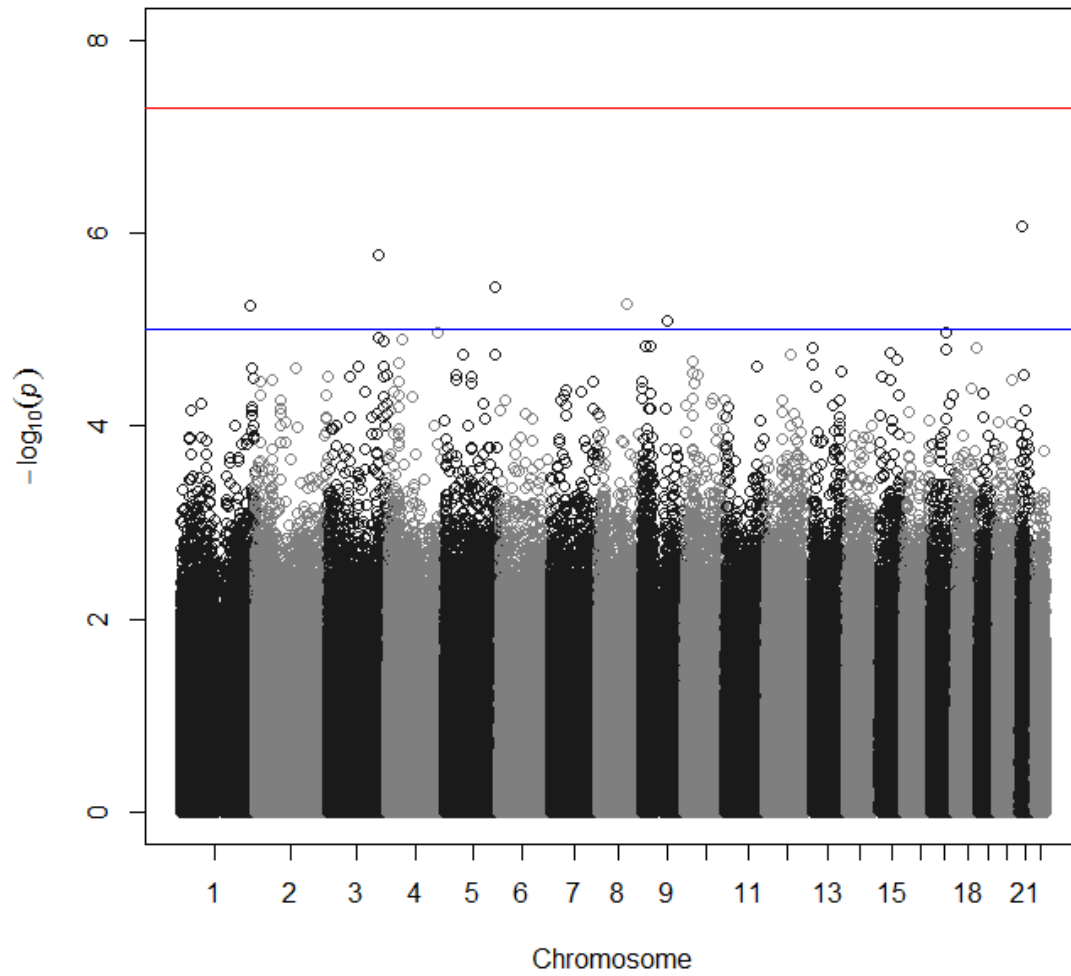
- cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 126, n. 3, p. 581-U306, Sep 2010.
- 25 D'SILVA, I.; MINE, Y. Genomics and proteomics in allergy. **Nutrigenomics and Proteomics in Health and Disease**, p. 67, 2009.
- 26 MOFFATT, M. F. *et al.* Genetic variants regulating ORMDL3 expression contribute to the risk of childhood asthma. **Nature**, v. 448, n. 7152, p. 470-3, Jul 26 2007.
- 27 LEUNG, T. F. *et al.* Asthma and atopy are associated with chromosome 17q21 markers in Chinese children. **Allergy**, v. 64, n. 4, p. 621-8, Apr 2009.
- 28 TOMITA, K. *et al.* Variants in the 17q21 asthma susceptibility locus are associated with allergic rhinitis in the Japanese population. **Allergy**, v. 68, n. 1, p. 92-100, Jan 2013.
- 29 HANCOCK, D. B. *et al.* Genome-wide association study implicates chromosome 9q21.31 as a susceptibility locus for asthma in mexican children. **PLoS Genet**, v. 5, n. 8, p. e1000623, Aug 2009.
- 30 OBER, C.; YAO, T. C. The genetics of asthma and allergic disease: a 21st century perspective. **Immunological Reviews**, v. 242, p. 10-30, Jul 2011.
- 31 MCGEACHIE, M. J. *et al.* Polygenic heritability estimates in pharmacogenetics: focus on asthma and related phenotypes. **Pharmacogenet Genomics**, v. 23, n. 6, p. 324-8, Jun 2013.
- 32 CONLEY, D. *et al.* Heritability and the Equal Environments Assumption: Evidence from Multiple Samples of Misclassified Twins. **Behavior Genetics**, v. 43, n. 5, p. 415-426, Sep 2013.

**Tabela 1:** Fatores associados a atopia, identificados por regressão logística e corrigidos pela estratificação populacional.

<i>Rank</i>	<i>Cromossomo</i>	<i>SNP</i>	<i>Posição (bp)</i>	<i>Alelo de risco</i>	<i>gene</i>	<i>Odds Ratio</i>	<i>IC (95%)</i>	<i>P</i>
1	21	<b>rs9981028</b>	20666325	C	Intergênica	<b>2,727</b>	(1,829 - 4,066)	<b>8.59e-07</b>
2	21	<b>rs9977241</b>	20644129	A	Intergênica	<b>2,727</b>	(1,829 - 4,066)	<b>8.602e-07</b>
3	3	rs9836306	166322997	C	Intergênica	0,5837	(0,4683 - 0,727)	1.665e-06
4	5	rs10434667	168067121	C	Intergênica	0,4552	(0,326 - 0,635)	3.621e-06
5	5	rs12517164	168088162	T	Intergênica	0,4552	(0,326 - 0,635)	3.624e-06
6	8	rs2977676	92972780	C	RUNX1T1	1,557	(1,286 - 1,885)	5.502e-06
7	1	rs28359632	230898486	A	CAPN9	4,313	(2,295 - 8,107)	5.61e-06
8	9	rs12001272	81738012	G	Intergênica	0,5616	(0,435 - 0,723)	8.281e-06
9	4	rs78454058	164923413	C	MARCH1	0,3599	(0,228 - 0,567)	1.083e-05
10	17	rs11654352	48307665	T	Intergênica	1,765	(1,37 - 2,274)	1.096e-05
11	3	rs6767533	166320888	C	Intergênica	0,6366	(0,52 - 0,779)	1.213e-05
12	4	rs114311534	47525088	A	Intergênica	3,494	(1,992 - 6,128)	1.274e-05
13	3	rs113614640	184248138	C	Intergênica	1,687	(1,333 - 2,134)	1.3e-05
14	9	rs1220090	25787040	A	Intergênica	1,47	(1,235 - 1,75)	1.458e-05
15	9	rs7866000	12793817	T	C9orf150	1,657	(1,318 - 2,082)	1.476e-05
16	13	rs647862	21830400	T	Intergênica	0,6668	(0,554 - 0,801)	1.558e-05
17	17	rs2103273	48290686	T	Intergênica	1,733	(1,35 - 2,226)	1.575e-05
18	15	rs2172607	57832104	C	CGNL1	1,541	(1,265 - 1,877)	1.608e-05
19	5	rs723852	57430832	T	Intergênica	0,6342	(0,515 - 0,780)	1.748e-05
20	12	rs58277973	83553423	A	Intergênica	0,6045	(0,480 - 0,7609)	1.781e-05

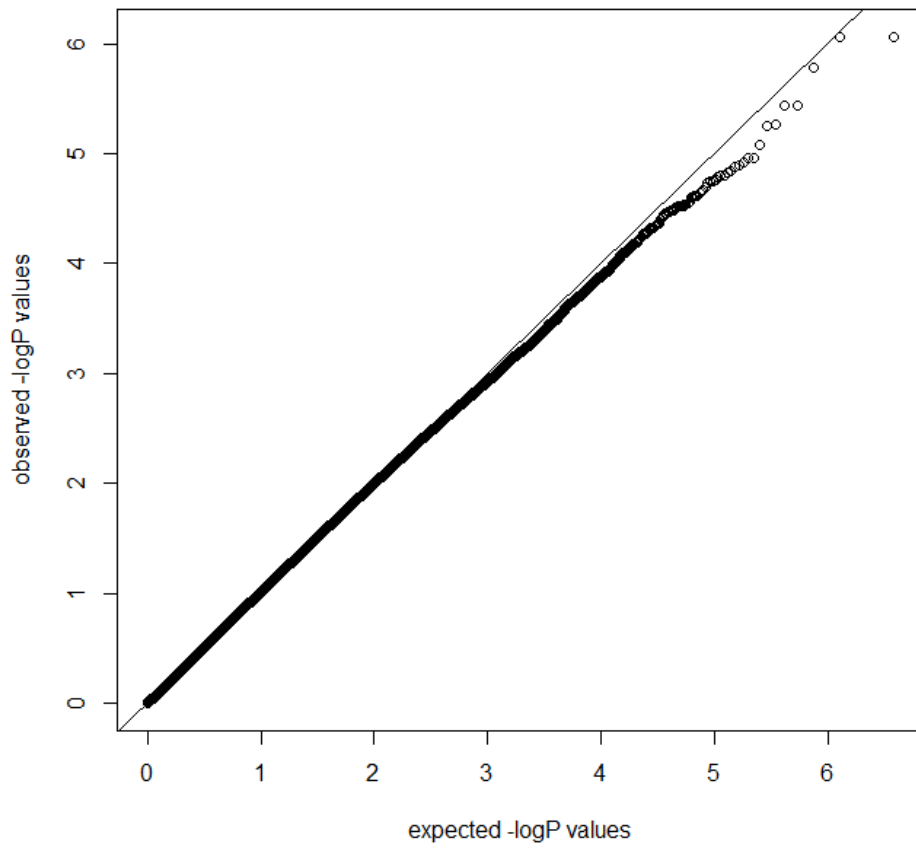
**Tabela 2:** Análise de rotas metabólicas para atópia.

<b>Rota Metabólica</b>	<b>Total de genes no intervalo</b>	<b>Nº de Genes associados no intervalo</b>	<b>Genes</b>	<b>p-empírico</b>	<b>p-corrigido</b>
GO:0031901: early endosome membrane	38	3	<i>EEA1</i> (chr12), <i>SH3GL3</i> (15), <i>APPL2</i> (chr12)	0.00039992	0.328671
GO:0005680: anaphase-promoting complex	21	2	<i>HERC2</i> (chr15), <i>CDC16</i> (chr13)	0.00179964	0.62038
GO:0050730: regulation of peptidyl-tyrosine phosphorylation	9	2	<i>PDGFD</i> (chr11), <i>PRKCA</i> (chr17)	0.00319936	0.758242
GO:0030170: pyridoxal phosphate binding	52	2	<i>AGXT2</i> (chr5), <i>SCLY</i> (chr2)	0.00679864	0.913087
GO:0016601: Rac protein signal transduction	9	2	<i>FARP2</i> (chr2), <i>ELMO1</i> (chr7)	0.00739852	0.922078
GO:0005085: guanyl-nucleotide exchange factor activity	116	3	<i>FARP2</i> (chr2), <i>HERC2</i> (chr15), <i>DOCK8</i> (chr9)	0.0325935	0.997003
GO:0020037: heme binding	114	2	<i>HERC2</i> (chr15), <i>TBXAS1</i> (chr7)	0.0333933	0.998002



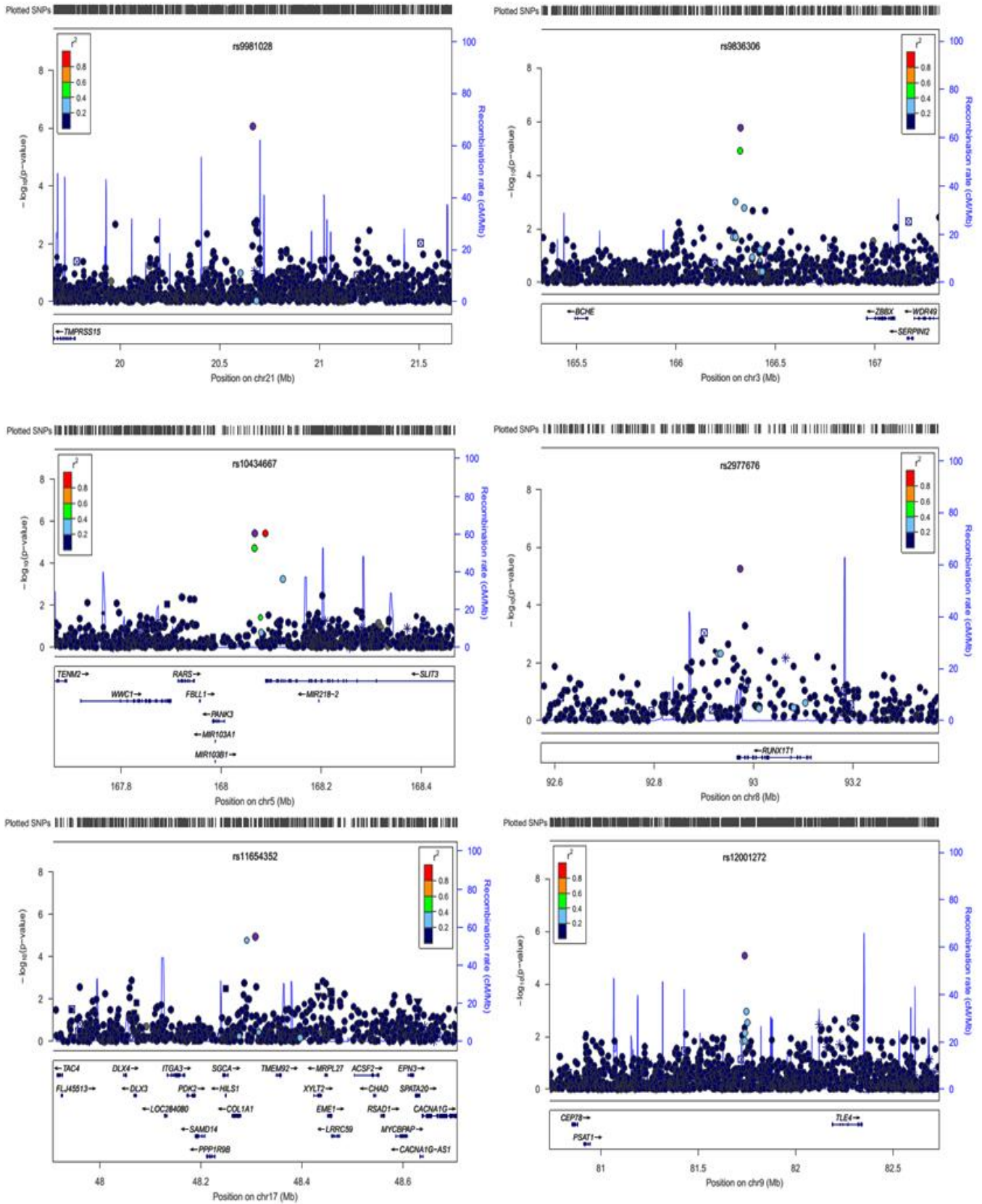
**Figura 1:** *Manhattan plot* para atopia, ajustada pela estratificação populacional.

- Linha vermelha indica associação verdadeira.
- Linha azul indica associação sugestiva.



**Figura 2:** *QQ-plot* para atopia

**Figura 3:** Regional plot para as regiões genômicas mais associadas com atopia.



## **Artigo 3**

**EFEITO DE VARIAÇÕES GENÉTICAS NO CROMOSSOMO 17q21 EM SINTOMAS DE ASMA EM CRIANÇAS: INTERAÇÃO COM A SOROPOSITIVIDADE PARA O VÍRUS DA VARICELA ZOSTER E A EXPOSIÇÃO AO TABAGISMO DOS PAIS.**

## RESUMO

**Introdução:** A asma é uma doença inflamatória crônica de relevância para a saúde pública mundial, que é influenciada por fatores ambientais e genéticos. No contexto genético, o cromossomo 17q21, tem demonstrado ser a região de risco mais consistente para a asma. O efeito das variantes do locus 17q21 na asma infantil foi identificado pela primeira vez em um estudo de varredura genômica. Desde então, esses resultados foram replicados em alguns estudos, realizados em diferentes populações, mas não na América do Sul. Esta é um estudo transversal, com o objetivo de confirmar o papel das variantes 17q21 nos sintomas de asma infantil e foi realizado em uma coorte de 1.319 crianças (1.019 não asmáticas e 300 asmáticas) que vivem em um grande centro urbano brasileiro. **Metodologia:** Os dados sobre os sintomas de asma e potenciais fatores de confusão foram coletados por meio de questionário. Dados sobre atopia [IgE específica contra aeroalérgenos (IgE específica) nível de 0,70 kU /L ou superior] e exposição ao vírus (vírus da *Varicela zoster*) foram coletados por meio de exames específicos. Os sintomas de asma foram classificados em atópicos e não-atópicos. 277 marcadores de ancestralidade (MIA) distribuídos pelo genoma e 18 polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), na região 17q21, foram genotipados utilizando o reagente ILMN-HumanHap-650Y BeadChips. **Resultados:** Quatro variantes (rs54378650, rs4795402, rs3859192, rs11650680) descritas em estudos anteriores, e um novo SNP (rs7224129), foram identificados como associados aos sintomas de asma na infância. Dentre estes, rs54378650 mostrou ter uma associação mais consistente em diferentes modelos genéticos (OR: 1,70; IC 95%: 1,15 - 2,51; p = 0,01). Na análise estratificada por atopia, cinco variantes (rs7224129, rs4795402, rs3859192, rs1008723 e rs12603332) foram associadas com a asma atópica, e nenhum com asma não atópica. Encontramos interação significativa com o tabagismo dos pais (rs3859192, p = 0,005 e rs8077456, p = 0,03) e soropositividade para *Varicela zoster* (rs4378650, p = 0,004 e rs4795405, p = 0,013). **Conclusão:** foi confirmada a associação entre asma e as variantes na região 17q21, mas não com asma não-atópica, além de identificamos uma interação significativa com o tabagismo dos pais e soropositividade para o vírus da *Varicela zoster*.

**Palavras-chave:** Asma, atopia, 17q21, *Varicela zoster* e tabagismo dos pais.



## INTRODUÇÃO:

A asma é um grupo heterogêneo de condições que resultam numa obstrução brônquica recorrente e reversível<sup>1</sup> com grande importância para a saúde pública. Observações recentes mostraram que sua prevalência continua aumentando em todo o mundo e, enquanto as suas causas continuam mal compreendidas, é provável que incluam mudanças nos fatores sociais e ambientais, como a poluição, dieta e alérgenos<sup>2</sup>; <sup>3</sup> e também fatores genéticos.

Em epidemiologia genética, a introdução dos estudos de associação por varredura genômica (GWAS), sem hipótese, melhorou a previsão de doenças comuns, no entanto, é necessária a confirmação destes resultados para melhor inferência de causalidade. Em geral, a abordagem mais amplamente utilizada para confirmar uma associação é a de estudos de genes candidatos (orientada por hipótese). O primeiro GWAS em asma identificou diversos marcadores no braço longo do cromossoma 17 com variantes que são comuns. Estas variantes parecem contribuir para uma proporção de casos de asma em crianças em estudos populacionais<sup>4</sup>. A hipótese é que esta região está associada com a expressão da proteína Orosomucóide 1-3 (ORMDL3), proteína transmembranar localizada no retículo endoplasmático e composta por 153 aminoácidos com dois domínios transmembranares<sup>5</sup>. Pesquisas mais recentes foram capazes de identificar três caminhos possíveis, nos quais o gene *ORMDL3* está envolvido: o primeiro, de regulação de uma sinalização de cálcio<sup>6</sup>; o segundo, ele media a homeostasia de esfingolipídios<sup>7</sup>, e o terceiro, pode induzir genes importantes na patogênese da asma, como Oligoadenilato sintetase (OEA), um importante regulador antiviral<sup>8</sup>.

Até agora, as evidências disponíveis não são suficientes para identificar claramente diferentes fenótipos de asma associados com os marcadores nesta região. Embora os estudos de associação com asma em crianças envolvendo a região 17q21 têm sido replicados em populações brancas europeias<sup>9</sup>, norte-americanas<sup>10</sup>, latino-americanas (mexicanos e porto-riquenhos)<sup>11</sup> e japonesas<sup>12</sup>, dois outros estudos entre os afro-americanos mostraram resultados divergentes no que se refere a esta associação<sup>11</sup>; <sup>13</sup>. Os efeitos são consistentes com asma

de início precoce (antes de três ou quatro anos de idade), e também com a gravidade e as exacerbações<sup>14</sup>, contudo nenhum efeito foi encontrado na asma de início tardio<sup>15</sup>. Embora o efeito esteja presente na asma atópica, parece haver pouca ou nenhuma associação com atopia<sup>16</sup>. Diferente das populações de países desenvolvidos, nos países em desenvolvimento há um predomínio de asma não atópica<sup>17</sup>. Um recente estudo entre as crianças urbanas brasileiras mostrou que apenas 24,5% de toda a asma em crianças foi atribuída a alergia<sup>18</sup> e há cada vez mais evidências de que os fatores de risco associados com asma atópica e com asma não atópica são distintos<sup>2; 19</sup>.

Estudos de interação gene-ambiente na asma sugerem que as infecções virais<sup>20</sup> e exposição ao tabaco<sup>10; 20</sup> aumentam o risco de asma na presença de polimorfismos na região 17q21. De certa forma, isto reforça a ideia de que infecções virais do trato respiratório inferior podem ter um papel importante sobre a ocorrência e exacerbação da asma<sup>21</sup>. Os estudos de associação de arquitetura genética e doenças complexas foram realizados predominantemente em populações de origem europeia<sup>22</sup>, cujos fenótipos de asma diferem dos apresentados nas populações latino-americanas, portanto, é possível que a integração entre a base genética de populações e estes fatores ambientais seja diferente daqueles apresentados em populações europeias. O presente estudo teve como objetivo confirmar o papel das variantes genéticas (e genes correspondentes) da região 17q21 nos sintomas de asma na infância, em uma população urbana de crianças latino-americanas, e explorar as interações com atopia e outras exposições, selecionadas pela sua relevância.

## **MATERIAL E MÉTODOS :**

### ***Desenho do estudo e as características da população:***

Este é um estudo de genes candidatos, explorando a associação entre as variantes genéticas identificadas num estudo-chave de GWAS para asma<sup>4</sup> e sintomas de asma e atopia entre crianças de um centro urbano brasileiro. A população era uma parte de um estudo de coorte observacional originalmente criado para avaliar o impacto do saneamento em diarreia no período de 1996 a 2004. Os dados analisados aqui, sobre os sintomas de asma, atopia e genética

foram coletados em um único momento, em 2005, quando as crianças tinham entre 4 e 12 anos de idade. O projeto original do grupo e a coleta de dados sobre a asma e atopia foram descritos em outra publicação<sup>23</sup>. A população desta análise consistiu de 1.445 crianças residentes na cidade de Salvador, Brasil. As aprovações éticas para o estudo foram obtidas através da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP, números de resolução 15.895/2011, Brasília) e o termo de consentimento foi obtido do responsável legal de cada criança.

### **Coleta de dados:**

As informações a respeito da presença de sibilância e fatores de risco para sibilância foram coletadas por meio de um questionário da fase II do Estudo Internacional de Asma e Alergias na Infância (ISAAC), adaptado para o português<sup>24</sup>. A presença de fumantes em casa foi investigada pelas seguintes questões: “A mãe da criança fuma atualmente?”; “A mãe fumou durante a gravidez?”; “A mãe fumou durante o primeiro ano de vida da criança?”; “Qualquer outra pessoa, que não a mãe, fuma atualmente dentro do ambiente doméstico?”.

A presença de ovos de helmintos (*A. lumbricoides* e *T. trichiura*) foi detectada por um exame de fezes utilizando a técnica de sedimentação e/ou Kato-Katz. De acordo com a presença de nenhuma, uma ou ambas as infecções por helmintos, classificamos como negativo, infecção única (positivo para um único verme) e co-infectado (positivo para ambos os vermes)<sup>25</sup>, respectivamente. O sangue foi colhido e armazenado a -20°C. A presença de IgE específica contra aeroalérgenos (sIgE) foi medido para 4 alérgenos, *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Blomia tropicalis*, *Periplaneta americana* e *Blattella germanica*, com o Pharmacia ImmunoCAP System IgE FEIA (Pharmacia, Uppsala, Sweden), de acordo com as instruções do fabricante. A exposição aos vírus foi determinada pela presença de IgG no soro específico para os vírus da hepatite A, vírus *Herpes simplex*, *Varicela zoster* (VZV) e vírus de *Epstein-Barr*<sup>26</sup>.

### **Definição de sintomas de asma e atopia:**

Usamos duas diferentes definições para a asma extraídas do questionário ISAAC fase II. A primeira, chiado no peito, envolve o relato de sibilância nos

últimos 12 meses; a segunda, sintomas de asma, foi considerada por meio do relato de sibilância nos últimos 12 meses além de pelo menos um dos seguintes sintomas respiratórios: diagnóstico de asma, sibilância após exercício nos últimos 12 meses, quatro ou mais episódios de sibilância nos últimos 12 meses, acordar no meio da noite por causa de sibilos nos últimos 12 meses ou relato de asma alguma vez na vida. Também definimos asma pouco controlada como casos que possuam ao menos um dos seguintes sintomas nos últimos 12 meses:  $\geq 12$  episódios de sibilância; sibilância e falta de ar, resultando em dificuldade em falar; e  $>$  um dia de sono perturbado por semana devido à asma<sup>27</sup>. Todas as outras crianças foram classificadas como não sibilantes. Atopia foi definida como a presença de, pelo menos, um entre os quatro aeroalergénios anti-IgE no soro em nível de 0,70 kU/L ou superior.

#### ***Extração de DNA e genotipagem:***

Foram selecionados para a genotipagem 295 variantes genéticas, destes, 277 são marcadores informativos de ancestralidade (MIAs) e 18 na região 17q21. A seleção dos MIAs foi baseada na diferença de frequência alélica, acima de 50%, entre populações presentes nos projetos HGDP-CEPH e 1000 Genomes. Para isso, utilizamos o BeadChips ILMN-HumanHap-650Y, painel comercial padronizado e atualmente disponível pela empresa Illumina ([www.illumina.com](http://www.illumina.com)). A extração de DNA foi realizada de acordo com o protocolo Gentra® Puregene® Blood Kit (Quiagen), utilizando o fluorómetro Qubit® (Invitrogen) para a quantificação.

#### ***Análise estatística:***

Testes de associação foram realizados de acordo com os modelos de herdabilidade genética (aditivo, dominante e recessivo) e sem um modelo definido de herdabilidade (*Odds Ratio* generalizada - ORG)<sup>28</sup>. Além disso, foi utilizado um processo computacionalmente intensivo com base em 1000 permutações para estimar a significância estatística de vários testes de correlação da análise de associação genética<sup>29</sup>. Também realizamos uma análise de regressão logística aplicada para os três modelos de herdabilidade e

ajustada por sexo, idade e os dois primeiros componentes principais da análise de ancestralidade para 277 MIAs em comum com as populações-teste do HapMAp (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>), e CEPH Stanford (<http://web.stanford.edu/group/rosenberglab/diversity.html>). A análise de componentes principais (PCA) foi utilizada para controlar o efeito de subpopulações no teste de associação e foi realizada pelo pacote estatístico SNPRelate<sup>30</sup>.

Finalmente, examinamos se houve uma interação entre as variantes significativas e três grupos de fatores: o estado de infecção (positivo/negativo) para cada uma das quatro infecções virais individualmente, estado de infecção parasitária e tabagismo. Testamos estas co-variáveis dentro de um modelo de interação multiplicativa em PLINK [ $Y = \beta_0 + (\beta_1.VARIANTE) + (\beta_2.COVARIÁVEL) + (\beta_3.VARIANTE \times COVARIÁVEL) + e$ ] e refizemos a análise para os genótipos condicionado a exposição, apenas para variantes que apresentaram valores de *p* significativos para a interação<sup>31</sup>.

## **RESULTADOS:**

Das 300 (24%) crianças com sintomas da asma na população SCAALA 143 (28,7%) eram atópicas, 167 (23,7%) eram do sexo masculino e 133 (21,7%) do sexo feminino. 44 (28,4%) delas foram expostas a fumaça de cigarro da mãe no primeiro ano de vida e 133 (22,5%) apresentavam soropositividade para VZV (Tabela S1). A Tabela 1 apresenta os detalhes das 14 variantes, do total de 18, ao longo da região cromossômica 17q21 que passou pelo controle de qualidade (*call rate* > 0,98, alelo de menor frequência > 0,01, valor de *p* para o equilíbrio de Hardy-Weinberg > 0,05). As frequências alélicas das diferentes variantes foram mais reiteradamente próximas (mas não sempre) do padrão africano que do europeu.

As Tabelas S2-S5 apresentaram os resultados das análises univariadas de associação entre as variantes genéticas e sibilância, sintomas de asma e atopia para os quatro modelos genéticos (alélico, aditivo, dominante e recessivo). As associações foram encontradas para sibilância, sintomas da asma e asma pouco

controlada. Não encontramos associações significativas entre as variantes da região 17q21 e atopia ( $IgE \geq 0.70kU/L$ ) em nenhum dos modelos.

A Tabela 2 mostra a associação entre asma e as variantes na região 17q21 ajustando para sexo, idade e MIAs, usando quatro modelos genéticos diferentes. Encontramos associação significativa entre todos os três genes do locus 17q21. As associações mais consistentes foram com rs4378650, variante pertencente ao *ORMDL3* no modelo genético aditivo (OR: 1,22, IC 95%: 1,00-1,47;  $p = 0,04$ ), no modelo dominante (OR: 1,70, IC 95%: 1,15-2,51,  $p = 0,01$ ), e sem modelo de herdabilidade (OR: 1,29; IC 95%: 1,03-1,60). No mesmo gene, encontramos associação para as variantes rs7224129 (OR: 1,25; IC 95%: 1,00-1,55) e rs4795402 (apenas no modelo recessivo, OR: 1,36; IC 95%: 1,04-1,79;  $p = 0,02$ ). No segundo gene, *GDSM1*, a associação com asma foi encontrada no modelo recessivo para a variante rs3859192 (OR: 1,57; IC 95%: 1,10-2,25;  $p = 0,01$ ). Para o gene TOP2A apenas a variante rs11650680 foi associada (OR: 6,07; IC 95%: 1,72-21,47;  $p = 0,004$ ) no modelo recessivo.

A Tabela 3 mostra a regressão logística separadamente para os indivíduos com sintomas da asma atópica (em comparação com os atópicos sem sintomas da asma) e indivíduos com sintomas da asma não-atópica (em comparação com os não-atópicos sem sintomas da asma) ajustada por sexo, idade e ascendência. Encontramos associação para sintomas da asma atópica para as quatro variantes, rs1008723, rs12603332, rs4795402 e rs3859192. Não foi encontrada associação para os sintomas da asma não-atópica.

Entre os vírus estudados, apenas VZV mostrou uma interação com variantes genéticas na região 17q21 e asma em crianças. Dentre as possibilidades de exposição à fumaça de cigarro, todas interagiram, exceto a variável "Qualquer outra pessoa, que não a mãe, fuma atualmente dentro do ambiente doméstico?" (Dados não mostrados).

A Tabela 4 apresenta a análise de interação para asma e soropositividade para VZV e tabagismo dos pais durante a primeira infância. A associação de genótipos de risco com asma foi amplamente significativa para aqueles expostos a VZV: variantes rs4378650 ( $p$  interação = 0,004) e rs4795405 ( $p$ -interação = 0,013). Em contraste, a exposição à fumaça do cigarro da mãe durante o primeiro

ano de vida também foi associada negativamente para as variantes rs3859192 (p interação = 0,005) e rs8077456 (p interação = 0,003).

## **DISCUSSÃO:**

Este estudo teve como objetivo verificar a associação entre variantes na região 17q21 e sintomas de asma numa população latino-americana de crianças. Encontramos associações entre algumas das variantes da região e sintomas de asma. A associação com rs4378650, após o ajuste para sexo, idade e ancestralidade, estava presente no modelo aditivo, dominante e no modelo independente de herdabilidade. Outras variantes foram associadas com sintomas de asma em diferentes modelos de herdabilidade. As associações permaneceram significativas apenas quando restritas aos sintomas da asma atópica. Além disso, relatamos uma interação entre as variantes no *ORMDL3* e sintomas da asma por tabagismo dos pais na infância e uma nova descoberta de interação entre duas das variantes no *ORMDL3* com sintomas da asma e VZV.

Wu<sup>32</sup> encontrou uma associação entre a asma com rs4378650 e rs7224129 em uma população mexicana e Galanter<sup>11</sup>, numa população mexicana e de afro-americanos. Estas variantes estão em alto desequilíbrio de ligação (LD) em nosso estudo. Na população japonesa, o rs7224129 foi associado à rinite alérgica<sup>33</sup>. Nossos resultados confirmam descobertas anteriores e fortalecem a sugestão de Galanter<sup>34</sup> de que as associações com sintomas de asma nesta região genética são independentes da ancestralidade, porque são constantemente encontradas em populações etnicamente diversas. Os padrões diferentes de associação talvez sejam devidos à heterogeneidade no padrão de LD com variantes genotipadas entre populações distintas (Figura S1).

A ORG realizada é praticamente idêntica ao modelo multiplicativo de análise<sup>35</sup>, no entanto, este resultado deve ser considerado com cautela, devido à prematuridade deste tipo de inferência.

Três variantes no *ORMDL3*, rs1008723, rs12603332 e rs4795402 foram associadas aos sintomas de asma atópica independentemente do grupo de comparação ser constituído por crianças atópicas não asmáticas ou todas as

crianças não asmáticas (tabela S6). Apesar das variantes que encontramos serem diferentes daquelas encontrados por Bouzigon<sup>36</sup> e Kang<sup>37</sup>, da mesma forma que eles, encontramos-as associadas à asma atópica. Um estudo recente<sup>38</sup> mostrou que *ORMDL3* é regulado por *STAT6*, gene importante na causalidade da asma atópica. Ao contrário de Leung<sup>39</sup>, mas de forma consistente com a maior parte da literatura, não encontramos associação com IgE. No entanto, parece que este autor analisou a associação entre variantes e atopia, reunindo casos e controles, gerando resultados não confiáveis. Ao usar esta estratégia analítica, asmáticos seriam sobre-representados no grupo atópico, e isso levaria a uma associação artificial entre as variantes e atopia.

Em nosso estudo, três variantes foram associadas com asma pouco controlada num modelo alélico e recessivo, mas nenhuma no modelo aditivo. Em resultados semelhantes, o gene *ORMDL3* foi associado à asma grave em crianças e adultos britânicos<sup>14</sup>, assim como em adultos de diferentes regiões da Europa<sup>15</sup>. Da mesma forma, esta região cromossômica também foi associada com asma grave em uma população britânica e replicada em uma população australiana<sup>40</sup>. É importante ressaltar que eles encontraram associação apenas da variante rs7216389 com asma grave e no nosso estudo encontramos quatro variantes diferentes associadas com asma pouco controlada, rs1008723 e rs3744246 (*ORMDL3*), rs3859192 (*GDSM1*) e rs11650680 (*TOP2A*) foram fortemente associados a asma grave num modelo recessivo.

Encontramos uma interação entre os sintomas da asma, soropositividade para VZV e duas variantes da região do cromossomo 17q21. A presença de soropositividade para VZV duplicou a possibilidade de ocorrência de sintomas de asma, na presença de um alelo de risco para a variante rs437850 e praticamente quadruplicou na presença de dois alelos de risco. Um padrão similar foi observado para a variante rs4795405, em que a presença de um alelo de risco aumentado em 1,5 vezes o risco de apresentar os sintomas da asma e na presença de dois alelos de risco este risco duplicou, enquanto que na ausência de uma sorologia positiva, não houve efeito dos alelos de risco. Uma interação entre variantes genéticas, asma e soropositividade para VZV não foi relatada anteriormente na literatura. Existem estudos que exploram a relação



entre infecção pelo VZV e asma, mas não que explorem a interação com variantes genéticas.

Dos estudos que investigaram a associação entre asma e VZV, apenas um autor encontrou um efeito protetor do VZV em asma<sup>41</sup>. Na nossa população, a sorologia positiva para VZV não foi associada com sibilância ou atopia, como relatado em outra publicação<sup>26</sup> e apenas a interação entre as variantes genéticas e sibilância foi significativa. É interessante notar que em nosso estudo utilizamos IgE alérgeno-específica ao invés de teste cutâneo para definir atopia porque em nossas populações, como em muitos outros países de baixa renda, há dissociação entre SPT e IgE<sup>42</sup>. As explicações possíveis para a associação entre os sintomas de asma e VZV foram infecção direta das células do sistema imunitário, induzindo a proteção prolongada contra o desenvolvimento de asma e que os fatores imunogenéticos associados com a asma podem resultar em debilidade da resposta imunológica mediada por células<sup>43</sup>. Um possível mecanismo seria o envolvimento de regulação da enzima Adenilato sintetase (OEA), uma vez que, pelo menos uma variante na região 17q21 foi sugerida como importante regulador desta enzima antiviral<sup>8</sup>, porém mais estudos são necessários para identificar os mecanismos subjacentes.

Nós encontramos uma interação entre as variantes genéticas rs3859192 e rs8077456 com o hábito de fumar dos pais durante a primeira infância e sintomas de asma. Num outro estudo, numa população de adultos asmáticos, observou-se uma interação entre a variante rs3859192 e hábitos de fumar na direção oposta à encontrada por nós<sup>44</sup>. Também na população francesa<sup>36</sup> e norte-americana de ascendência europeia foi encontrada uma interação entre a região 17q21 e tabagismo, aumentando a associação com asma infantil, mas não em crianças afro-americanas<sup>10</sup>. Finalmente, num estudo de uma população mexicana, não foi encontrada nenhuma interação entre o tabagismo dos pais e asma na infância<sup>44</sup>. Então, uma interação na qual o tabagismo aumenta a associação entre variantes na região do cromossoma 17q21 foi observada somente em populações de origem europeia.

**Limitações:** Com uma amostra de 300 casos, este estudo teve poder suficiente para uma investigação de gene candidato, mas não para detectar a associação com outras variantes menos frequentes. Nenhuma análise de expressão e

sequenciamento foi realizada, por isso não podemos explorar caminhos causais das variantes específicas estudadas.

## REFERÊNCIAS:

- 1 MARTINEZ, F. D.; VERCELLI, D. Asthma. **Lancet**, v. 382, n. 9901, p. 1360-72, Oct 19 2013.
- 2 BARRETO, M. L. *et al.* Poverty, dirt, infections and non-atopic wheezing in children from a Brazilian urban center. **Respir Res**, v. 11, p. 167, 2010.
- 3 MATOS, S. M. *et al.* Overweight, asthma symptoms, atopy and pulmonary function in children of 4-12 years of age: findings from the SCAALA cohort in Salvador, Bahia, Brazil. **Public Health Nutrition**, v. 14, n. 7, p. 1270-8, Jul 2011.
- 4 MOFFATT, M. F. *et al.* Genetic variants regulating ORMDL3 expression contribute to the risk of childhood asthma. **Nature**, v. 448, n. 7152, p. 470-U5, Jul 26 2007.
- 5 CANTERO-RECASENS, G. *et al.* The asthma-associated ORMDL3 gene product regulates endoplasmic reticulum-mediated calcium signaling and cellular stress. **Hum Mol Genet**, v. 19, n. 1, p. 111-21, Jan 1 2010.
- 6 CARRERAS-SUREDA, A. *et al.* ORMDL3 modulates store-operated calcium entry and lymphocyte activation. **Hum Mol Genet**, v. 22, n. 3, p. 519-30, Feb 1 2013.
- 7 BRESLOW, D. K. *et al.* Orm family proteins mediate sphingolipid homeostasis. **Nature**, v. 463, n. 7284, p. 1048-U65, Feb 25 2010.
- 8 MILLER, M. *et al.* ORMDL3 is an inducible lung epithelial gene regulating metalloproteases, chemokines, OAS, and ATF6. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 41, p. 16648-53, Oct 9 2012.
- 9 BISGAARD, H. *et al.* Chromosome 17q21 gene variants are associated with asthma and exacerbations but not atopy in early childhood. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 179, n. 3, p. 179-85, Feb 1 2009.

- 10 FLORY, J. H. *et al.* 17q12-21 variants interact with smoke exposure as a risk factor for pediatric asthma but are equally associated with early-onset versus late-onset asthma in North Americans of European ancestry. **J Allergy Clin Immunol**, v. 124, n. 3, p. 605-7, Sep 2009.
- 11 GALANTER, J. *et al.* ORM DL3 gene is associated with asthma in three ethnically diverse populations. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 177, n. 11, p. 1194-200, Jun 1 2008.
- 12 HIROTA, T. *et al.* Genetic polymorphism regulating ORM1-like 3 (*Saccharomyces cerevisiae*) expression is associated with childhood atopic asthma in a Japanese population. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 121, n. 3, p. 769-770, 2008.
- 13 SLEIMAN, P. M. A. *et al.* ORM DL3 variants associated with asthma susceptibility in North Americans of European ancestry. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 122, n. 6, p. 1225-1227, Dec 2008.
- 14 BINIA, A. *et al.* Chromosome 17q21 SNP and severe asthma. **J Hum Genet**, v. 56, n. 1, p. 97-8, Jan 2011.
- 15 HALAPI, E. *et al.* A sequence variant on 17q21 is associated with age at onset and severity of asthma. **European Journal of Human Genetics**, v. 18, n. 8, p. 902-908, Aug 2010.
- 16 MOFFATT, M. F. *et al.* A Large-Scale, Consortium-Based Genomewide Association Study of Asthma. **New England Journal of Medicine**, v. 363, n. 13, p. 1211-1221, Sep 23 2010.
- 17 COOPER, P. J. *et al.* Asthma in Latin America: a public health challenge and research opportunity. **Allergy**, v. 64, n. 1, p. 5-17, Jan 2009.
- 18 SOUZA DA CUNHA, S. *et al.* Asthma cases in childhood attributed to atopy in tropical area in Brazil. **Rev Panam Salud Publica**, v. 28, n. 6, p. 405-11, Dec 2010.
- 19 LEYNAERT, B. *et al.* Gender differences in prevalence, diagnosis and incidence of allergic and non-allergic asthma: a population-based cohort. **Thorax**, v. 67, n. 7, p. 625-31, Jul 2012.

- 20 SMIT, L. A. *et al.* 17q21 variants modify the association between early respiratory infections and asthma. **Eur Respir J**, v. 36, n. 1, p. 57-64, Jul 2010.
- 21 BUSSE, W. W.; LEMANSKE, R. F., JR.; GERN, J. E. Role of viral respiratory infections in asthma and asthma exacerbations. **Lancet**, v. 376, n. 9743, p. 826-34, Sep 4 2010.
- 22 MCCARTHY, M. I. *et al.* Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges. **Nat Rev Genet**, v. 9, n. 5, p. 356-69, May 2008.
- 23 BARRETO, M. L. *et al.* 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 Pulm Med**, v. 6, p. 15, 2006.
- 24 ASHER, M. I. *et al.* International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC): rationale and methods. **Eur Respir J**, v. 8, n. 3, p. 483-91, Mar 1995.
- 25 FIGUEIREDO, C. A. *et al.* Chronic Intestinal Helminth Infections Are Associated with Immune Hyporesponsiveness and Induction of a Regulatory Network. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 7, p. 3160-3167, Jul 2010.
- 26 ALCANTARA-NEVES, N. M. *et al.* The effect of single and multiple infections on atopy and wheezing in children. **J Allergy Clin Immunol**, v. 129, n. 2, p. 359-67, 367 e1-3, Feb 2012.
- 27 SIMOES, S. D. *et al.* Distribution of severity of asthma in childhood. **Jornal De Pediatria**, v. 86, n. 5, p. 417-423, Sep-Oct 2010.
- 28 ZINTZARAS, E. The Generalized Odds Ratio as a Measure of Genetic Risk Effect in the Analysis and Meta-Analysis of Association Studies. **Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology**, v. 9, n. 1, 2010.
- 29 DOERGE, R. W.; CHURCHILL, G. A. Permutation tests for multiple loci affecting a quantitative character. **Genetics**, v. 142, n. 1, p. 285-294, Jan 1996.

- 30 ZHENG, X. *et al.* A high-performance computing toolset for relatedness and principal component analysis of SNP data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 24, p. 3326-8, Dec 15 2012.
- 31 Thomas DC: Statistical methods in genetic epidemiology. Oxford University Press, 2004.
- 32 WU, H. *et al.* Genetic variation in ORM1-like 3 (ORMDL3) and gasdermin-like (GSDML) and childhood asthma. **Allergy**, v. 64, n. 4, p. 629-35, Apr 2009.
- 33 TOMITA, K. *et al.* Variants in the 17q21 asthma susceptibility locus are associated with allergic rhinitis in the Japanese population. **Allergy**, v. 68, n. 1, p. 92-100, Jan 2013.
- 34 GALANTER, J. M. *et al.* Cosmopolitan and ethnic-specific replication of genetic risk factors for asthma in 2 Latino populations. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 128, n. 1, p. 37-U79, Jul 2011.
- 35 PEREIRA, M. U. *et al.* Nonatopic asthma is associated with helminth infections and bronchiolitis in poor children. **European Respiratory Journal**, v. 29, n. 6, p. 1154-1160, Jun 2007.
- 36 BOUZIGON, E. *et al.* Effect of 17q21 Variants and Smoking Exposure in Early-Onset Asthma. **New England Journal of Medicine**, v. 359, n. 19, p. 1985-1994, Nov 6 2008.
- 37 KANG, M. J. *et al.* GSDMB/ORMDL3 variants contribute to asthma susceptibility and eosinophil-mediated bronchial hyperresponsiveness. **Hum Immunol**, v. 73, n. 9, p. 954-9, Sep 2012.
- 38 KAVALAR, M. S. *et al.* Association of ORMDL3, STAT6 and TBXA2R gene polymorphisms with asthma. **Int J Immunogenet**, v. 39, n. 1, p. 20-5, Feb 2012.
- 39 LEUNG, T. F. *et al.* Asthma and atopy are associated with chromosome 17q21 markers in Chinese children. **Allergy**, v. 64, n. 4, p. 621-8, Apr 2009.
- 40 WAN, Y. I. *et al.* Genome-wide association study to identify genetic determinants of severe asthma. **Thorax**, v. 67, n. 9, p. 762-8, 2012.

- 41 SILVERBERG, J. I. *et al.* Varicella zoster virus (wild-type) infection, but not varicella vaccine, in late childhood is associated with delayed asthma onset, milder symptoms, and decreased atopy. **Pediatric Asthma, Allergy & Immunology**, v. 22, n. 1, p. 15-20, 2009.
- 42 RODRIGUES, L. C. *et al.* Early infection with *Trichuris trichiura* and allergen skin test reactivity in later childhood. **Clin Exp Allergy**, v. 38, n. 11, p. 1769-77, Nov 2008.
- 43 STEAIN, M.; SLOBEDMAN, B.; ABENDROTH, A. The host immune response to varicella zoster virus. **Future Virology**, v. 7, n. 12, p. 1205-1220, Dec 2012.
- 44 MARINHO, S. *et al.* 17q12-21 variants are associated with asthma and interact with active smoking in an adult population from the United Kingdom. **Ann Allergy Asthma Immunol**, v. 108, n. 6, p. 402-411 e9, Jun 2012.
- 45 WU, H. *et al.* Evaluation of candidate genes in a genome-wide association study of childhood asthma in Mexicans. **J Allergy Clin Immunol**, v. 125, n. 2, p. 321-327, 2010.

**Tabela 1:** Descrição e frequências das variantes genéticas na região 17q21.

Gene	Variante	Posição (pb)	Alelo de risco	Frequência alélica					
				No estudo presente	Valor de $p^*$	De acordo com o HapMap		CEPH Stanford	
						Yoruba	Europeia	Karitiana	Suruí
<i>ORMDL3</i>	rs1008723	35319793	C	0.64	0.19	0.73	0.49	-	-
<i>ORMDL3</i>	rs7224129	35328952	A	0.54	0.12	0.62	0.49	-	-
<i>ORMDL3</i>	rs4378650	35334391	G	0.59	0.69	0.72	0.52	-	-
<i>ORMDL3</i>	rs9910635	35334690	A	0.07	0.68	0.13	0.0	0	0
<i>ORMDL3</i>	rs12603332	35336333	G	0.44	0.43	0.42	0.51	-	-
<i>ORMDL3</i>	rs3744246	35337876	G	0.72	0.73	0.76	0.69	0.21	0.37
<i>ORMDL3</i>	rs9894164	35338324	G	0.12	0.90	0.17	0.0	-	-
<i>ORMDL3</i>	rs4795402	35338911	C	0.59	0.15	0.49	0.73	0.21	0.37
<i>ORMDL3</i>	rs4795405	35341943	G	0.62	0.56	0.65	0.55	-	-
<i>GSDM1</i>	rs3859192	35382174	A	0.36	0.63	0.30	0.50	0.18	0.19
<i>GSDM1</i>	rs8077456	35382291	C	0.33	0.10	0.27	0.32	-	-
<i>TOP2A</i>	rs16965748	35809083	G	0.07	0.27	0.14	0.02	-	-
<i>TOP2A</i>	rs525812	35828818	C	0.79	0.51	0.85	0.78	-	-
<i>TOP2A</i>	rs11650680	3.6E+07	A	0.10	0.46	0.0	0.24	0.07	0.37

\* valor de  $p$  para equilíbrio de Hardy-Weinberg.

**Tabela 2:** Regressão logística entre as variantes genéticas na região 17q21 e sintomas de asma, ajustado por sexo, idade e ancestralidade, na população total.

Gene	Variante	Posição (pb)	Modelo aditivo		Modelo Dominante		Modelo Recessivo		Sem modelo	
			OR	<i>p</i>	OR	<i>p</i>	OR	<i>p</i>	ORG*	IC(95%)
<i>ORMDL3</i>	rs1008723	C	1.21	0.06	1.33	0.18	1.25	0.07	1.25	(0.99 -1.57)
<i>ORMDL3</i>	rs7224129	A	1.18	0.09	<b>1.41</b>	<b>0.05</b>	1.14	0.30	<b>1.25</b>	<b>(1 -1.55)</b>
<i>ORMDL3</i>	rs4378650	G	<b>1.22</b>	<b>0.04</b>	<b>1.70</b>	<b>0.01</b>	1.12	0.34	<b>1.29</b>	<b>(1.03 -1.60)</b>
<i>ORMDL3</i>	rs9910635	A	1.08	0.64	1.09	0.64	1.07	0.93	1.10	(0.76 -1.57)
<i>ORMDL3</i>	rs12603332	G	1.17	0.10	1.22	0.18	1.25	0.14	1.20	(0.97 -1.50)
<i>ORMDL3</i>	rs3744246	G	1.13	0.25	0.86	0.54	1.27	0.06	1.17	(0.92 -1.49)
<i>ORMDL3</i>	rs9894164	G	0.86	0.32	0.82	0.22	1.28	0.64	0.83	(0.61 -1.13)
<i>ORMDL3</i>	rs4795402	C	1.17	0.12	0.99	0.99	<b>1.36</b>	<b>0.02</b>	1.20	(0.96 -1.51)
<i>ORMDL3</i>	rs4795405	G	1.10	0.31	1.12	0.56	1.15	0.24	1.11	(0.89 -1.39)
<i>GSDM1</i>	rs3859192	A	1.18	0.08	1.10	0.48	<b>1.57</b>	<b>0.01</b>	1.18	(0.94 -1.48)
<i>GSDM1</i>	rs8077456	C	0.91	0.39	<b>0.77</b>	<b>0.05</b>	1.38	0.13	0.87	(0.68 -1.10)
<i>TOP2A</i>	rs16965748	G	0.95	0.81	0.87	0.48	7,18E+10	0.99	0.88	(0.60 -1.30)
<i>TOP2A</i>	rs525812	C	1.07	0.55	1.35	0.37	1.04	0.73	1.07	(0.83 -1.37)
<i>TOP2A</i>	rs11650680	A	1.32	0.07	1.22	0.22	<b>6.07</b>	<b>0.004</b>	1.24	(0.91 -1.70)

\* *Odds Ratio* Generalizada.



**Tabela 3:** Regressão logística no modelo aditivo para sintomas de asma atópica e sintomas de asma não atópica, ajustada por sexo, idade e ancestralidade.

Gene	Variante	Alelo de risco	Indivíduos atópicos		Indivíduos não-atópicos	
			Asmáticos (143) / controle (356)		Não asmáticos (157) / controle (662)	
			OR	<i>p</i>	OR	<i>p</i>
<i>ORMDL3</i>	rs1008723	C	<b>1.384</b>	<b>0.03208</b>	1.085	0.5484
<i>ORMDL3</i>	rs7224129	A	1.323	0.05344	1.117	0.3928
<i>ORMDL3</i>	rs4378650	G	1.215	0.1769	1.277	0.06219
<i>ORMDL3</i>	rs9910635	A	1.145	0.6213	1.091	0.7005
<i>ORMDL3</i>	rs12603332	G	<b>1.334</b>	<b>0.04514</b>	1.05	0.7027
<i>ORMDL3</i>	rs3744246	G	1.233	0.1976	1.036	0.8006
<i>ORMDL3</i>	rs9894164	G	0.7908	0.2778	0.8978	0.5899
<i>ORMDL3</i>	rs4795402	C	<b>1.379</b>	<b>0.03632</b>	0.9876	0.9223
<i>ORMDL3</i>	rs4795405	G	1.134	0.3935	1.06	0.6547
<i>GSDM1</i>	rs3859192	A	<b>1.357</b>	<b>0.032</b>	1.073	0.5869
<i>GSDM1</i>	rs8077456	C	0.8725	0.3704	0.9356	0.6355
<i>TOP2A</i>	rs16965748	G	0.7767	0.4281	1.138	0.589
<i>TOP2A</i>	rs525812	C	1.053	0.7569	1.113	0.4974
<i>TOP2A</i>	rs11650680	A	1.304	0.2276	1.33	0.1551

**Tabela 4:** Regressão logística para sintomas de asma e genótipos de risco, estratificada por soropositividade para *Varicella zoster* e histórico de tabagismo dos pais.

<b>Soropositividade para vírus da <i>Varicella zoster</i></b>									
Não exposto					Exposto				
rs	Caso	Controle	OR	<i>p</i>	Caso	Controle	OR	<i>p</i>	<i>p</i> -interação*
<b>rs4378650</b>									
AA	25	105	1,00		9	80	1,00		
AG	89	249	1,50	0,1	65	238	<b>2,42</b>	<b>0,02</b>	
GG	51	194	1,10	0,71	59	141	<b>3,71</b>	<b>0,0003</b>	<b>0,004</b>
<b>rs4795405</b>									
AA	26	78	1,00		14	70	1,00		
AG	87	268	0,97	0,92	55	217	1,27	0,47	
GG	52	200	0,78	0,36	64	169	<b>1,89</b>	<b>0,05</b>	<b>0,013</b>
<b>Tabagismo dos pais (durante o primeiro ano de vida da criança)</b>									
Não exposto					Exposto				
<b>rs3859192</b>									
GG	98	383	1,00		20	41	1,00		
AG	111	415	1,04	0,78	16	53	0,62	0,22	
AA	47	92	<b>1,99</b>	<b>0,001</b>	5	28	0,36	0,06	<b>0,005</b>
<b>rs8077456</b>									
GG	127	371	1,00		18	61	1,00		
CG	102	435	<b>0,68</b>	<b>0,01</b>	14	51	0,93	0,86	
CC	25	81	0,90	0,67	9	10	<b>3,05</b>	<b>0,03</b>	<b>0,03</b>

\*valor de *p* para um modelo de interação aditivo.

### Material suplementar – artigo 3

**Tabela S1:** Descrição da população SCAALA.

	Asma		Valor de $p^*$
	Não N(%)	Sim N(%)	
Sexo			
Masculino	539 (76.3)	167 (23.7)	0,39
Feminino	480 (78.3)	133 (21.7)	
Idade			
4-5 anos	229 (66.6)	115 (33.4)	-
6-7 anos	418 (77.8)	119 (22.2)	
8-12 anos	372 (84.9)	66 (15.1)	
A mãe da criança fuma atualmente?			
Não	890 (77.6)	257 (22.4)	0,43
Sim	122 (74.8)	41(25.2)	
A mãe da criança fumou durante a 1º ano de vida da criança?			
Não	903 (78)	254 (22)	0,07
Sim	111 (71.6)	44 (28.4)	
Coinfecção com <i>A.lumbricoides</i> e <i>T.trichiura</i>			
Negativo	578(77.7)	166(22.3)	0,44
Positivo (apenas um)	182(80.9)	43(19.1)	
Positivo (ambos)	64(82.1)	14(17.9)	
IgG for <i>Varicella zooster virus</i>			
Não	548(76.9)	165(23.1)	0,77
Sim	459(77.5)	133(22.5)	
IgE alérgeno-específica para >1			
≤0.70KU/L	662(80.8)	157(19.2)	< 0,001
>0.70KU/L	356(71.3)	143(28.7)	

\*chi-quadrado

**Tabela S2:** Teste de associação entre as variantes genéticas e sibilância.

Gene	Variante	Alelo de risco	Sibilância nos últimos 12 meses Nº= 1319, sim = 383									
			Modelo Alélico		Modelo Aditivo		Modelo Dominante		Modelo Recessivo			
			OR	P	OR	P	OR	P	OR	P		
ORMDL3	rs1008723	C	1,13	0,19	1,13	0,18	1,14	0,48	1,18	0,17		
ORMDL3	rs7224129	A	1,08	0,36	1,09	0,35	1,16	0,33	1,08	0,57		
ORMDL3	rs4378650	G	1,16	0,10	1,16	0,09	<b>1,45</b>	<b>0,02</b>	1,08	0,55		
ORMDL3	rs9910635	A	0,99	0,97	0,99	0,97	0,97	0,87	1,47	0,60		
ORMDL3	rs12603332	G	1,14	0,14	1,14	0,13	1,14	0,31	1,25	0,14		
ORMDL3	rs3744246	G	1,11	0,27	1,11	0,27	0,87	0,52	1,24	0,08		
ORMDL3	rs9894164	G	0,87	0,30	0,87	0,30	0,82	0,18	1,43	0,45		
ORMDL3	rs4795402	C	1,16	0,09	1,16	0,09	1,05	0,75	<b>1,32</b>	<b>0,03</b>		
ORMDL3	rs4795405	G	1,09	0,34	1,09	0,34	1,14	0,46	1,11	0,41		
GSDM1	rs3859192	A	1,05	0,56	1,05	0,56	0,98	0,90	1,26	0,17		
GSDM1	rs8077456	C	0,97	0,73	0,98	0,72	0,88	0,31	1,21	0,35		
TOP2A	rs16965748	G	0,96	0,81	0,96	0,81	0,89	0,53	3,98E+12	0,99		
TOP2A	rs525812	C	1,13	0,25	1,13	0,26	1,24	0,47	1,14	0,30		
TOP2A	rs11650680	A	<b>1,30</b>	<b>0,05</b>	<b>1,31</b>	<b>0,05</b>	1,23	0,16	<b>6,59</b>	<b>0,005</b>		

**Tabela S3:** Teste de associação entre as variantes genéticas e sintomas de asma.

			Sintomas de asma (sibilância + sintomas) Nº = 1319, sim = 300							
			Modelo Alélico		Modelo Aditivo		Modelo Dominante		Modelo Recessivo	
Gene	Variante	Alelo de risco	OR	P	OR	P	OR	P	OR	P
ORMDL3	rs1008723	C	0,83	0,06	1,21	0,05	1,33	0,18	1,26	0,08
ORMDL3	rs7224129	A	<b>1,20</b>	<b>0,05</b>	1,21	0,05	<b>1,42</b>	<b>0,04</b>	1,19	0,23
ORMDL3	rs4378650	G	<b>1,24</b>	<b>0,02</b>	<b>1,25</b>	<b>0,02</b>	<b>1,70</b>	<b>0,01</b>	1,18	0,22
ORMDL3	rs9910635	A	1,09	0,61	1,09	0,61	1,10	0,61	1,13	0,88
ORMDL3	rs12603332	G	1,17	0,09	1,17	0,09	1,22	0,17	1,26	0,15
ORMDL3	rs3744246	G	1,12	0,29	1,12	0,29	0,87	0,56	1,25	0,10
ORMDL3	rs9894164	G	0,86	0,30	0,86	0,30	0,82	0,21	1,22	0,71
ORMDL3	rs4795402	C	1,15	0,14	1,16	0,14	1,00	0,98	<b>1,34</b>	<b>0,03</b>
ORMDL3	rs4795405	G	1,09	0,36	1,09	0,36	1,13	0,53	1,12	0,40
GSDM1	rs3859192	A	1,18	0,08	1,18	0,08	1,09	0,53	<b>1,60</b>	<b>0,01</b>
GSDM1	rs8077456	C	0,92	0,39	0,91	0,38	0,78	0,06	1,30	0,22
TOP2A	rs16965748	G	0,96	0,81	0,95	0,81	0,87	0,49	5,54E+12	1,00
TOP2A	rs525812	C	1,07	0,53	1,07	0,54	1,29	0,44	1,05	0,69
TOP2A	rs11650680	A	1,30	0,07	1,32	0,06	1,22	0,21	<b>6,03</b>	<b>0,004</b>

**Tabela S4:** Teste de associação entre as variantes genéticas e asma pouco controlada

			Asma pouco controlada Nº = 1319, sim = 160							
			Modelo Alélico		Modelo Aditivo		Modelo Dominante		Modelo Recessivo	
Gene	Variante	Alelo de risco	OR	P	OR	P	OR	P	OR	P
ORMDL3	rs1008723	C	<b>1,34</b>	<b>0,02</b>	1,35	0,02	1,39	0,25	<b>1,49</b>	<b>0,02</b>
ORMDL3	rs7224129	A	1,22	0,10	1,23	0,10	<b>1,61</b>	<b>0,04</b>	1,14	0,47
ORMDL3	rs4378650	G	1,19	0,16	1,19	0,16	1,68	0,05	1,08	0,65
ORMDL3	rs9910635	A	0,97	0,90	0,97	0,90	1,02	0,92	4,45E-06	0,10
ORMDL3	rs12603332	G	1,15	0,25	1,15	0,24	1,15	0,45	1,27	0,24
ORMDL3	rs3744246	G	<b>1,32</b>	<b>0,04</b>	1,32	0,04	1,18	0,61	<b>1,47</b>	<b>0,02</b>
ORMDL3	rs9894164	G	0,73	0,12	0,73	0,12	0,73	0,14	0,40	0,37
ORMDL3	rs4795402	C	1,13	0,31	1,14	0,30	1,06	0,81	1,26	0,19
ORMDL3	rs4795405	G	1,27	0,06	1,27	0,06	1,29	0,32	<b>1,40</b>	<b>0,048</b>
GSDM1	rs3859192	A	<b>1,27</b>	<b>0,046</b>	1,27	0,048	1,16	0,38	<b>1,79</b>	<b>0,01</b>
GSDM1	rs8077456	C	0,87	0,30	0,87	0,29	0,77	0,13	1,07	0,81
TOP2A	rs16965748	G	1,03	0,90	1,03	0,90	0,93	0,78	<b>14,66</b>	<b>0,03</b>
TOP2A	rs525812	C	1,32	0,07	1,31	0,08	2,13	0,15	1,3	0,14
TOP2A	rs11650680	A	1,32	0,12	1,33	0,12	1,25	0,27	<b>4,18</b>	<b>0,02</b>

**Tabela S5:** Teste de associação entre as variantes genéticas e atopia.

			sIgE > 0,70 kU/L Nº = 1318, sim = 499							
			Modelo Alélico		Modelo Aditivo		Modelo Dominante		Modelo Recessivo	
Gene	Variante	Alelo de risco	OR	P	OR	P	OR	P	OR	P
ORMDL3	rs1008723	C	1,27	0,17	1,28	0,17	1,10	0,80	1,48	0,10
ORMDL3	rs7224129	A	1,06	0,74	1,06	0,73	1,29	0,41	0,96	0,87
ORMDL3	rs4378650	G	0,95	0,76	0,94	0,75	1,04	0,91	0,89	0,62
ORMDL3	rs9910635	A	0,86	0,63	0,86	0,63	0,94	0,86	5,56E-07	0,99
ORMDL3	rs12603332	G	0,97	0,85	0,97	0,84	0,89	0,65	1,04	0,87
ORMDL3	rs3744246	G	1,36	0,09	1,33	0,11	1,57	0,28	1,41	0,14
ORMDL3	rs9894164	G	0,71	0,19	0,72	0,20	0,75	0,32	0,22	0,18
ORMDL3	rs4795402	C	0,99	0,98	0,99	0,98	1,06	0,85	0,96	0,85
ORMDL3	rs4795405	G	1,26	0,17	1,27	0,16	1,25	0,51	1,42	0,14
GSDM1	rs3859192	A	1,24	0,20	1,22	0,22	1,21	0,41	1,47	0,21
GSDM1	rs8077456	C	0,87	0,42	0,88	0,44	0,86	0,51	0,79	0,52
TOP2A	rs16965748	G	1,07	0,84	1,06	0,85	1,02	0,95	1,83	0,62
TOP2A	rs525812	C	1,45	0,06	1,46	0,06	2,28	0,18	1,48	0,10
TOP2A	rs11650680	A	1,07	0,78	1,07	0,78	1,06	0,82	1,2	0,80

**Tabela S6:** Regressão logística para os sintomas da asma atópica do grupo de comparação constituído por crianças atópicas não asmáticas ou todas as crianças não-asmáticas. Ajustado por sexo, idade e ascendência.

Gene	Variant	Risk allele	Atopic asthma (143)			
			Atopic control (356)		Population total control (1019)	
			OR	<i>p</i>	OR	<i>p</i>
<i>ORMDL3</i>	rs1008723	C	<b>1.384</b>	<b>0.032</b>	<b>1.376</b>	<b>0.023</b>
<i>ORMDL3</i>	rs7224129	A	1.323	0.053	<b>1.299</b>	<b>0.046</b>
<i>ORMDL3</i>	rs4378650	G	1.215	0.177	1.225	0.121
<i>ORMDL3</i>	rs9910635	A	1.145	0.621	1.018	0.941
<i>ORMDL3</i>	rs12603332	G	<b>1.334</b>	<b>0.045</b>	<b>1.344</b>	<b>0.022</b>
<i>ORMDL3</i>	rs3744246	G	1.233	0.198	1.207	0.200
<i>ORMDL3</i>	rs9894164	G	0.791	0.278	0.859	0.450
<i>ORMDL3</i>	rs4795402	C	<b>1.379</b>	<b>0.036</b>	<b>1.430</b>	<b>0.009</b>
<i>ORMDL3</i>	rs4795405	G	1.134	0.394	1.124	0.377
<i>GSDM1</i>	rs3859192	A	<b>1.357</b>	<b>0.032</b>	<b>1.249</b>	<b>0.087</b>
<i>GSDM1</i>	rs8077456	C	0.873	0.370	0.919	0.554
<i>TOP2A</i>	rs16965748	G	0.777	0.428	0.696	0.218
<i>TOP2A</i>	rs525812	C	1.053	0.757	0.986	0.925
<i>TOP2A</i>	rs11650680	A	1.304	0.228	1.304	0.184



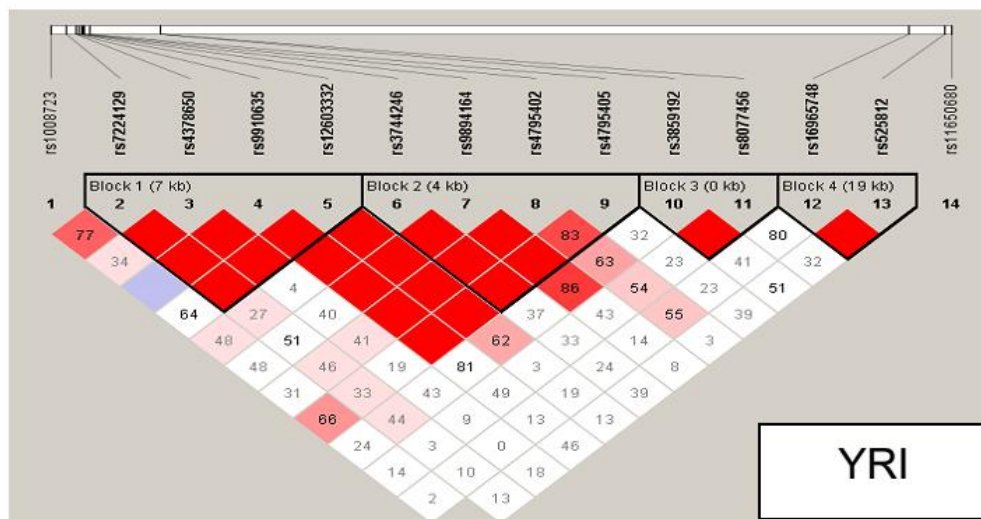
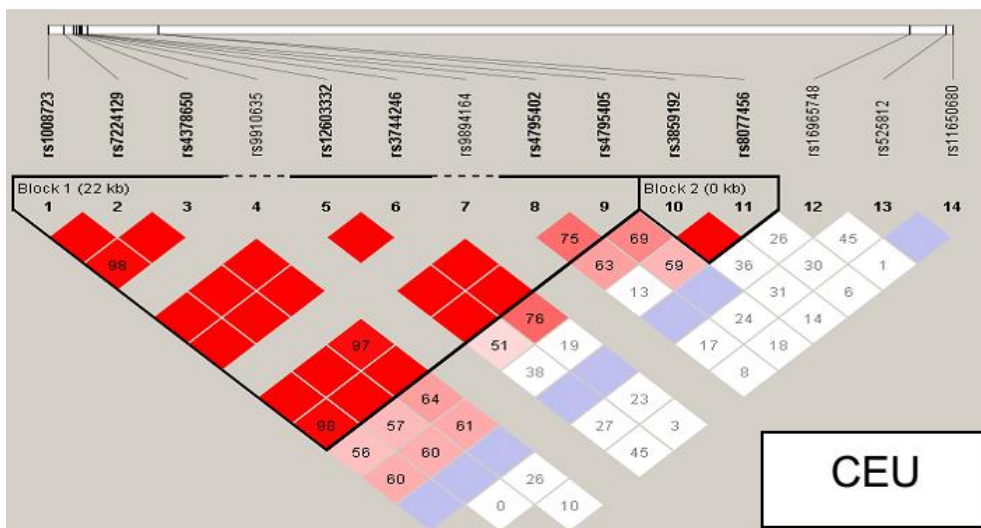
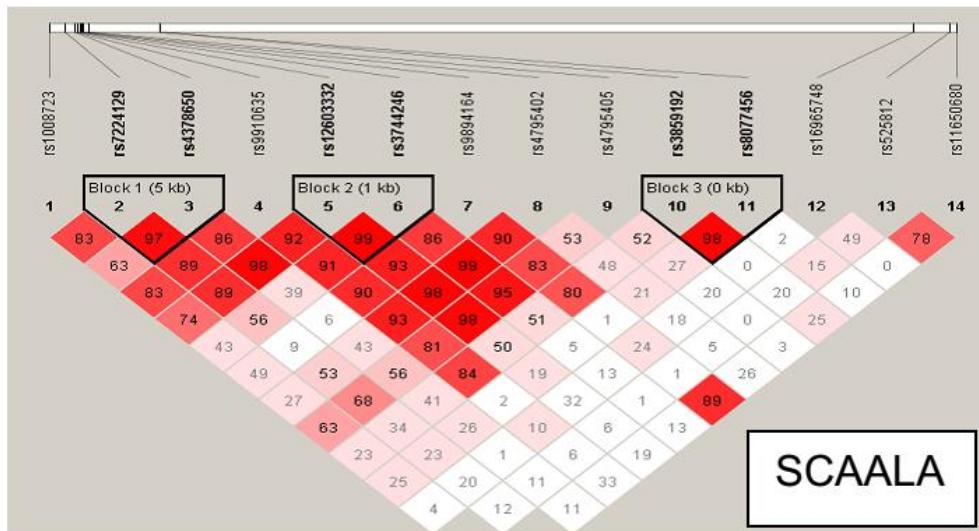
**Tabela S7:** Associação dos pares de haplótipos e sintomas de asma para as variantes rs7224129 e rs4378650.

<b>Número de Haplótipos de risco (AG)</b>	<b>Par de Haplótipo</b>	<b>Não asmático</b>	<b>Asmático</b>	<b>Frequência total (%)</b>	<b>OR</b>	<b>95% IC</b>	<b>Valor de p</b>
Nenhum	AA - AA	132	37	169 (12.8)			
	AA - GG	62	20	82 (6.2)			
	GG - GG	0	2	2 (0.1)			
	GA - GA	0	0	0 (0.0)			
	GA - GG	0	1	1 (0.1)			
	Total	194	60		1,00	-	-
Um	AA - AG	425	129	554 (42.0)			
	AA - GA	18	4	22 (1.7)			
	AG - GA	0	0	0 (0.0)			
	AG - GG	58	9	67 (5.1)			
	Total	501	142		0,92	0,64 - 1,32	0,62
Dois	AG - AG	324	98	422 (32.0)			
	Total	324	98		0,98	0,67 - 1,44	0,90
Grande total		1019	300	1319 (100.0)			

**Tabela S8:** Regressão logística para sintomas de asma, soropositividade para VZV e tabagismo dos pais, estratificados por genótipos de risco.

<b>Soropositividade para vírus da <i>Varicella zoster</i></b>								
Não exposto				Exposto				
rs4378650	Caso	Control e	OR	Caso	Controle	OR	IC (0,95%)	<i>p</i> *
AA	25	105	1	9	80	0,47	0,18 - 1,12	
AG	89	249	1	65	238	0,76	0,52 - 1,11	
GG	51	194	1	59	141	<b>1,59</b>	<b>1,00 - 2,51</b>	<b>0,008</b>
<b>rs4795405</b>								
AA	26	78	1	14	70	0,6	0,26 - 1,30	
AG	87	268	1	55	217	0,78	0,52 - 1,16	
GG	52	200	1	64	169	<b>1,45</b>	<b>0,93 - 2,26</b>	<b>0,03</b>
<b>Tabagismo dos pais (durante o primeiro ano de vida da criança)</b>								
Não exposto				Exposto				
rs3859192	Caso	Control e	OR	Caso	Controle	OR	IC (0,95%)	<i>p</i> *
GG	98	383	1	20	41	1,9	1,00 – 3,50	
AG	111	415	1	16	53	1,12	0,58 – 2,09	
AA	47	92	1	5	28	<b>0,35</b>	<b>0,09 – 1,00</b>	<b>0,01</b>
<b>rs8077456</b>								
GG	127	371	1	18	61	0,86	0,46 – 1,54	
CG	102	435	1	14	51	1,17	0,57 – 2,24	
CC	25	81	1	9	10	2,92	0,92 – 8,93	0,11

\*valor de *p* do teste de homogeneidade (Mantel-Haenszel)



**Figura S1:** Haplótipos\* da região 17q21 nas populações SCAALA, Europeia (CEU: Hapmap-release 27) e Yoruba (YRI: Hapmap-release 27). A cor vermelha indica uma correlação de 100% entre as variantes, à medida que a correlação diminui a cor vai do rosado ao branco (baixa correlação).

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS DA TESE:**

Este trabalho investigou determinantes genéticos para sintomas de asma e de atopia em crianças. Ele tem a vantagem de estar inserido em um programa de investigação sobre asma e alergia em curso na cidade de Salvador, o qual, por sua vez, é parte de um programa de investigação destes problemas de saúde em dois contextos Latino americanos – o programa SCAALA (mudanças sociais asma e alergia na América Latina). Este programa, desenvolvido em Salvador<sup>1</sup> e no Equador<sup>2</sup>, tem contribuído para o melhor entendimento da epidemiologia da asma em crianças do continente latino-americano conforme apresentado em uma recente revisão<sup>3</sup>.

O estudo aqui relatado foi pioneiro ao inserir uma abordagem investigativa inovadora no campo da genética, como as análises de associação por varredura genômica, herdabilidade baseada em análise de populações não-parentais e rotas metabólicas em dados genômicos, na busca de contribuir para os avanços das pesquisas epidemiológicas já em curso. A epidemiologia geral contribuiu com seu conhecimento em desenhos de estudo, seleção de variáveis e definição de caso, fatores que, apesar de serem bem estabelecidos no campo epidemiológico, possuem uma grande demanda no campo da genética.

Os resultados encontrados aqui trazem contribuições para o melhor conhecimento dos fatores genéticos que determinam o desenvolvimento dos sintomas de asma e atopia em crianças, destacando-se o efeito de regiões cromossômicas específicas: 14q11 e 15q21 para sintomas de asma e 21q21 para o desenvolvimento de atopia. Observou-se também que há uma grande herdabilidade genética (até 70%) no desenvolvimento de asma e uma herdabilidade genética razoavelmente elevada (até 22,7%) para atopia. Ainda foi possível confirmar a associação da região 17q21 no desenvolvimento da asma e, pela primeira vez, foi demonstrado à interação desta região com o vírus da Varicela Zoster.

Alguns autores consideram que a metodologia de varredura genômica tem falhado no que se refere à expectativa gerada em indicar novos genes candidatos para doenças complexas<sup>4</sup>, pois a fração herdável dos SNPs mais associados é baixa, como também foi indicado pelos resultados do primeiro

artigo que compõe a tese (menos de 14% para sintomas de asma). Certamente estes resultados estão sujeitos a limitações metodológicas, pois estudos de associação por varredura genômica, por serem exploratórios, necessitam de uma validação externa<sup>5</sup> e esta pode ser dada pela replicação dos achados em outras populações ou pela demonstração das diferenças de expressão dos genes associados ao desfecho entre as populações caso e controle. Portanto não se pode inferir causalidade com este tipo de estudo, porém pode-se sugerir que a variante associada esteja em desequilíbrio de ligação com a variante verdadeiramente causal ou que as variantes intergênicas e intrônicas possam pertencer a elementos regulatórios.

Quanto ao estudo de gene candidato, estudo confirmatório, será necessária uma investigação de mecanismos biológicos envolvidos na interação gene-ambiente para melhor compreensão dos mecanismos envolvidos.

## REFERÊNCIAS DAS CONSIDERAÇÕES FINAIS

- 1 BARRETO, M. L. *et al.* 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 Pulm Med**, v. 6, p. 15, 2006.
- 2 COOPER, P. J. *et al.* Risk factors for asthma and allergy associated with urban migration: background and methodology of a cross-sectional study in Afro-Ecuadorian school children in Northeastern Ecuador (Esmeraldas-SCAALA Study). **BMC Pulm Med**, v. 6, p. 24, 2006.
- 3 COOPER, P. J.; RODRIGUES, L. C.; BARRETO, M. L. Influence of poverty and infection on asthma in Latin America. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v. 12, n. 2, p. 171-178, Apr 2012.
- 4 ADCOCK, I. M.; BARNES, P. J. Con: Genome-wide association studies have not been useful in understanding asthma. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 184, n. 6, p. 633-6, 2011.
- 5 MCCARTHY, M. I. *et al.* Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges. **Nat Rev Genet**, v. 9, n. 5, p. 356-69, May 2008.

## ANEXOS

## Anexo 1 – Formulário de aprovação no CEP –UFBA/ ISC



Universidade Federal da Bahia  
Instituto de Saúde Coletiva  
COMITÊ DE ÉTICA EM  
PESQUISA

### Formulário de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

Registro CEP: 003-05/CEP-ISC

Projeto de Pesquisa: "Fatores de risco para a asma e alergia e perfil imunológico em crianças na cidade de Salvador"

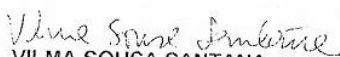
Pesquisador Responsável: Maurício Lima Barreto

Área Temática: Grupo I

Os Membros do Comitê de Ética em Pesquisa, do Instituto de Saúde Coletiva/Universidade Federal da Bahia, reunidos em sessão ordinária no dia 25 de fevereiro de 2005, e com base em Parecer Consubstanciado, resolveu pela situação do projeto abaixo descrito.

Situação: APROVADO

Salvador, 28 de fevereiro de 2005

  
VILMA SOUSA SANTANA  
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa  
Instituto de Saúde Coletiva  
Universidade Federal da Bahia

## Anexo 2 – Termo de consentimento livre e esclarecido - SCAALA

### INSTITUTO DE SAÚDE COLETIVA e FACULDADE DE MEDICINA UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

**PROJETO:** Fatores de risco para asma e doenças alérgicas, e perfil imunológico em crianças na cidade de Salvador

Nome da criança: \_\_\_\_\_  
REGISTRO: \_\_\_\_\_

#### Consentimento Informado

Pesquisadores da Universidade Federal da Bahia estão realizando um estudo sobre ASMA E ALERGIA na cidade de Salvador. O objetivo do estudo é saber a proporção de crianças com asma e alergia e estudar a causa dessas doenças. Seu (sua) filho (a) acima mencionado foi selecionado para participar do estudo, porém para isto é necessário que o (a) Senhor (a), como responsável pela criança acima, dê o seu consentimento para que as seguintes atividades sejam realizadas:

1. Que o senhor (a) responda um **questionário** sobre asma e alergia na criança.
2. Permita que se faça um exame na criança para saber se é alérgica. Nesse teste (chamado teste cutâneo) pequenas injeções serão dadas no braço da criança e se procurará ver se ela desenvolve um vermelhidão no lugar da injeção. Se o vermelhidão aparecer, isso quer dizer que a criança tem alergia. O teste dura em torno de 30 minutos e será feito por um médico qualificado.
3. Permita que se faça coleta de uma amostra de sangue da criança que será usado também para saber se a criança tem alergia a ácaros e barata, anemia, já teve infecção por vírus da hepatite A, *Toxocara canis*, *Toxoplasma gondii*, *Ascaris lumbricoides* e para saber o seu estado imunológico (interleucinas Il-4, Il-5, Il-10 e IFN-gama).
4. Nos forneça duas amostras de fezes da criança para exame parasitológico para saber se as crianças tem vermes.
5. Permita que seja medido a altura e peso da criança.
6. Permita que se faça coleta de poeira no leito onde a criança dorme, para saber que tipo de poeira existe na casa e que pode causar alergia.
7. Que o senhor (a) responda um questionários sobre características do quarto e leito onde a criança dorme a ser aplicado no momento da coleta de poeira dos leitos das crianças.



8. Que o senhor (a) permita que o soro que será utilizados para realizar os exames deste estudo, caso não sejam todos utilizados, possam ser guardados para ser utilizado no futuro na realização de outros exames que porventura sejam necessários para maior esclarecimento sobre as doenças estudadas

Toda informação obtido através do questionário ou dos exame é estritamente confidencial e o seu nome ou do seu filho não aparecerá em nenhuma parte do relatório ou publicação deste estudo.

Todos os resultados do exame serão entregue. A amostra de sangue será encaminhada para um laboratório e os exames são demorados, os resultados não são liberados no mesmo dia. Se a criança tiver algum verme forneceremos a orientação e os medicamentos para o tratamento gratuitamente. Se a criança estiver desnutrida ou com peso acima do normal receberá orientação sobre a dieta apropriada. Se a criança tiver asma ou alergia, marcaremos um dia para a criança ser vista por médico no ambulatório no Hospital das Clínicas no Canela, e vocês receberão passe de ônibus para duas pessoas ida e volta. Caso necessário toda orientação será dada para que ela tenha acesso ao melhor tratamento possível.

**Devemos enfatizar que a participação na pesquisa é voluntária e o Sr.(a) pode retirar o seu filho a qualquer momento.**

Qualquer problema contatar: Dr. Sérgio Souza da Cunha, Instituto de Saúde Coletiva, Universidade Federal da Bahia, Rua Padre Feijó 29/ 4º andar, Canela, telefone 3245-0544, email: cunhass@ufba.br .

Declaro estar ciente do que se trata a pesquisa **Fatores de risco para asma e doenças alérgicas, e perfil imunológico em crianças na cidade de Salvador**, confirmando os itens abaixo.

Pergunta	Resposta	Assinatura do responsável
Aceita responder o <b>questionário</b> ?	SIM-() NÃO- ()	
Aceita que a criança faça o <b>teste cutâneo</b> ?	SIM-() NÃO- ()	
Aceita que seja coletado uma <b>amostra de sangue</b> da criança para realização dos testes acima especificados?	SIM-() NÃO- ()	
Aceita que seja coletado amostra de fezes da criança?	SIM-() NÃO- ()	
Aceita que seja <b>coletado poeira</b> na casa?	SIM-()	

	NÃO- ()	
Aceita que seja medido <b>peso e altura</b> ?	SIM-()	
	NÃO- ()	
Aceita que o soro possa ser guardado, sujeito ao seu consentimento para novos exames alem do acima especificado	SIM-()	
	NÃO- ()	
Responsável <b>não aceitou</b> participar da pesquisa	()	

Salvador, ..... de .....de 2005

Assinatura do/a Pesquisador/a: \_\_\_\_\_

## Anexo 3 – questionário sobre problemas respiratórios.



**Universidade Federal da Bahia**  
**Instituto de Saúde Coletiva**

Rua Padre Feijó, no. 29 / 4o. andar, Salvador - Bahia, Brasil 40-110-170  
# (071) 245-0151 / 245-0544 FAX (071) 237-5856 e-mail: lis@ufba.br

REG:

| | | | |

MICRO-ÁREA:

| | | | |

1. Nome completo da criança:

\_\_\_\_\_

2. Endereço completo:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

3. Referência da residência: \_\_\_\_\_

4. Nome completo da mãe:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Apelido: \_\_\_\_\_

### **Notas para preenchimento do questionário.**

1. faça a pergunta como está escrito;
2. não dizer as respostas “sim” ou “não”, deixar a pessoa responder primeiro;
3. se a pessoa disser que não entendeu a pergunta, repita a pergunta novamente;
4. em perguntas sobre 12 meses, se a pessoa não entender pergunte “de mês de maio (exemplo) ano passado até agora, quer dizer, este mês de maio deste ano”;
5. se após repetir a pessoa continuar não entendendo, não marque a questão, deixe em branco, e dizer “e ‘doença de pele’ e vamos pular a pergunta”;
6. preste atenção nas notas que seguem as perguntas escritas em negrito, itálico e entre parênteses, por exemplo “(assinale apenas uma opção abaixo)”; ou no **rodapé** das páginas;
7. A versão final deve ser escrita com **CANETA AZUL**, por isso primeiro ouça atentamente a resposta antes de escrever. Se tiver que mudar algo anotar de forma legível e com **LETRA DE IMPRENSA**;
8. **OCUPAÇÃO** é no que a pessoa trabalha agora. Por exemplo, uma pessoa que é pedreiro como profissão (quer dizer tem algum curso/formação como pedreiro) atualmente pode estar trabalhando como cobrador de ônibus. Cobrador de ônibus é a ocupação e é o que deve ser anotado no questionário.
9. **COMEÇAR DIZENDO**: “algumas perguntas que vou fazer podem ser repetidas...”

10. Nas perguntas que tem “seu filho(a)” pode dizer também “ele(a)” ou citar o nome da criança.

O espaço abaixo é para você anotar observações


Data de preenchimento do questionário: \_\_\_/\_\_\_/2005

Nome do(a) entrevistador(a): \_\_\_\_\_ Código: \_\_\_\_\_

### **Características demográficas**

1. SEXO DA CRIANÇA: menino o-1 menina o-0
2. DATA DE NASCIMENTO DA CRIANÇA: _____ / _____ / _____ ( <i>ver documento</i> ) Viu documento? Sim o-1 Dia Mês Ano Não o-0
3. DATA DE NASCIMENTO DA MÃE: ___/___/___
4. TELEFONE DE CONTATO ( <i>da mãe ou outra pessoas</i> ): _____
NOME: _____
5. <b>ATÉ QUANDO A MÃE ESTUDOU?</b> ( <i>assinale apenas uma opção abaixo</i> )
o-1. não sabe ler nem escrever
o-2. Primário incompleto
o-3. Primário completo
o-4. ginásio incompleto (estudou entre a 5ª e 8ª série)
o-5. ginásio completo (8ª série completa)
o-6. 2º grau incompleto
o-7. 2º grau completo
o-8. superior incompleto
o-9 superior completo
6. OCUPAÇÃO PRINCIPAL DO PAI OU PADRASTO: _____ Não sabe - o

7. OCUPAÇÃO PRINCIPAL DA MÃE: \_\_\_\_\_ o-Refere **APENAS** dona

de casa

8 . SE MÃE REFERIR OUTRA OCUPAÇÃO ANOTAR:

\_\_\_\_\_

9. QUEM RESPONDEU A ESTE QUESTIONÁRIO?

Mãe o-1

Pai o-2

Outra pessoa o-3 Quem? .



### Condições da moradia e ambientais

☞ *Atenção: as perguntas em cinza são para o entrevistador observar e responder, não pergunte ao responsável*

**1. VERIFICAR A PAVIMENTAÇÃO (observar) (assinale apenas 1 resposta)**

*o-0.rua e calçada são pavimentadas*

*o-1.somente a rua é pavimentada*

*o-2.somente a calçada é pavimentada*

*o-3.nem rua nem calçada são pavimentadas*

*o-4.caminho/escada pavimentada*

*o-5.caminho/escada não pavimentado*

**2. VERIFICAR O TIPO DE HABITAÇÃO (observar) (assinale apenas 1 resposta)**

*o-0.casa*

*o-1.apartamento*

*o-2.barraco*

*o-3.quarto (quer dizer 1 cômodo e sempre de tijolos, se barraco anotar em "2")*

**3. HÁ QUANTO TEMPO A SENHORA MORA NESTA HABITAÇÃO?**

*o-0. Há menos de 6 meses*

*o-1. De 6 meses até menos de 2 anos*

*o-2. De 2 anos até menos de 5 anos*

*o-3. Há 5 anos ou mais*

**4. VERIFICAR O MATERIAL E O ACABAMENTO PREDOMINANTE (MAIS DE 50%) DAS PAREDES INTERNAS DA SALA (cômodo em que acontece a entrevista; observar) (assinale apenas 1 resposta)**

*o-0.blocos com revestimento*

*o-1.blocos sem revestimento*

<p>o-2.reaproveitamento de madeira, lata ou papelão o-3.taipa o-4.pré-moldada em concreto</p>
<p>5. <b>ESSA CASA É: (assinale apenas 1 resposta)</b> o-0.própria o-1.alugada o-2.sublocada/cedida o-3.NS/NR</p>
<p>6. <b>QUANTOS CÔMODOS TEM SUA HABITAÇÃO? (excluir banheiro e varanda):</b> <input type="text"/></p>
<p>7. <b>QUANTOS CÔMODOS SÃO USADOS PARA DORMITÓRIO?</b> <input type="text"/> <i>(Inclui quarto, sala, etc, é onde as pessoas dormem)</i></p>
<p>8. <b>DE ONDE VEM A ÁGUA USADA NA SUA HABITAÇÃO? (pode explicar)</b> o-0.água da Embasa (incluindo 'gato') com canalização interna o-1.água da Embasa (incluindo 'gato') exclusivamente com ponto de água externo (pode ser do vizinho) o-2.água de chafariz o-3.Outro (especificar)</p>
<p>9. <b>PARA ONDE VÃO OS DEJETOS SANITÁRIOS (FEZES E URINA) DA SUA HABITAÇÃO?</b></p> <p style="padding-left: 40px;">o-0.rede de esgoto o-1.rede de drenagem o-2.escadaria drenante o-3.fossa séptica [fechada (esvaziada periodicamente) ou seguida de sumidouro] o-4.fossa séptica [fossa rudimentar,lançamento na rua ou na rede de drenagem] o-5.buraco escavado o-6.canal ou vala a céu aberto na rua, riacho, mar o-7. Não sabe / não respondeu</p>

### Perguntas sobre PROBLEMAS RESPIRATÓRIOS

1. <b>ALGUMA VEZ NA VIDA</b> SEU FILHO/A <b>TEVE CHIADO</b> (OU PIADO) NO PEITO? <ul style="list-style-type: none"><li>• Sim o-1</li><li>• Não o-0 (<i>Se a resposta foi "NÃO", passe à pergunta 6,7,8</i>)</li></ul>
2. <b>NOS ÚLTIMOS 12 MESES</b> SEU FILHO/A <b>TEVE CHIADO</b> (OU PIADO) NO PEITO? <ul style="list-style-type: none"><li>• Sim o-1</li><li>• Não o-0 (<i>Se a resposta foi "NÃO", passe à pergunta 6,7,8</i>)</li></ul>
3. <b>NOS ÚLTIMOS 12 MESES</b> QUANTAS <b>CRISES/ATAQUES</b> DE CHIADO (OU PIADO) NO PEITO SEU FILHO(A) TEVE? <ul style="list-style-type: none"><li>• Nenhuma o-0</li><li>• 1 a 3 o-1</li><li>• 4 a 12 o-2</li><li>• Mais de 12 o-3</li></ul>
4. <b>NOS ÚLTIMOS 12 MESES</b> QUANTAS VEZES SEU FILHO/A <b>ACORDOU À NOITE</b> POR CAUSA DE CHIADO (OU PIADO)? <ul style="list-style-type: none"><li>• Nunca se acordou com chiado o-0</li><li>• Menos de uma noite por semana, quer dizer, nem todas as semanas o-1</li><li>• Uma ou mais de uma noite por semana o-2</li></ul>
5. <b>NOS ÚLTIMOS 12 MESES</b> OS CHIADOS (OU PIADO) NO PEITO TÊM SIDO TÃO GRAVES QUE SEU FILHO NÃO CONSEGUE DIZER <b>DUAS PALAVRAS SEGUIDAS</b> SEM QUE TENHA QUE PARAR PARA RESPIRAR? <ul style="list-style-type: none"><li>• Sim o-1</li><li>• Não o-0</li></ul>
6. SEU FILHO/A TEVE <b>ASMA</b> <u>ALGUMA VEZ NA VIDA</u> ? <ul style="list-style-type: none"><li>• Sim o-1</li><li>• Não o-0</li></ul>
7. <b>NOS ÚLTIMOS 12 MESES</b> VOCÊ NOTOU CHIADO (OU PIADO) NO PEITO DE SEU FILHO/A AO RESPIRAR, DURANTE OU DEPOIS DE FAZER <b>EXERCÍCIO</b> (CORRER, JOGAR BOLA, PULAR, ETC) ? <ul style="list-style-type: none"><li>• Sim o-1</li><li>• Não o-0</li></ul>
8. <b>NOS ÚLTIMOS 12 MESES</b> SEU FILHO/A TEM APRESENTADO <b>TOSSE SECA</b> À NOITE, QUE NÃO TENHA SIDO A TOSSE POR RESFRIADO OU GRIPE? <ul style="list-style-type: none"><li>• Sim o-1</li><li>• Não o-0</li></ul>

### Questionário sobre PROBLEMAS DE NARIZ

1. ALGUMA VEZ NA VIDA SEU FILHO/A TEVE ESPIRROS, QUANDO **NÃO** ESTAVA RESFRIADO(A) OU COM GRIPE?
  - Sim o-1
  - Não o-0 *(Se a resposta foi "NÃO", passe à pergunta 5)*
2. NOS ÚLTIMOS 12 MESES SEU FILHO/A TEVE ESPIRROS, QUANDO **NÃO** ESTAVA RESFRIADO OU COM GRIPE?
  - Sim o-1
  - Não o-0 *(Se a resposta foi "NÃO", passe à pergunta 5)*
3. NOS ÚLTIMOS 12 MESES, SEU FILHO/A TEM APRESENTADO ESTES PROBLEMAS DE NARIZ ACOMPANHADOS DE COCEIRA E LACRIMEJAMENTO NOS OLHOS?
  - Sim o-1
  - Não o-0
4. NOS ÚLTIMOS 12 MESES QUANTAS VEZES OS PROBLEMAS DE NARIZ IMPEDIRAM SEU FILHO/A DE FAZER SUAS ATIVIDADES DIÁRIAS?
  - Nunca o-0
  - Poucas vezes o-1
  - Mais que pouca vezes o-2
  - Muito frequentemente o-3
5. SEU FILHO/A TEVE ALGUMA VEZ NA VIDA ALERGIA NASAL OU RINITE ALÉRGICA?
  - Sim o-1
  - Não o-0



## Questionário sobre PROBLEMAS DE PELE

1. **ALGUMA VEZ NA VIDA** SEU FILHO/A APRESENTOU IRRITAÇÕES NA PELE QUE IAM E VOLTAVAM E QUE COÇAVAM, DURANDO PELO MENOS SEIS MESES?

- Sim o-1
- Não o-0 (Se a resposta foi "NÃO", passe à pergunta 7,8)

2. **NOS ÚLTIMOS 12 MESES** SEU FILHO/A APRESENTOU ESTAS IRRITAÇÕES NA PELE QUE IAM E VOLTAVAM E QUE COÇAVAM?

- Sim o-1
- Não o-0 (Se a resposta foi "NÃO", passe à pergunta 7,8)

3. **ALGUMA VEZ NA VIDA** ESTAS IRRITAÇÕES NA PELE QUE COÇAVAM APARECERAM EM ALGUM DESTES LUGARES?

*Dobras dos cotovelos, ou atrás dos joelhos, ou na frente dos tornozelos, ou na dobra entre coxa e nádega, ou ao redor do pescoço, ou nos olhos ou orelhas? (perguntar sobre esses lugares mesmo que tenha respondido "em todo o corpo")*

- Sim o-1 (assinalar se respondeu em pelo menos um dos lugares acima)
- Não o-0

4. COM **QUE IDADE** APARECERAM NO SEU FILHO/A, PELA PRIMEIRA VEZ, ESTAS IRRITAÇÕES NA PELE QUE COÇAVAM?

- Antes dos 2 anos o-0
- 2 a 4 anos o-1
- 5 anos ou mais o-2

5. **NOS ÚLTIMOS 12 MESES** ESTAS IRRITAÇÕES NA PELE **CHEGARAM A DESAPARECER** COMPLETAMENTE?

- Sim o-1
- Não o-0

6. **NOS ÚLTIMOS 12 MESES** QUANTAS VEZES SEU FILHO/A TEVE QUE SE **LEVANTAR DA CAMA À NOITE** PORQUE ESTAS IRRITAÇÕES NA PELE COÇAVAM?

- Nunca nos 12 últimos meses o-0
- Menos de uma noite por semana, quer dizer, nem todas as semanas o-1
- Uma ou mais vezes por semana o-2

7. SEU FILHO/A TEVE ALGUMA VEZ NA VIDA **ECZEMA OU DERMATITE ATÓPICA**?

*(se não souber responder repita a pergunta, se continuar não sabendo, deixar em branco e dizer "vamos pular")*

- Sim o-1
- Não o-0

8. **NOS ÚLTIMOS 12 MESES**, SEU FILHO(A) SOFREU DE **PELE SECA** EM TODO O CORPO?

- Sim o-1
- Não o-0

*Chiado e falta de ar*

---

1. **NOS ÚLTIMOS 12 MESES SEU FILHO/A TEVE CANSAÇO?**

- Sim o-1
- Não o-0

2. **ALGUMA VEZ NA VIDA SEU FILHO/A ACORDOU COM FALTA DE AR?**

- Sim o-1
- Não o-0

**ATENÇÃO:** faça as perguntas abaixo APENAS se a pessoa respondeu “sim” a qualquer pergunta do quadro “PROBLEMAS RESPIRATÓRIOS” (página 5).

Fez as perguntas abaixo? • Sim o-1

- Não (quer dizer pulou as perguntas abaixo) o-0

3. **NOS ÚLTIMOS 12 MESES O QUE TEM PIORADO O CHIADO DE SEU FILHO/A?**  
(dizer “vou citar alguns itens e você me diz se tem piorado o chiado”; marcar tantas opções quanto necessário)

- o-Mudanças no tempo
- o-Pólen (*explicar dizendo “pozinho da flor”*)
- o-Estado Nervoso
- o-Fumaças
- o-Poeira de casa
- o-Animais domésticos
- o-Resfriados/gripe
- o-Fumaça de cigarro
- o-Comidas ou bebidas (indicar quais): \_\_\_\_\_
- o-Sabonetes, sprays ou detergentes
- o-Outras coisas por favor, enumerar): \_\_\_\_\_
- o-Todas as opções acima negativas

## Tratamentos para doenças respiratórias

**ATENÇÃO:** faça as TODAS AS perguntas abaixo (1 E 2) APENAS se a pessoa respondeu "sim" a qualquer pergunta do quadro "PROBLEMAS RESPIRATÓRIOS" (página 5).

Fez as perguntas abaixo: • Sim o-1

• Não (quer dizer que pulou as perguntas abaixo) o-0

1. NOS ÚLTIMOS 12 MESES SEU FILHO/A USOU ALGUM REMÉDIO (COMPRIMIDOS, XAROPES) PARA CHIADO OU PIADO OU ASMA?

- Sim o-1 *(Se respondeu "SIM", escreva o nome dos medicamentos abaixo)*
- Não o-0

Notas 1- *Pode assinalar mais de uma opção; 2-pergunta se tomou remédio, depois nome e depois sobre frequência*

<u>Remédios de farmácia</u> (dizer "remédios comprados em farmácias, igrejas, catálogos", e ver caixa)	Só quando tinha piado	Regularmente Todo dia por pelo menos 2 meses ao ano	Outro Escreva ao lado
<u>Nome do remédio</u>	.....o-0.....	.....o-1.....	o-9
_____	.....o-0.....	.....o-1.....	o-9
_____	.....o-0.....	.....o-1.....	o-9
_____	.....o-0.....	.....o-1.....	o-9
_____	.....o-0.....	.....o-1.....	o-9
<u>Remédios caseiros</u> (quer dizer "feitos em casa")	Só quando tinha piado	Regularmente Todo dia por pelo menos 2 meses ao ano	Outro Escreva ao lado
<u>Nome do remédio</u>	.....o-0.....	.....o-1.....	o-9
_____	.....o-0.....	.....o-1.....	o-9

2. NOS ÚLTIMOS 12 MESES SEU FILHO(A) USOU ALGUM REMÉDIO (COMPRIMIDOS, XAROPES) PARA CHIADO OU PIADO OU PARA ASMA ANTES, DURANTE OU DEPOIS DE EXERCÍCIO FÍSICO (CORRER, JOGAR BOLA, PULAR, ETC)?

- Sim o-1 *(Se respondeu "SIM", escreva o nome dos medicamentos)*
- Não o-0

Notas: 1- *Pode assinalar mais de uma opção; 2-pergunta se tomou remédio, depois nome e depois sobre frequência*

<u>Remédios de farmácia</u> (dizer "remédios comprados em farmácias, igrejas, catálogos", e ver caixa)	Só quando tinha piado	Regularmente Todo dia por pelo menos 2 meses ao ano	Outro Escreva ao lado
<u>Nome do remédio</u>	.....o-0.....	.....o-1.....	o-9
_____	.....o-0.....	.....o-1.....	o-9
_____	.....o-0.....	.....o-1.....	o-9
_____	.....o-0.....	.....o-1.....	o-9
_____	.....o-0.....	.....o-1.....	o-9
<u>Remédios caseiros</u> (dizer "feitos em casa")	Só quando tinha piado	Regularmente Todo dia por pelo menos 2 meses ao ano	Outro Escreva ao lado
<u>Nome do remédio</u>	.....o-0.....	.....o-1.....	o-9
_____	.....o-0.....	.....o-1.....	o-9

**ATENÇÃO:** faça as perguntas PARA TODAS AS PERGUNTAS abaixo APENAS se a pessoa respondeu "sim" a qualquer pergunta do quadro "PROBLEMAS RESPIRATÓRIOS" (página 5).

Fez as perguntas abaixo? • Sim o-1

• Não (quer dizer pulou as perguntas abaixo) o-0

3. VOCÊ TEM UM PLANO DE TRATAMENTO POR ESCRITO QUE LHE EXPLICA COMO CUIDAR DA ASMA DE SEU FILHO(A)? *Dizer "por escrito quer dizer se tem um papel do médico(a) ou alguma cartilha ou folheto, com instruções sobre asma, o que é a doença, como tratar, etc,"*

- Sim ..... o-1
- Não ..... o-0

4. NOS ÚLTIMOS 12 MESES QUANTAS VISITAS SEU FILHO/A FEZ A QUALQUER UM DOS SEGUINTE PROFISSIONAIS DE SAÚDE POR CHIADO OU PIADO NO PEITO OU ASMA?

a) POR UM ATAQUE DE CHIADO OU PIADO NO PEITO OU ASMA?

Agente de Saúde .....	Nenhuma o-0	1-3 vezes o-1	4-12 vezes o-2	mais de 12 vezes o-3
Enfermeiro/a .....	Nenhuma o-0	1-3 vezes o-1	4-12 vezes o-2	mais de 12 vezes o-3
Médico <sup>1</sup> .....	Nenhuma o-0	1-3 vezes o-1	4-12 vezes o-2	mais de 12 vezes o-3
Sala emergência hospital <sup>2</sup> .....	Nenhuma o-0	1-3 vezes o-1	4-12 vezes o-2	mais de 12 vezes o-3

b) PARA UMA VISITA DE REVISÃO DE CHIADO OU PIADO NO PEITO OU ASMA?

Agente de Saúde .....	Nenhuma o-0	1-3 vezes o-1	4-12 vezes o-2	mais de 12 vezes o-3
Enfermeiro/a .....	Nenhuma o-0	1-3 vezes o-1	4-12 vezes o-2	mais de 12 vezes o-3
Médico <sup>1</sup> .....	Nenhuma o-0	1-3 vezes o-1	4-12 vezes o-2	mais de 12 vezes o-3
Sala emergência hospital <sup>2</sup> .....	Nenhuma o-0	1-3 vezes o-1	4-12 vezes o-2	mais de 12 vezes o-3

5. NOS ÚLTIMOS 12 MESES QUANTAS VEZES SEU FILHO/A INTERNOU NO HOSPITAL POR CRISE DE CHIADO OU PIADO NO PEITO OU ASMA?

- Nenhuma ..... o-0
- 1 vez ..... o-1
- vezes.... ..... o-2
- Mais de 2..... o-3

6. SEU FILHO/A CONSULTOU COM ALGUM DOS SEGUINTE PROFISSIONAIS, POR CHIADO OU PIADO NO PEITO OU ASMA, NOS ÚLTIMOS 12 MESES?

- Homeopata..... Sim o-1 ..... Não o-0
- Fisioterapeuta..... Sim o-1 ..... Não o-0
- Psiquiatra ou psicólogo..... Sim o-1 ..... Não o-0
- Assistente social..... Sim o-1 ..... Não o-0
- Curandeiro..... Sim o-1 ..... Não o-0
- Outros: especificar: \_\_\_\_\_

7. SEU FILHO/A ALGUMA VEZ TOMOU UMA INJEÇÃO DE VACINA PARA A ALERGIA, A FIM DE PREVENIR OU TRATAR A ASMA?

- Sim o-1
- Não o-0

<sup>1</sup> Refere-se a atendimento regular em ambulatório e pela crise marcou-se uma consulta extra.

<sup>2</sup> Refere-se atendimento de urgência ou consulta não marcada

**ATENÇÃO:** faça a pergunta abaixo APENAS se a pessoa respondeu "sim" a qualquer pergunta do quadro "PROBLEMAS RESPIRATÓRIOS" (página 5).

Fez as perguntas abaixo? • Sim o-1

• Não (quer dizer pulou as perguntas abaixo) o-0

8. NOS ÚLTIMOS 12 MESES QUANTOS DIAS DE COLÉGIO OU CRECHE SEU FILHO/A PERDEU POR CHIADO OU PIADO NO PEITO OU ASMA?

• Nenhum.....o-0

• 1 a 5..... o-1

• 6 a 10..... o-2

• Mais de 10.. o-3

• Não freqüentava creche ou colégio nos 12 meses.....o-4